



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-
BRASILEIRA
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
CURSO DE ENGENHARIAS DE ENERGIAS**

ÍTALO RAFAEL DE AGUIAR FALCÃO

**Hidroesterificação enzimática do óleo de babaçu (*Orbignya sp.*), aplicação do conceito de
combi-lipases para produção de ésteres etílicos (biodiesel): Uma abordagem via método
Taguchi**

ACARAPE

2021

Hidroesterificação enzimática do óleo de babaçu (*Orbignya sp.*), aplicação do conceito de combi-lipases para produção de ésteres etílicos (biodiesel): Uma abordagem via método Taguchi

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Energias da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Energias.
Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.

ACARAPE

2021

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Falcão, Italo Rafael de Aguiar.

f178h

Hidroesterificação enzimática do óleo de babaçu *Orbignya sp.*, aplicação do conceito de combi-lipases para produção de ésteres etílicos biodiesel: Uma abordagem via método Taguchi / Italo Rafael de Aguiar Falcão. - Redenção, 2021.

56f: il.

Monografia - Curso de Engenharia de Energias, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2021.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.

1. Biodiesel. 2. Combi-lipases. 3. Óleo de Babaçu. 4. Irradiação Ultrassônica. I. Título

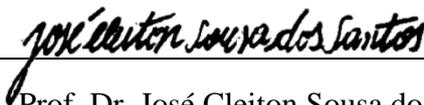
CE/UF/BSCA

CDD 662.88

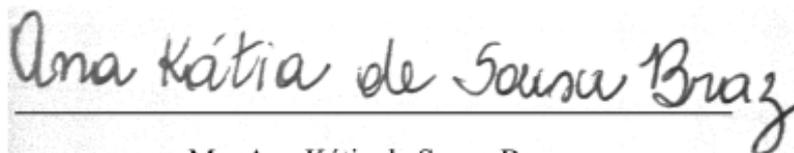
Hidroesterificação enzimática do óleo de babaçu (*Orbignya sp.*), aplicação do conceito de combi-lipases para produção de ésteres etílicos (biodiesel): Uma abordagem via método Taguchi

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Energias da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Energias.
Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.

Defesa em: 08 de abril de 2021



Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
(Orientador – UNILAB)



Ma. Ana Kátia de Sousa Braz
(Examinadora Interna – IEDS-UNILAB)



Ma. Roberta Bussons Rodrigues Valério
(Examinadora Externa – UFC)

À Deus.
Aos meus queridos pais, Maria Irani e
Alzimar Falcão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida, pela saúde e por ter me guiado por esta trilha.

À minha mãe, Maria Irani de Aguiar pelo amor, incentivo incondicionais. Aos meus familiares e amigos, pelo suporte durante a minha jornada acadêmica, em especial a minha tia Maria Ivanilda.

À Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), e todos que a compõem, pela oportunidade, confiança e acolhimento. Aos meus orientadores, professor José Cleiton Sousa dos Santos e professora Maria Cristiane Martins de Souza, pelo apoio, paciência, confiança e atenção dedicados à minha formação acadêmica.

A todos os membros do grupo GENEZ – Grupo de Engenharia Enzimática, pelo companheirismo e experiências compartilhadas. Em especial ao Rodolpho Monteiro pela paciência e empenho em ajudar.

Aos colegas de curso de Engenharia de Energias, em especial ao meu amigo Alexandre Peixoto, pelo exemplo de humildade e determinação e meu amigo Carlos Manuel pelo suporte e companhia nos estudos ao longo da graduação. Agradeço também a minha namorada Kássia Garrido pelos conselhos, paciência e carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa de Iniciação Científica (PIBIC), pelo financiamento dessa pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

O biodiesel é um combustível limpo, renovável e de queima limpa, sendo uma alternativa promissora para os combustíveis fósseis. Atualmente, biodiesel é produzido principalmente pela reação de transesterificação via catálise química, entretanto os catalisadores químicos demandam muita energia, produzem subprodutos indesejáveis que podem ser ofensivos ao meio ambiente. Nesse contexto, a catálise enzimática surge como alternativa, pois demanda menos energia, devido às condições de operação amenas e é altamente seletiva e específica, evitando a produção de subprodutos indesejáveis. Neste trabalho a esterificação enzimática dos ácidos graxos livres (AGL) de óleo de babaçu foi avaliada usando três biocatalisadores (lipase B de *Candida antarctica* (CALB), lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei* (RML)). Um planejamento de mistura de 3 fatores foi realizado para determinar a melhor combinação de lipases, de acordo com a análise estatística, o melhor biocatalisador para o substrato estudado é composto por 67,5% de CALB, 25% de TLL e 7,5% de RML. A combinação obtida foi utilizado em um planejamento Taguchi (matriz ortogonal L9), de modo a determinar as condições ótimas para a reação (biocatalisador, razão molar, temperatura e tempo reacional). Sob condições otimizadas (10%, 1:7 (AGLs/álcool), 60 °C e 4,5 horas), a conversão experimental foi $93,58 \pm 0,21\%$, dentre os parâmetros analisados a razão molar foi o de maior influência na produção, enquanto a temperatura foi o parâmetro de menor influência. Sob irradiação ultrassônica, foi obtido uma conversão de $97,53 \pm 0,8\%$, sendo que para as mesmas condições foi observada uma conversão de $87,05 \pm 0,68\%$ para a agitação mecânica, demonstrando a eficiência da tecnologia de ultrassom na síntese de biodiesel.

Palavras-chave: Biodiesel. Combi-lipases. Óleo de Babaçu. Irradiação Ultrassônica.

ABSTRACT

Biodiesel is a clean, renewable and clean-burning fuel and is a promising alternative to fossil fuels. Currently, biodiesel is produced mainly by the transesterification reaction via chemical catalysis, however chemical catalysts require a lot of energy, produce undesirable by-products that can be offensive to the environment. In this context, enzymatic catalysis appears as an alternative, as it demands less energy, due to the mild operating conditions and is highly selective and specific, avoiding the production of undesirable by-products. In this work the enzymatic esterification of free fatty acids (FFA) from babassu oil was evaluated using three biocatalysts (*Candida antarctica* lipase B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) and *Rhizomucor miehei* (RML)). It was performed in a mixture design of 3 factors was carried out to analyze the best combination of lipases according to the composition of fatty acids present in babassu oil, according to the statistical analysis, the best biocatalyst for the studied substrate is composed of 67,5% CALB, 25% TLL and 7,5% of RML. This result was used in a Taguchi design (orthogonal matrix L9), in order to determine the optimal conditions for the reaction (biocatalyst, molar ratio, temperature and reaction time). Under optimized conditions (10%, 1:7 (AGLs / alcohol), 60 C and 4,5 hours), the experimental conversion was $93,58 \pm 0,21\%$, among the analyzed parameters the molar ratio was the most influence on production, while temperature was the least influential parameter. Under ultrasonic irradiation, a conversion of $97,53 \pm 0,8\%$ was possible, and for the same conditions a conversion of $87,05 \pm 0,68\%$ was observed for mechanical agitation, demonstrating the efficiency of ultrasound technology for biodiesel production.

key-words: Biodiesel. Combi-lipases. Babassu oil. Ultrasonic irradiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação reversível (esterificação/hidrólise)	19
Figura 2 – Representação da estrutura tridimensional das lipases: a) lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) (código PDB: 4K6G) com tríade catalítica Ser105, Asp187 e His224. b) lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) (código PDB: 1DT3) com tríade catalítica Ser146, His258 e Asp201. c) <i>Rhizomucor miehei</i> (RML) (código PDB: 3TGL) com tríade catalítica Ser144, His257 e Asp203. Todas as estruturas tridimensionais foram obtidas com o auxílio da Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês, Protein Data Bank) e PyMol 2.2.2.	21
Figura 3 – Fluxograma do método Taguchi	26
Figura 4 – Superfície de resposta para o planejamento de mistura de para a síntese enzimática de biodiesel. Meio reacional: razão molar de 1: 1 (AGLs/álcool), 5% de biocatalisador (calculado com base na massa dos AGL), 30 ° C, por 1,5 hora. As reações foram conduzidas em incubadora de agitador orbital a 200 rpm. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".	34
Figura 5 – Gráfico de relação S/R para esterificação de AGLs oriundo do óleo de babaçu empregando a combinação de lipases obtida no planejamento experimental triangular de mistura. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".	36
Figura 6 – Conversão de biodiesel, sob agitação mecânicas e irradiação ultrassônica. Meio reacional: 10% de biocatalisador, 1:7 (álcool: ácido). As reações foram realizadas a 60 °C a 250 rpm para agitação mecânica ou 37 kHz e 300 W para técnica de ultrassom. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".	39
Figura 7 – Estabilidade operacional do biocatalisador. Meio reacional: 10 % de biocatalisador (67,5% de CALB, 25% de TLL e 7,5% de RML), 1:7 (álcool: ácido). As reações foram realizadas por 200 minutos a 60 °C e a 300 rpm. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de operação do cromatógrafo.....	28
Tabela 2 – Fatores independentes e seus respectivos níveis para produção de AGL.....	29
Tabela 3 – Percentuais dos ácidos graxos na composição química do óleo de babaçu. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".	32
Tabela 4 – Planejamento triangular para a síntese enzimática de biodiesel. Meio reacional: razão molar de 1: 1 (água / álcool), 5% de biocatalisador (calculado com base na massa dos AGL), 30 ° C, por 1,5 hora. As reações foram conduzidas em incubadora de agitador orbital a 200 rpm. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".	33
Tabela 5 – Matriz de planejamento Taguchi L9 e seus respectivos valores de conversão e as relações S/R. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".	35
Tabela 6 – Tabela de resposta de relações S/R. Mais detalhes são fornecidos na seção Materiais e Métodos. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".	37
Tabela 7 – Resultados de ANOVA para parâmetros que afetam a conversão de éster. O efeito fatorial insignificante é agrupado conforme mostrado { }. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".	38

LISTA DE SIGLAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
CALA	Lipase A de <i>Candida antarctica</i>
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CCD	<i>Central Composite Desing</i>
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
DoE	Design de Experimentos
IA	Índice de Acidez
MON	Ácido Graxo Monoinsaturado
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
POL	Ácido Graxo Poli-insaturado
RML	<i>Rhizomucor miehei</i>
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>
SAT	Ácido Graxo Saturado
S/R	Razão Sinal-Ruído
TLL	<i>Thermomyces lanuginosus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	BIODIESEL	15
3.2	BIODIESEL NO CENÁRIO NACIONAL	16
3.3	ÓLEO DE BABAÇU	17
3.4	HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	18
3.5	ENZIMAS	19
3.6	COMBI-LIPASE	21
3.7	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	22
3.8	TECNOLOGIA DE ULTRASSOM	23
3.9	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	24
3.9.1	Misturas	24
3.9.2	Taguchi	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	MATERIAIS	27
4.2	CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE ULTRASSOM	27
4.3	MÉTODOS	27
4.3.1	Análise por cromatografia a gás dos ácidos graxos	27
4.3.2	Cálculo da Massa Molar do óleo de Babaçu	28
4.3.3	Hidrólise Enzimática	28
4.3.4	Combi-lipase	29
4.3.5	Otimização da produção de biodiesel (Taguchi)	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32

SUMÁRIO

5.1	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE BABAÇU	32
5.2	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	33
5.2.1	Planejamento de mistura: Seleção da melhor combi-lipase para esterificação	
	33	
5.2.2	Taguchi - Análise de Variância (ANOVA) de esterificação e previsão de	
	condições ótimas	35
5.2.3	Regressão da equação do modelo (Modelagem matemática)	38
5.3	CURSO DA ESTERIFICAÇÃO	38
5.4	ESTABILIDADE OPERACIONAL DO BIOCATALISADOR.....	40
6	CONCLUSÕES.....	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O constante aumento da demanda de combustíveis fósseis para transporte e indústria provoca o esgotamento de combustíveis de origem fóssil (petróleo e gás natural, por exemplo) (NORJANNAH et al., 2016). Além disso, a queima desses combustíveis está associada as emissões de dióxido de carbono e gás metano o que em alta concentração pode ocasionar poluição do ar e, portanto, gerar mudanças climáticas (POURHOSEINI et al., 2020). Esses problemas tornam necessário a busca por fontes alternativas de energia que sejam sustentáveis e que cause menos impactos negativos ao meio ambiente.

Nesse cenário, o biodiesel é um candidato para substituir os combustíveis de origem fóssil, por ser uma fonte renovável, limpa, biodegradável, não tóxico e baixo poluente (CAVALCANTE et al., 2020); além disso, o biodiesel é compatível com o diesel (podendo substituí-lo total ou parcialmente) (NISAR et al., 2017). O biodiesel pode ser produzido a partir de óleos vegetais, gordura animal, óleos usados em frituras e óleos de microalgas (NORJANNAH et al., 2016). Atualmente o óleo de soja é responsável por mais de 70% do biodiesel produzido no Brasil (VIDAL, 2019); contudo, a soja é um produto estratégico para o país, sendo a principal *commodity* de exportação.

Portanto, faz-se necessário diversificar as matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel; o óleo de babaçu surge como um candidato promissor (MOREIRA et al., 2020). Essa oleaginosa pode ser empregada em diversas aplicações (farmacêuticos, limpeza, óleos láuricos e na produção de azeite) (CONAB, 2018); entretanto, atualmente babaçu é pouco utilizado, pois todos esses ramos industriais já possuem produtos consolidados, mais baratos e mais populares (CONAB, 2018). Isso faz encarecer o preço dos produtos produzidos por babaçu (CONAB, 2018). Nesse sentido, a implementação do óleo de babaçu para produção de biodiesel é facilitada, por ser um produto que não compete com outro mercado (CAVALCANTE et al., 2020).

Os catalisadores básicos homogêneos, são os mais utilizados na produção de biodiesel, porém, eles possuem diversas desvantagens, como alta demanda de energia e formação de sub produtos indesejáveis que podem gerar resíduos ao meio ambiente (MONTEIRO et al., 2021). As enzimas surgem como alternativa, por serem menos nocivas ao meio ambiente; elas são altamente ativas em condições brandas de pH, temperatura e pressão, gerando uma economia de energia e minimizando a degradação térmica do produto, ademais são altamente seletivas, o que evita a produção de subprodutos indesejáveis (CAVALCANTI et al., 2018).

Dentre as enzimas, as lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são as mais empregadas em biocatálise, esses biocatalisadores têm como função biológica catalisar a hidrólise de óleos e gorduras (DE OLIVEIRA et al., 2018), além da hidrólise, as lipases são capazes de mediar uma vasta gama de reações (acidólise, aminólise, esterificação, transesterificação e interesterificação, por exemplo) (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b); são amplamente utilizadas pela indústria devido à alta atividade, alta especificidade e estabilidade em diversas condições reacionais (RIOS et al., 2018).

A reação mais empregada pela indústria na produção de biodiesel é a transesterificação, entretanto ela possui algumas desvantagens, a citar, produção de glicerol, etapas de lavagem e purificação, inibição da enzima imobilizada (devido acúmulo de glicerol na matriz de imobilização) (MONTEIRO et al., 2021). Nesse sentido, a hidroesterificação surge como uma alternativa, uma vez que essa reação não produz subprodutos, dispensa etapas de filtragem e lavagem, e torna possível o emprego de óleos de alta acidez na produção de biodiesel (como óleos de óleo de cozinha usado, óleo de algas, gordura animal) (POURZOLFAGHAR et al., 2016).

Os óleos empregados na produção de biodiesel são compostos por vários triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres (ISSARIYAKUL; DALAI, 2014). Logo, a especificidade e seletividade das enzimas, que são fundamentais para evitar a formação de subprodutos, podem fazer com que a lipase não reaja com o substrato desejado ou até mesmo seja inibida por outros componentes do óleo, resultando em baixas taxas de conversão (MONTEIRO et al., 2021). Portanto, uma mistura de lipases com diferentes especificidades, denominada de combi-lipase, pode ser empregada para maximizar a reação (POPPE et al., 2018b).

A fim de otimizar os parâmetros de processos na produção de biodiesel, faz-se necessário usar a quantidade correta de reagentes e catalisadores sob condições ótimas reacionais (temperatura e tempo reacional, por exemplo). Para tanto, Design de Experimentos (DoE) podem ser realizados (ARAKI et al., 2018). Dentre os DOEs, o método de matriz ortogonal Taguchi destaca-se por considerar vários parâmetros ao mesmo tempo e ter os efeitos importantes facilmente identificados, diminuindo o tempo e os custos do processo (CHOWDHURY et al., 2014).

A imobilização enzimática produz um catalisador heterogêneo, embora a imobilização agregue diversas características desejáveis para a enzima (maior estabilidade e fácil reuso, por exemplo)(DOS SANTOS et al., 2015), a enzima imobilizada requer mais energia para transferência de massa e obtenção de maiores conversões (BANSODE; RATHOD,

2017). Uma alternativa para essa problemática é a técnica do ultrassom, que é uma tecnologia com alta eficiência e pouco exigência de equipamentos (LERIN et al., 2014). O ultrassom é caracterizado por um fenômeno denominado cavitação, formação, expansão e colapso de bolhas que aumentam as taxas de reação em virtude das condições supercríticas de temperatura e pressão geradas (WANG et al., 2018b). Com isso, ocorre um aumento na transferência de massa, sendo possível obter altas conversões em menos tempo de reação.

Nesse contexto, o objetivo principal desta comunicação é sintetizar ésteres etílicos (biodiesel) utilizando a melhor combinação de biocatalisador para o substrato heterogêneo obtido através de hidrólise enzimática do óleo de babaçu. Analisando a influência da temperatura, tempo de reação, quantidade de biocatalisador e razão molar para determinar a condição ótima para a produção dos ésteres etílicos, sendo o ponto ótimo teórico validado experimentalmente; ademais, a condição ótima de temperatura, biocatalisador e razão molar foi utilizada para determinar o curso da reação sob agitação mecânica e tecnologia de ultrassom.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é otimizar a produção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir dos ácidos graxos obtidos por hidrólise enzimática do óleo de babaçu via combi-lipase com o auxílio do planejamento experimental Taguchi.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química do óleo de babaçu e dos ésteres etílicos (biodiesel);
- Obter ácidos graxos livres a partir da matéria-prima estudada, via hidrólise enzimática;
- Determinar o perfil de ácidos graxos presentes no óleo de babaçu;
- Determinar a melhor combinação de lipases (entre CALB, TLL e RML) para a síntese de ésteres etílicos (biodiesel);
- Determinar e validar experimentalmente o ponto ótimo teórico (temperatura, razão molar, biocatalisador e tempo reacional) para a produção de ésteres etílicos (biodiesel) catalisado pela melhor combinação de lipase através do planejamento experimental Taguchi;
- Determinar a influência dos parâmetros reacionais (temperatura, razão molar, temperatura e tempo reacional); e,
- Comparar o curso da reação sob agitação mecânica e irradiação ultrassônica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIODIESEL

A humanidade tem buscado alternativas para os combustíveis de origem fóssil, como o diesel, uma vez que a sua queima está associada ao aumento da emissão de CO₂, o que em alta concentração pode ocasionar poluição do ar e, portanto, gerar mudanças climáticas (LAO et al., 2020; POURHOSEINI et al., 2020); além disso, nas últimas décadas, tem sido registrado um declínio nas reservas de petróleo e alta vulnerabilidade do seu preço (ARANSIOLA et al., 2014; BINHAYEEDING et al., 2020; EDERINGTON et al., 2019; YANG et al., 2019). Nesse cenário, o uso de biocombustíveis (nomeadamente, o biodiesel) é a principal opção para contornar essas questões (CAVALCANTE et al., 2020; MONTEIRO et al., 2021; REZANIA et al., 2019).

Biodiesel é composto de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, geralmente derivados de óleos vegetais ou gorduras animais (CHING-VELASQUEZ et al., 2020; MA; HANNA, 1999; YAHYAEI; GHOBADIAN; NAJAFI, 2013). Além de ser produzido através de recursos renováveis que possui queima limpa, reduzindo a emissão de gases de efeito estufa; o biodiesel é compatível com o diesel (podendo substituí-lo total ou parcialmente) por possuir propriedades semelhantes e eventualmente até superiores (KAUR; ALI, 2011; KILLOL et al., 2019; NISAR et al., 2017). O biodiesel é biodegradável, menos tóxico, possui pontos de fulgor mais elevados, teor de enxofre insignificante e emite menos poluentes do que o diesel (ACHARYA et al., 2019; CHING-VELASQUEZ et al., 2020; MOREIRA et al., 2020).

De acordo com os padrões internacionais, o biodiesel deve atender os seguintes critérios: viscosidade cinemática a 40 ° C entre 3,0 e 6,0 mm²/s, teor mínimo de éster de 96,5% em peso, índice de acidez máximo de 0,50 mgKOH/g, máximo teor de glicerol livre de 0,02% em peso, valor máximo de glicerol total de 0,50% em peso, entre outros parâmetros (MONTEIRO et al., 2021). Um dos principais fatores que influenciam nas propriedades do biodiesel é a matéria prima empregada na sua produção, por exemplo, biodiesel produzido a partir do óleo de mamona apresenta ótimos valores de viscosidade cinemática (ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017; KUMAR et al., 2020).

O biodiesel é classificado em três gerações, a depender da origem da matéria-prima utilizada: 1ª geração é derivada de óleos vegetais comestíveis (BARREIROS et al., 2020; NOGUEIRA et al., 2020); 2ª geração de óleos vegetais não comestíveis e óleos usados de cozinha (AGHEL et al., 2019; CHUNG et al., 2019; GAUR et al., 2020) e 3ª geração de algas e outros microrganismos (CHAMKALANI et al., 2020; YEW et al., 2019). Nos últimos anos registra-se um aumento no interesse em produzir biodiesel de 2ª geração, impulsionado

principalmente pelo objetivo de evitar uma disputa com o ramo alimentício (MURILLO et al., 2019; NORJANNAH et al., 2016). Ademais, a produção de biodiesel através de óleos vegetais não comestíveis gera empregos em áreas rurais (ATABANI et al., 2013).

A próxima seção contém uma breve apresentação de dados do cenário nacional de biodiesel, políticas de incentivos governamentais e as principais matérias primas utilizadas no Brasil para a produção de biodiesel.

3.2 BIODIESEL NO CENÁRIO NACIONAL

O biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira no ano de 2005, através da Lei 11.097/05 de 13 de janeiro de 2005, ela estabeleceu para todo o território nacional a obrigatoriedade da adição de 2% de biodiesel (B2) no óleo diesel (VIDAL, 2019). Em 2015, o Conselho nacional de Política Energética (CNPE), autorizou o uso e a comercialização voluntária de misturas com biodiesel, como uma quantidade superior ao percentual de sua adição obrigatória ao óleo diesel (ANP, 2018). Com o aumento da demanda e desenvolvimento de novas tecnologias o percentual de mistura aumentou dos 2% iniciais para 12% atualmente (ESTRADÃO, 2020), a perspectiva é manter um aumento gradual e alcançar a marca de 20% (AZEVEDO; LIMA, 2016).

Por possuir uma cadeia produtiva já consolidada a soja foi a oleaginosa selecionada para os primeiros anos de produção de biodiesel no Brasil (VIDAL, 2019). Atualmente o óleo de soja ainda representa cerca de 70% da matéria-prima empregada na produção de biodiesel no Brasil (VIDAL, 2019). A soja possui um baixo teor de óleo (18 – 20%) quando comparada com outras oleaginosas (mamona, dendê, girassol, pinhão manso, macaúba, canola, linhaça, gergelim (30 – 50 %)) (BONATO et al., 2000). A grande vantagem da soja é que não se produz soja para obter o óleo, o óleo de soja é consequência da demanda de farelo proteico, a matéria-prima da ração animal que alimenta o frango, o porco e o bovino confinado, produtores de carne, de ovos e de leite, cuja demanda aumenta constantemente, devido ao crescimento da economia e da renda per capita, principalmente dos países emergentes (DALL'AGNOL, 2007).

A produção de soja é concentrada nas regiões do Centro-Oeste e Sudeste (GAMEIRO et al., 2009). Entretanto, o Brasil possui um vasto território, com terra, clima e muitos recursos hídricos para gerar várias espécies de vegetais que podem ser utilizadas na produção de biodiesel e outros biocombustíveis (a citar, bioquerosene) (DA RÓS et al., 2014; RANUCCI et al., 2018; SAIFUDDIN et al., 2016; SUSANTO; EFENDI, 2020). Nesse cenário, o coco de babaçu é uma ótima opção para a produção de biodiesel na região nordeste.

3.3 ÓLEO DE BABAÇU

O coco de babaçu é um fruto da família das palmeiras da espécie *Attalea speciosa*, sendo nomeado cientificamente como *Orbignya oleífera* (PORRO, 2019). Trata-se de uma espécie de fruto presente na região conhecida como Mata dos Cocais (junção de três biomas: Cerrado, Caatinga e Amazônia), sendo encontrado em onze estados do país (CONAB, 2018). Contudo, as amêndoas de babaçu são majoritariamente produzidas no Maranhão, estado responsável por mais de 90% da produção brasileira (MACHADO; CHAVES; ANTONIASSI, 2006).

A composição física do fruto é composta por epicarpo (13%), mesocarpo (20%), endocarpo (60%) e amêndoas (7%) (PONTE, 2017). Mais de 60% das amêndoas são constituídas por óleo bruto que pode ser utilizado nos ramos farmacêuticos, limpeza, óleos láuricos e na produção de azeite (CARRAZZA; ÁVILA; SILVA, 2012). Todavia, independente do produto final, o mercado onde esse produto será inserido já é dominado por outros mais produtivos, de menor custo e mais conhecidos (CONAB, 2018). Essa não inserção no mercado leva o preço do óleo de babaçu ser baixo em relação aos custos para produzi-lo (CONAB, 2018). Neste contexto, cresce o interesse em empregar o óleo de babaçu na produção de biocombustíveis, a citar, biodiesel (DA RÓS et al., 2014; MOREIRA et al., 2020; PAIVA et al., 2013) e bioquerosene (LLAMAS et al., 2012; RANUCCI et al., 2018).

Além das questões econômicas, o babaçu mostra-se como uma excelente matéria-prima para a produção de biodiesel, por ser composto majoritariamente por AGLs saturados (Tabela 2), uma vez que um óleo rico em AGLs saturados pode resultar em um biodiesel de alta densidade, reduzindo propriedades como viscosidade e ponto de inflamação (CAVALCANTE et al., 2020; MORAES et al., 2020) e por possuir propriedades físico-químicas similares ao óleo de soja – que atualmente é a principal matéria-prima na produção de biodiesel no Brasil – (MOREIRA et al., 2020; PAULA et al., 2019). Tendo a sua implementação em escala industrial facilitada, por ser um produto que não compete com o mercado alimentício (CAVALCANTE et al., 2020; PAIVA et al., 2013).

Quando comparado com a mamona, outra oleaginosa com potencial uso para produção de biodiesel na região nordeste (VIDAL, 2019), o babaçu possui algumas vantagens, não é tóxico, a casca do coco pode ser utilizada na produção de carvão e artesanato, e a torta obtida após a extração do óleo pode ser utilizada como ração animal ou adubo orgânico (GIRASSOL, 2010).

3.4 HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Entre os diversos modos de produção de biodiesel, o mais comum é a transesterificação utilizando catalisadores básicos homogêneos (ABUKHADRA et al., 2020; ABUKHADRA; SAYED, 2018; NAVAS et al., 2018). Embora seja muito rápido e eficiente (BASUMATARY et al., 2021; SOARES DIAS et al., 2020), esse processo apresenta alguns problemas; requer altas temperaturas, o óleo utilizado na reação deve conter baixa quantidade de água e ser livre de AGLs para evitar a inativação dos catalisadores e a formação de sabões, o que reduz o rendimento de éster e dificulta a separação do glicerol (A. MUNOZ et al., 2012; MONTEIRO et al., 2021).

Uma alternativa com menos requisitos quanto a pureza do óleo é a catálise ácida, contudo, além de ser menos eficaz, demandar grande excesso de álcool e temperaturas mais altas ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) o processo causa a corrosão do equipamento utilizado (JACOBSON et al., 2008; MONTEIRO et al., 2021). Nesse cenário, uma alternativa seria a catálise enzimática (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; BAJAJ et al., 2010), uma vez que as enzimas podem catalisar tanto transesterificação como esterificação (HANSEN et al., 2020; WANG et al., 2014).

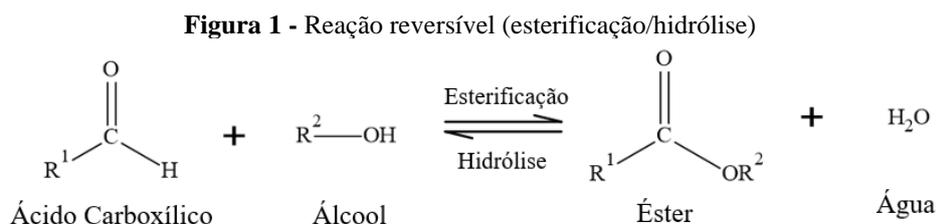
Entretanto, a reação de transesterificação apresenta alguns problemas, como a produção de glicerol, o que além de causar danos ao meio ambiente, resulta em um encarecimento do processo, uma vez que requer etapas adicionais (lavagem e purificação) (BAJAJ et al., 2010; LIMA et al., 2015); ademais quando catalisada por enzimas o glicerol causa efeitos negativos na estabilidade e atividade da lipase (XU et al., 2011).

A literatura aponta duas justificativas para esse fenômeno observado nas lipases na presença de glicerol, o primeiro afirma que o subproduto é adsorvido no suporte da lipase imobilizada, o que reduz a difusão do substrato hidrofóbico no sítio ativo da lipase (DOSSAT; COMBES; MARTY, 1999; GOFFERJÉ et al., 2014; SHIMADA et al., 2002), enquanto a segunda aponta uma competição entre o glicerol e substrato do álcool para ser ligado ao sítio ativo da lipase, tornando necessário o uso de excesso de álcool (BÉLAFI-BAKÓ et al., 2002; XU et al., 2011). Esses problemas podem ser resolvidos com o emprego da hidroesterificação enzimática na síntese do biodiesel, uma vez que apenas água é gerada como sub produto no processo (POURZOLFAGHAR et al., 2016; WANCURA et al., 2019).

Nessa técnica, o óleo (vegetal ou animal) é hidrolisado, os AGLs produzidos são purificados e na sequência esterificados, ambas reações são catalisadas por lipases. O sistema é isento de glicerina (COPPINI et al., 2019) e a esterificação, permite a utilização de óleos com altos valores de acidez, tornando possível a produção de biodiesel a partir de óleos que não

competem com a indústria alimentícia, como óleos de óleo de cozinha usado e gordura animal (HANSEN et al., 2020; HOSSEINI et al., 2019; VESCOVI et al., 2016).

A reação de esterificação entre um álcool e um ácido carboxílico é amplamente empregada pela indústria na produção de lubrificantes, tintas, solventes, aromas, fármacos, cosméticos e biocombustíveis (CHOWDHURY et al., 2014). A Figura 1 ilustra a reação de esterificação, assim como sua reação inversa, hidrólise.



Fonte: Autor.

3.5 ENZIMAS

As enzimas são biocatalisadores, biocompatíveis, biodegradáveis e derivam de recursos renováveis (microrganismos, bactérias, fungos e leveduras), sendo responsáveis por catalisar reações químicas e bioquímicas (BOURLIEU et al., 2020; SHELDON; VAN PELT, 2013). Nos últimos anos, vem crescendo o interesse pela catálise enzimática, já que as enzimas são altamente ativas em condições brandas de pH, temperatura e pressão, gerando uma economia de energia (LIU; DONG, 2020; RIOS et al., 2018; ZDARTA et al., 2017). Além disso, possuem alta especificidade e seletividade, o que ocasiona redução nos processos de purificação e evita a geração de subprodutos tóxicos (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; KLEINAITÉ et al., 2014).

Com isso, a biocatálise enzimática tem sido apontada como uma tecnologia viável e sustentável e, graças ao desenvolvimento de novas técnicas e tecnologias de engenharia enzimática, as enzimas tem sido utilizadas em processos industriais de diferentes áreas: alimentícia, médica, química, têxtil e de energia, por exemplo (BASSO; SERBAN, 2019; CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018).

Entre as enzimas mais utilizadas estão as lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) (HIRATA et al., 2016), que tem como função biológica catalisar a hidrólise de óleos e gorduras (ZECHNER et al., 2012). Entretanto, além da hidrólise, as lipases catalisam reações de acidólise, aminólise, esterificação, transesterificação e interesterificação, por exemplo (ZHONG et al., 2020), o que proporciona a aplicação de lipases em vários processos industriais, incluindo produtos farmacêuticos, agroquímicos, biolubrificantes, cosméticos, produção e degradação de biopolímeros, tratamento de águas residuais e síntese de biocombustíveis

(MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012; SHARMA; SHARMA; SHUKLA, 2011; TAN et al., 2010). A ampla gama de aplicações das lipases é graças suas propriedades únicas, por exemplo, é dispensável o uso de cofatores (BUSTO; GOTOR-FERNÁNDEZ; GOTOR, 2010), alta atividade e estabilidade em diversas condições reacionais (aquoso, anidro, solvente orgânico, solvente neutérico e em líquidos supercríticos), alta especificidade com vários substratos e sua enantiosseletividade (RIOS et al., 2018).

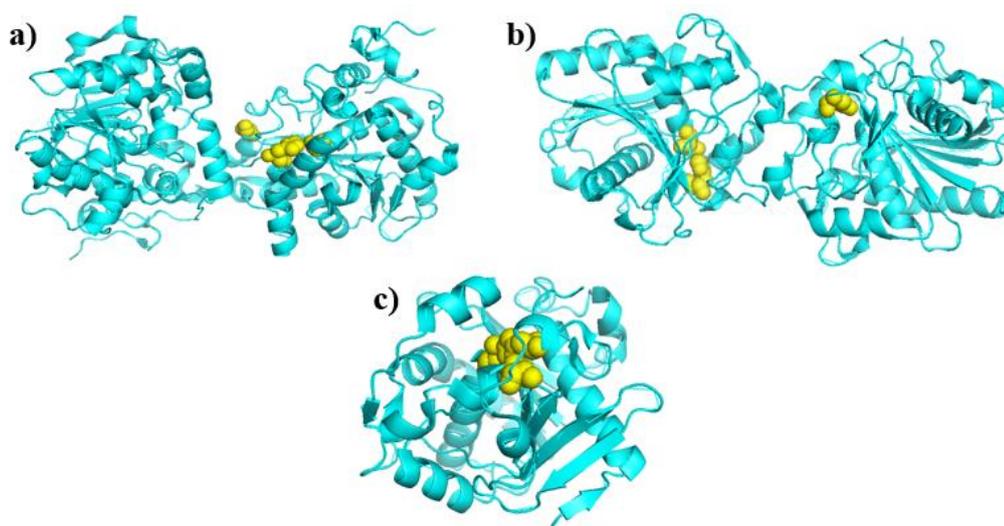
A lipase B de *Candida antarctica* (CALB) é produzida a partir da levedura basidiomicética *Candida antarctica* (AKANBI; BARROW, 2017; HØEGH et al., 1995). A CALB possui 317 aminoácidos (33 kDa, ponto isoelétrico 6,0 e pH ótimo 7,0) (LIMA et al., 2019); teve sua estrutura cristalina relatada pela primeira vez em 1994 (UPPENBERG et al., 1994). O sítio ativo da CALB consiste dos resíduos de aminoácidos Ser105, Asp187 e His224, a tríade catalítica típica para hidrolases (LIMA et al., 2019); a estrutura tridimensional e o sítio ativo da CALB são apresentados na Figura 2 (a). Essa lipase é comercializada na forma imobilizada em uma resina acrílica macroporosa (Novozym® 435) (HÖCK et al., 2018). A CALB possui uma tampa pequena que, quando fechada não permite a passagem dos substratos para o sítio ativo, tornando a lipase inativa (GANJALIKHANY et al., 2012). CALB é a enzima mais utilizada em biocatálise, com aplicações em setores diversos da indústria (cosméticos, alimentos, bebidas, fármacos, e biocombustíveis) (DE MIRANDA; MIRANDA; DE SOUZA, 2015; GOTOR-FERNÁNDEZ; BUSTO; GOTOR, 2006; MOUAD et al., 2016).

A lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (anteriormente *Humicola laguginosa*) possui 269 aminoácidos (31,7 kDa, ponto isoelétrico 4,4 e pH ótimo 9,0) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; RODRIGUES et al., 2009). Seu sítio ativo é formado pela tríade catalítica Ser146, His258 e Asp201 (DAS; KARMAKAR; BALASUBRAMANIAN, 2016; SKJOLD-JØRGENSEN et al., 2014); a estrutura tridimensional e o sítio ativo da TLL são apresentados na Figura 2 (b). A TLL é comercializada na forma solúvel (*Lipolase*®) e na forma imobilizada (*Lipozyme TL IM*®) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010), esta lipase tem como característica alta estabilidade térmica, sendo capaz de manter alta atividade sob 55-60°C (FERNANDES et al., 2004). Possui aplicações em diversas áreas industriais, desde a produção de biodiesel até química fina (DANTAS et al., 2019; WANCURA et al., 2018; ZHANG et al., 2015).

A lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) (anteriormente *Mucor miehei*) são proteínas extracelulares de origem fúngica, composta por 269 aminoácidos (31,6 kDa, ponto isoelétrico 3,8 e pH ótimo 7,0) (DEREWENDA; DEREWENDA, 1991; MOHAMMADI et al., 2015; OLIVEIRA, 2012), foi descrita pela primeira vez no ano de 1973 (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b). RML é comercializada na forma solúvel (*Palatase 2000*

L) e imobilizada (*Lipozyme RM IM*), possui atividade muito alta e boa estabilidade sob diversas condições (solventes orgânicos anidros, fluidos supercríticos, etc) (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b). A RML possui uma tampa que é composta por uma hélice de 15 aminoácidos dos resíduos 82 a 96, na qual os resíduos 83-84 e 91-95 são dobradiças, a abertura da tampa expõe o bolso de encadernação, que tem o formato de uma tigela rasa (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998). Seu sítio ativo é formado pela tríade catalítica Ser144, His257 e Asp203 (BRZOZOWSKI et al., 1991; ZHANG et al., 2013). A estrutura tridimensional e o sítio ativo da RML são apresentados na Figura 2 (c). A RML foi produzida para uso na indústria alimentícia, entretanto atualmente é empregada em diversos campos, da química orgânica a produção de biocombustíveis (CALERO et al., 2019; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a; ZHONG et al., 2019).

Figura 2 – Representação da estrutura tridimensional das lipases: a) lipase B de *Candida antarctica* (CALB) (código PDB: 4K6G) com tríade catalítica Ser105, Asp187 e His224. b) lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (código PDB: 1DT3) com tríade catalítica Ser146, His258 e Asp201. c) *Rhizomucor miehei* (RML) (código PDB: 3TGL) com tríade catalítica Ser144, His257 e Asp203. Todas as estruturas tridimensionais foram obtidas com o auxílio da Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês, Protein Data Bank) e PyMol 2.2.2.



Fonte: Autor.

3.6 COMBI-LIPASE

Em reações com triglicerídeos e AGLs, tal como, hidrólise, transesterificação e esterificação, as lipases apresentam diferentes especificidades de substrato (POPPE et al., 2018a). Ou seja, cada lipase possui uma região-especificidade (especificidade com relação à posição dos triglicerídeos), além de uma faixa de comprimento da cadeia de hidrocarbonetos do triglicerídeos ou AGLs em que a lipase possui maior atividade (KAPOOR; GUPTA, 2012; TONGBORIBOON; CHEIRSILP; H-KITTIKUN, 2010); CALB, por exemplo, geralmente mostra uma alta atividade em ácidos graxos de cadeia curta e média (em torno de C13)

(PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998), enquanto a CALA apresenta uma preferência por ácidos graxos de cadeia longa (C18) (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2005).

Quanto a região-especificidade, existem lipases com especificidade sn-1,3, que hidrolisa ligações éster nas posições sn-1 e sn-3, por exemplo, RML e TLL, as que possuem mais afinidade com a posição sn-2 como a lipase A de *Candida antarctica* (CALA) e as não região-específicas, que performam nas três posições, como é o caso da CALB (ALVES et al., 2014; POPPE et al., 2018b; ROGALSKA et al., 1993).

Por mais que a alta seletividade e a especificidade do substrato das lipases sejam uma vantagem quando comparado aos catalisadores químicos, uma vez que evita a produção de subprodutos indesejados (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; KLEINAITÉ et al., 2014). A especificidade da enzima para uma categoria de triglicerídeos/AGLs pode resultar em baixas conversões (PETERSEN et al., 2001), uma vez que a maioria dos óleos utilizados são substratos muito complexos e heterogêneos, compostos por uma variedade de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres (ISSARIYAKUL; DALAI, 2014).

Logo, é possível que a lipase catalise efetivamente os principais componentes de um determinado óleo, entretanto é provável que a lipase não reconheça o substrato desejado ou até mesmo seja inibida por outros componentes do óleo, resultando em baixas taxas de conversão (MONTEIRO et al., 2021). Nesse sentido, visando a otimização do processo, emprega-se uma mistura de lipases com diferentes especificidades, denominada de combi-lipase (ALVES et al., 2014).

3.7 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Mesmo possuindo todas as vantagens que foram citadas na seção anterior, a aplicação das enzimas nas formas livre ou solúvel na indústria enfrenta alguns empecilhos, quais como, a falta de estabilidade operacional a longo prazo e a dificuldade de efetuar a recuperação e reutilização desses biocatalisadores (BARBOSA et al., 2015). Tais inconvenientes podem ser solucionados através do emprego da imobilização enzimática, uma vez aplicada, a técnica adequada facilitará a recuperação do biocatalisador, minimizando ou eliminando a contaminação do produto, além de tornar possível a reutilização (viabilizando economicamente o processo), outros ganhos são: melhor estabilidade operacional e de armazenamento, maior resistência a variações pH e temperatura (LIU; DONG, 2020; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Em suma, a imobilização enzimática é o aprisionamento de enzimas em suportes sólidos insolúveis, produzindo um catalisador heterogêneo (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). Para obter uma imobilização eficiente, três fatores devem

ser considerados: a técnica que será empregada, as propriedades do suporte e o mecanismo reacional (BARBOSA et al., 2013).

Geralmente as enzimas são imobilizadas pelos métodos de aprisionamento (DU et al., 2017), adsorção (GARCIA-GALAN et al., 2011; TAVARES et al., 2015), ligação covalente (WANG et al., 2001) e *cross-linking* (YANG et al., 2020). Os métodos são classificados como físicos e químicos, nos métodos de adsorção e aprisionamento não ocorre ligação covalente entre as moléculas da enzima e o suporte, por isso são atribuídas como técnicas físicas; já ligação covalente e *cross-linking* são métodos químicos, pois a enzima é imobilizada no suporte por ligação covalente (LIU; DONG, 2020).

Uma desvantagem dos métodos físicos (interações hidrofóbicas e van der Waals, por exemplo), é que geralmente a ligação física é muito fraca para manter fixada a enzima no suporte sob condições rigorosas encontradas nas indústrias como altas concentrações de reagentes e produtos, e alta força iônica (SHELDON; VAN PELT, 2013).

A imobilização por ligação covalente se dá através de reações químicas entre o suporte sólido e a parte da enzima que possui cadeias de aminoácidos, como: lisina, cisteína, por exemplo, ou resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico (BONAZZA et al., 2018). Por ser mais forte a ligação covalente previne a desagregação da enzima do suporte, o que aumenta a estabilidade da enzima imobilizada (CANTONE et al., 2013). Contudo, esta técnica tem como desvantagem que, em caso de desativação da enzima, tanto a enzima quanto o suporte se tornam inutilizáveis, uma questão a ser considerada, frente ao preço dos suportes (SHELDON; VAN PELT, 2013).

O desenvolvimento de novas tecnologias e técnicas faz a imobilização enzimática ser considerada o principal meio de tornar possível o emprego de enzimas em larga escala, uma vez que viabiliza economicamente o processo através do reuso das enzimas (LIU; CHEN; SHI, 2018). A aplicação das enzimas imobilizadas pode ser observada nas indústria farmacêutica, alimentícia, bebidas, têxtil e biocombustíveis (BASSO; SERBAN, 2019).

3.8 TECNOLOGIA DE ULTRASSOM

A imobilização produz um biocatalisador heterogêneo, gerando uma necessidade de mais energia para uma maior transferência de massa e maior taxa de conversão (BANSODE; RATHOD, 2017). Esse problema pode ser contornado com a aplicação da tecnologia do ultrassom. Ultrassom é a energia sonora em frequências acima do intervalo que é audível para os seres humanos (> 20 kHz) e que necessita de um meio para se propagar (WANG et al., 2018b).

Quando o ultrassom passa por um meio líquido, os ciclos consecutivos de compressão e rarefação das ondas sonoras causam vibração mecânica do líquido, esse processo gera um fenômeno denominado de cavitação, que compreende a formação, ampliação e colapso de bolhas, que, quando ocorre perto da fase limite de dois líquidos imiscíveis, pode fornecer uma agitação muito eficiente, facilitando a transferência de massa (BANSODE; RATHOD, 2014, 2017). O acúmulo de energia ultrassônica ocorre nas bolhas oscilantes e durante o processo de crescimento e implosão há elevação eminente da temperatura e energia locais (em torno de 5000 K) e pressão (em torno de 1000 bar) (SUSLICK; PRICE, 1999).

A cavitação também proporciona efeitos químicos. O colapso das bolhas de cavitação pode dissociar moléculas de água e oxigênio dissolvido, criando radicais livres altamente reativos, -OH e -OOH (PANG; ABDULLAH; BHATIA, 2011). Algumas vantagens do ultrassom em reações catalisadas por enzimas podem ser resumidas como: minimização do tempo de reação, redução das quantidades de reagentes, aumento do rendimento, além de ser uma tecnologia “verde” e economizar energia (LERIN et al., 2014; SOARES et al., 2020; WANG et al., 2018b). Podendo ser aplicada nas indústrias de biotecnologia e bioquímica (BANSODE; RATHOD, 2017).

3.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental consiste em experimentos que devem ser realizados para determinar a influência variáveis independentes sobre as respostas desejadas, que é fundamental para a obtenção de resultados confiáveis, viabilizando análises estatísticas consistentes e a otimização de processos (LEARDI, 2009). Anteriormente, a otimização era realizada através de uma abordagem clássica, alterando uma variável de cada vez e mantendo as demais variáveis constantes. Essa metodologia demanda muito tempo e grandes conjuntos de dados experimentais, além de ficar aquém de mostrar a interação entre as variáveis do processo (CHOWDHURY et al., 2014).

3.9.1 Misturas

O planejamento de misturas é um tipo especial da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM, do inglês, *Response Surface Methodology*), em que os fatores são os componentes de uma mistura e a resposta varia conforme as proporções dos fatores variam; ou seja, a resposta é afetada pela variação das proporções dos fatores (BURUK SAHIN; AKTAR DEMIRTAŞ; BURNAK, 2016). Com isso, é possível analisar quais fatores somados resultam na melhor resposta (LI et al., 2019). Para tanto, deve-se considerar os seguintes aspectos: o número de fatores e interações a serem estudados, a complexidade de cada projeto, a validade

estatística e a eficácia de cada projeto e a facilidade de implementação e as restrições de custo e tempo associadas a cada análise (BURUK SAHIN; AKTAR DEMIRTAŞ; BURNAK, 2016).

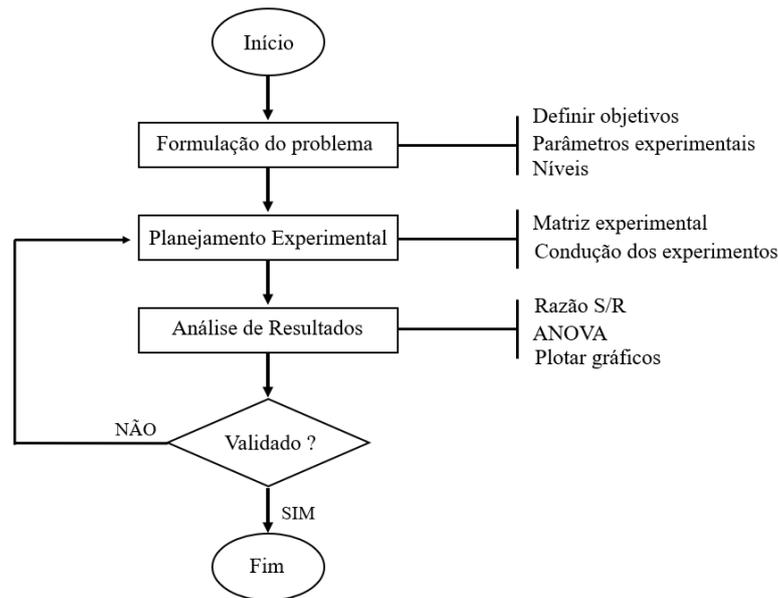
O planejamento de misturas é aplicado nas indústrias de tintas, vidro, químicas, polímeros e alimentícia (BURUK SAHIN; AKTAR DEMIRTAŞ; BURNAK, 2016). Nos últimos anos, o método vem sendo amplamente aplicado em processos catalisados por lipases para a modificação de óleos, visando determinar a melhor combinação para um determinado substrato, tanto em reações de hidrólise (ALVES et al., 2014; SOUZA et al., 2020) quanto em reações de esterificação (ROCHA et al., 2020; YÜCEL; DEMIR, 2012).

3.9.2 Taguchi

O método de matriz ortogonal Taguchi foi desenvolvido pelo engenheiro japonês Dr. Genichi Taguchi (PRASAD; RAO; RAO, 2012), visa determinar as configurações ótimas dos parâmetros de entrada, desprezando a variação causada por fatores incontroláveis ou fatores de ruído (MOHAN et al., 2009; PRASAD; RAO; RAO, 2012).

O método Taguchi é caracterizado por considerar vários parâmetros em simultâneo, e ter os efeitos importantes facilmente identificados, o que diminui consideravelmente o número de experimentos necessários para a otimização do processo em comparação com RSM, por exemplo (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013; CHOWDHURY et al., 2014; KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018b). Isso torna a abordagem do Taguchi mais eficaz, em escala industrial, sua aplicação reduzir significativamente o tempo do ciclo de desenvolvimento de produtos, tanto para o projeto quanto para a produção, reduzindo custos e aumentando o lucro (ZHANG; CHEN; KIRBY, 2007). As vantagens do método assim como sua aplicação em processos bioquímicos foram amplamente reportadas na literatura (BALLANTYNE; VAN OORSCHOT; MITCHELL, 2008; JAHANSHAHI; SANATI; BABAEI, 2008; KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018b; MOHD HUSSIN; ATTAN; WAHAB, 2020).

A implementação do método Taguchi é ilustrada através de um fluxograma apresentado na Figura 3. O passo 1 é a formulação do problema, em que serão definidos os objetivos, parâmetros experimentais e os níveis desses parâmetros. O passo 2 envolve projetar e conduzir experimentos. O passo 3 lida com a análise dos resultados – razão sinal-ruído (S/R), análise de variação (ANOVA, do inglês, *analysis of variance*) –, gráficos de respostas e determinação do ponto ótimo). O último passo é a validação do ponto ótimo, caso o experimento não seja validado, faz-se necessário realizar novamente os experimentos (YUSOFF; RAMASAMY; YUSUP, 2011).

Figura 3 – Fluxograma do método Taguchi

Fonte: Autor (adaptado de Yusoff, 2010).

Os dados obtidos nos experimentos são analisados por meio da razão sinal-ruído (S/R) e ANOVA (KUALITAS, 2015). O cálculo da razão S/R depende dos resultados obtidos nos experimentos, como pode ser visto na Equação 3 (CHOWDHURY et al., 2014). Pela análise da razão S/R, o nível ideal de cada parâmetro com o conjunto otimizado de parâmetros que alcançam o maior rendimento é verificado. Logo, a combinação ideal dos parâmetros que controlam o processo pode ser prevista (KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018b; MOHD HUSSIN; ATTAN; WAHAB, 2020). Contudo, através da análise da relação S/R não é possível identificar a contribuição de cada um dos fatores para a reação. Essa limitação é contornada com a análise da ANOVA (KUMAR; CHARY; DASTIDAR, 2015). Em outras palavras, a ANOVA é utilizada para determinar os parâmetros do processo que são significativos do ponto de vista estatístico (KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018b).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O óleo residual refinado de babaçu foi adquirido no mercado local (Redenção, Ceará, Brasil). As lipases imobilizadas comerciais *Rhizomucor miehei* (RML, *Lipozyme* RM-IM), *Thermomyces lanuginosus* (TLL, *Lipozyme* TL-IM) e lipase B de *Candida antarctica* (CALB, Novozyme 435) foram obtidas da Novozymes (Alcobendas, Espanha). O álcool utilizado foi o etanol (P.A. 99,96%) da Dinâmica (São Paulo, São Paulo, Brasil). Todos os reagentes de grau analítico foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil) e da Vetec (São Paulo, Brasil). Para a elaboração do planejamento experimental de misturas e taguchi, foi utilizado o *software* Statistica® 10 (Statsoft, Tulsa, EUA).

4.2 CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE ULTRASSOM

O equipamento utilizado foi um banho ultrassônico (Unique Inc., modelo USC 2800A, Brasil). O equipamento apresenta o volume de 9,5 L com as seguintes dimensões: 300 × 240 × 150 mm (comprimento × largura × altura). A frequência ultrassônica foi de 37 kHz e a potência ultrassônica total de 300 W. Ademais, o equipamento possui controle de temperatura.

4.3 MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata. Os resultados são apresentados como a média aritmética desses valores e o desvio padrão (geralmente abaixo de 5%).

4.3.1 Análise por cromatografia a gás dos ácidos graxos

Para determinar a composição química dos ácidos graxos do óleo de babaçu, realizou-se a análise de cromatografia gasosa no Laboratório de Referência em Biocombustíveis Professor Expedito José de Sá Parente (LARBIO), localizado na Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás com detector por ionização de chama (CG – FID) da marca VARIAN e modelo 450 – GC, com uma coluna capilar CP – WAX 52. As dimensões da coluna foram: 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme líquido. Na Tabela 1, estão apresentadas as condições operacionais do cromatógrafo. A concentração dos ácidos graxos em percentagem é determinada por normalização com cálculos descritos (LUTZ, 2008). Para identificar cada ácido graxo é feita uma comparação entre os tempos de retenção do ácido graxo e do padrão 1.000 mg/L. A quantificação é feita pelo cálculo com fatores de conversão, Equação 1.

$$\frac{(K' \text{ AGi} * \%AAGi)}{\sum(KAGi * \%AAGi)} * L * FCv \left(\frac{g}{100g} \text{ da amostra} \right) = CONCagi \quad (1)$$

Onde: CONC_{agi} = Concentração do ácido graxo em g/1000g da amostra; %AAG_i = Porcentagem de área do ácido graxo no cromatograma da amostra; K'AG_i = Fator de correção de resposta de cada ácido graxo com relação ao ácido palmítico C16:0; FC_v = Fator de correção de gordura para ácidos graxos; L = Teor de lipídios na amostra em g/100g da amostra.

Tabela 1– Condições de operação do cromatógrafo

Parâmetros	Valores
Temperatura Inicial de Forno	120°C
Temperatura Final de Forno	250°C
Detector	Ionização de Chama (FID)
Gás de arraste	Nitrogênio
Fluxo do gás de arraste	1,0 mL/min
Modo de injeção	Split (1:10)
Volume de injeção	1 µL
Temperatura de injetor	250°C
Temperatura de detector	280°C
Rampa	70°C aumentando para 240°C, mantida por 10 min, 5°C/min

Fonte: MOREIRA (2020).

4.3.2 Cálculo da Massa Molar do óleo de Babaçu

A partir da análise por cromatografia a gás dos ácidos graxos foi possível realizar o cálculo da massa molar média do óleo de babaçu. O conhecimento da massa molar do óleo é necessário, pois é a partir desse valor que serão determinadas as condições das reações utilizadas na produção dos ésteres etílicos, pois alguns parâmetros como a adição de catalisador e álcool ao meio reacional, são calculados com base na relação estequiométrica da massa molar do óleo e esses parâmetros. O cálculo para a determinação da massa molar é apresentado na Equação 2, e foi adaptado de Santos (2008) e Mano (1987).

$$MM_{\text{óleo}} = \frac{\sum(\% \text{molar do ácido graxo} * MM_{\text{ácido graxo}})}{\sum \% \text{molar do ácido graxo}} \quad (2)$$

Onde: MM_{óleo} = Massa Molar média do óleo (g/mol); % molar do ácido graxo = Percentual molar dos ácidos graxos contidos no óleo; MM_{ácido graxo} = Massa Molar dos ácidos graxos.

4.3.3 Hidrólise Enzimática do óleo de babaçu

Os ácidos graxos livres (AGLs) para esterificação foram obtidos através de hidrólise enzimática do óleo de babaçu utilizando a lipase B de *Candida antarctica* (CALB,

6,55 mg/mL). Antes da hidrólise enzimática, o óleo foi filtrado para remover todas as impurezas presentes. A reação foi iniciada pela adição de 5% de biocatalisador (referente ao peso do óleo), em um Erlenmeyer de 300 ml. As condições reacionais foram: 3 horas, 40°C, 7.5:1 (água: óleo) e 240 rpm.

4.3.4 Combi-lipase

A fim de determinar a melhor combinação de lipases para síntese de biodiesel, empregou-se as lipases RML, TLL e CALB, ademais, um planejamento de mistura de três fatores foi realizado com auxílio do *software* Statistica® (Statsoft, EUA). Todas as reações ocorreram sob as seguintes condições: razão molar de 1: 1 (água / álcool), 5% de biocatalisador (calculado com base na massa dos AGL), 30 ° C, por 1,5 hora. As reações foram conduzidas em incubadora de agitador orbital a 200 rpm.

Após o tempo de reação específico, o índice de acidez foi determinado para cada amostra. Para tanto, alíquotas de 0,2 g foram retiradas do volume da reação, diluídas em 5 mL de álcool etílico e 3 gotas de fenolftaleína e posteriormente tituladas com hidróxido de sódio (0,1M) (CAVALCANTI et al., 2018), com algumas modificações. O índice de acidez (IA) foi estabelecido de acordo com a Equação 3.

$$IA \text{ (mgNaOH/g)} = MM_{\text{NaOH}} \times III_{\text{NaOH}} \times f \times \left(\frac{V_{\text{NaOH}}}{m} \right) \quad (3)$$

Onde MM_{NaOH} (g/ mol) é a massa molar de NaOH; III_{NaOH} (mol / L) é a molaridade da solução de NaOH; f é o fator de correção determinado pela padronização de NaOH; V_{NaOH} (mL) é o volume de NaOH gasto na titulação; e, m (g) é a massa da amostra a ser analisada.

A conversão dos AGLs em ésteres foi calculada pela Equação 4, considerando a acidez no tempo zero (IA_0) e no tempo t (IA_t).

$$\text{Conversão AGL(\%)} = \frac{IA_0 - IA_t}{IA_0} \times 100 \quad (4)$$

4.3.5 Otimização da produção de biodiesel (Taguchi)

Para este estudo, o planejamento experimental Taguchi com uma matriz ortogonal padrão L9 (o "L" e "9" representam o quadrado latino e o número de experimentos, respectivamente) foi utilizado para examinar quatro fatores em três níveis para otimizar a produção de biodiesel a partir dos AGLs oriundos do óleo de babaçu. A Tabela 2 mostra os quatro parâmetros independentes (biocatalisador, razão molar, temperatura e tempo) e seus níveis correspondentes. Os níveis dos parâmetros foram determinados com base em experimentos laboratoriais preliminares.

Tabela 2 – Fatores independentes e seus respectivos níveis para produção de AGL

Níveis	Biocatalisador (%)	Razão Molar	Temperatura (°C)	Tempo (h)
N1	5	1:1	40	1,5
N2	10	1:7	50	3
N3	15	1:13	60	4,5

Fonte: Autor.

Foi utilizado o *software* Statistica® 10 (Statsoft, EUA), para delineamento experimental e análise estatística. A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento experimental, os valores médios de conversão e as relações S/R calculadas para cada ponto. Os valores da razão S/R correspondentes às conversões foram calculados, usando as características "larger-the-better", uma vez que o objetivo do trabalho é maximizar a variável de resposta (conversão). O valor da razão S/R para cada execução foi calculado de acordo com a Equação 5.

$$\frac{S}{R} = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right) \quad (5)$$

Onde y é a conversão para o experimento correspondente, i é o número de repetições e n é o número de respostas para a combinação de níveis de fator em qualquer combinação paramétrica específica de acordo com a Tabela 2. A relação S/R prevista sob condições ideais para o processo para obter a atividade do biocatalisador foi estimado pela Equação 6.

$$\frac{S}{R_{previsto}} = \frac{\bar{S}}{R} + \sum_{j=1}^n \left(\frac{S}{R_j} - \frac{\bar{S}}{R} \right) \quad (6)$$

Onde \bar{S}/R é a média aritmética de todas as razões S/R, S/R_j é a razão S/R no ponto ótimo para cada fator e n é o número de fatores que afetam significativamente o processo.

Independentemente da categoria de relação S/R empregada, o nível ideal do parâmetro de projeto é o nível com a relação S/R mais alta. Logo, é possível otimizar cada um dos parâmetros de entrada selecionados e obter o conjunto de parâmetros para o melhor rendimento do biodiesel usando a análise da relação S/R (biodiesel). Entretanto, através da análise da relação S/R não é possível identificar a contribuição de cada fator sobre o rendimento. Essa limitação da análise da razão S/R pode ser superada através da ANOVA de acordo com as Equações 7-9.

$$\text{Contribuição do fator} = \frac{SSf}{SSt} \times 100 \quad (7)$$

Onde SSf é a soma dos quadrados dos fatores, e SSt é a soma total de quadrados de todos os parâmetros.

$$SSf = \sum_{j=1}^3 n \left[\left(\frac{s}{N} \right) fj - \left(\frac{s}{N} \right) t \right]^2 \quad (8)$$

Onde n é o número de experimentos no nível j do fator f e t é o total.

$$SSt = \sum_{i=1}^9 \left[\left(\frac{s}{N} \right) i - \left(\frac{s}{N} \right) t \right]^2 \quad (9)$$

4.3.6 Processo assistido por irradiação ultrassônica

O ponto ótimo da esterificação enzimática obtido por agitação mecânica foi aplicado para a produção em banho ultrassônico (37 kHz, 300 W) durante um tempo que variou de 0,75 a 4,5 horas.

4.3.7 Estabilidade operacional do biocatalisador

A estabilidade operacional foi verificada por reações consecutivas para a produção de biodiesel usando 10 % de biocatalisador (com a melhor combinação de lipases), as condições reacionais utilizado foi o ponto ótimo obtido através do planejamento taguchi. Antes de cada ciclo, a enzima foi separada do meio reacional por magnetização e lavada três vezes com hexano para remover produtos e substratos não reagidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE BABAÇU

Através dos resultados obtidos pela análise CG/ FID é possível observar que os ácidos graxos saturados compõem uma maior parcela do óleo residual de babaçu, com 81,67%, com destaque para o ácido láurico (41,55% do conteúdo total de ácidos graxos), enquanto ácidos graxos insaturados (monoinsaturados) representam apenas 12,8%, sendo 11,04 % correspondente ao ácido oleico. A Tabela 3 apresenta os percentuais dos AGLs na composição química do óleo de babaçu, obtidos por Moreira et al. (2020) e dois trabalhos reportados na literatura para comparação.

Tabela 3 – Percentuais dos ácidos graxos na composição química do óleo de babaçu. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".

Ácidos Graxos	Fórmula Molecular	Símbolo	Massa molar (g/mol)	(Moreira et al., 2020) (%)	(DA RÓS et al., 2014)	(DE OLIVEIRA et al., 2020)
Caprílico	C8H16O2	C8:0	114	9,64	4,54	3,79
Cáprico	C10H20O2	C10:0	172	6,85	4,25	5,42
Láurico	C12H24O2	C12:0	200	41,55	44,14	47,75
Mirístico	C14H28O2	C14:0	228	14,01	14,47	16,54
Palmítico	C16H32O2	C16:0	256	6,96	9,38	8,58
Estearíco	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	C18:0	284	2,66	4,40	3,45
Oleico	C18H34O2	C18:1n9c	282	11,04	14,04	12,00
Linoleico	C18H32O2	C18:2n6c	280	1,76	2,83	2,46
Outros			-	5,53	1,95	-
			∑SAT	81,67	81,18	85,54
			∑MON	12,8	16,87	14,46

SAT = Ácido graxo saturado; MON = ácido graxo monoinsaturado. Fonte: Autor.

Após determinar o perfil de ácidos graxos, foi possível calcular a massa molar para o óleo residual de babaçu, através da Equação 2. O valor encontrado para a massa molar foi de 210,91 g/ mol, Reipert (2005) também analisou a composição do óleo de babaçu, e obteve um valor de massa molecular próximo ao do presente trabalho (214,70 g/mol).

A análise da composição química do óleo de babaçu é fundamental pois através dela será possível compreender a melhor combinação de lipases obtida no planejamento triangular, considerando os principais AGLs que compõem o óleo utilizado e a especificidade de cada enzima. Ademais a percentagem de AGLs do óleo de babaçu permite o cálculo da massa molar deste óleo, é com base no valor encontrado que será determinado a quantidade de álcool e biocatalisador que serão adicionados ao meio reacional.

5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

5.2.1 Planejamento de mistura: Seleção da melhor combi-lipase para esterificação

A fim de determinar a melhor combinação, entre as lipases RML, TLL e CALB, para a síntese de biodiesel a partir de AGLs oriundos do óleo de babaçu, às três lipases imobilizadas foram testadas em reações de esterificação, sozinhas e combinadas, conforme planejamento triangular de misturas. Os resultados obtidos para o planejamento de mistura são apresentados na Tabela 4 e representados graficamente na Figura 4. Uma breve análise na Tabela 4 mostra que a maior conversão foi de 75,04% (ensaio 10), se deu na presença de 66,7% de CALB, 16,7% de TLL e RML. Além de compor 66,7% do biocatalisador que obteve a maior conversão, a CALB sempre esteve presente – seja sozinha ou combinada – nos ensaios com conversões mais altas (3, 5 e 6).

Tabela 4 – Planejamento triangular para a síntese enzimática de biodiesel. Meio reacional: razão molar de 1: 1 (AGLs/ álcool), 5% de biocatalisador (calculado com base na massa dos AGL), 30 ° C, por 1,5 hora. As reações foram conduzidas em incubadora de agitador orbital a 200 rpm. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".

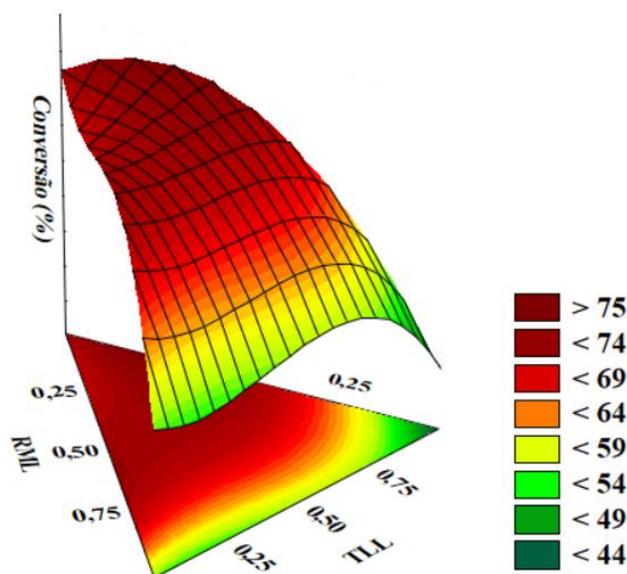
ENSAIO	RML	TLL	CALB	CONVERSÃO (%)
1	1,000	0,000	0,000	55,03 ± 0,01
2	0,000	1,000	0,000	43,25 ± 0,53
3	0,000	0,000	1,000	72,17 ± 0,64
4	0,500	0,500	0,000	56,16 ± 0,08
5	0,500	0,000	0,500	72,65 ± 0,08
6	0,000	0,500	0,500	72,74 ± 0,02
7	0,333	0,333	0,333	68,79 ± 0,28
8	0,667	0,167	0,167	67,28 ± 0,58
9	0,167	0,667	0,167	64,98 ± 0,53
10	0,167	0,167	0,667	75,04 ± 0,37

Fonte: Autor.

De acordo com a análise estatística, a melhor combinação de lipases para a esterificação dos AGLs extraídos do óleo de babaçu é uma mistura de 67,5% de CALB, 25% de TLL e 7,5% de RML. Portanto, essa mistura de biocatalisadores foi utilizada na otimização dos parâmetros de esterificação pelo método Taguchi.

As lipases utilizadas nesse estudo são classificadas em dois grupos quanto a régio-especificidade, TLL e RML são sn-1,3-específicas, ou seja, reagem majoritariamente com ligações éster nas posições sn-1 e sn-3; por sua vez a CALB é não-específica, atuando nas três posições (CASTIGLIONI et al., 2020; TIOSSO et al., 2014). Essa pode ser uma das explicações para a CALB compor a maior parcela da combinação obtida, por possui alta atividade catalítica nas 3 posições possíveis, é provável que esta lipase tenha sido capaz de catalisar mais AGL do que as demais.

Figura 4 – Superfície de resposta para o planejamento de mistura de para a síntese enzimática de biodiesel. Meio reacional: razão molar de 1: 1 (AGLs/álcool), 5% de biocatalisador (calculado com base na massa dos AGL), 30 ° C, por 1,5 hora. As reações foram conduzidas em incubadora de agitador orbital a 200 rpm. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".



Fonte: Autor.

Além da região-especificidade, as lipases possuem especificidade com relação ao tamanho da cadeia de ácidos graxos dos substratos (POPPE et al., 2018b), devido a conformação do sítio ativo e aos resíduos de aminoácidos que o rodeiam os quais podem ter cargas e grupos de reação diferentes, portanto suscetíveis às moléculas do substrato (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998). O sítio ativo da CALB para ácidos graxos é relativamente curto, portanto, normalmente ela possui alta atividade em ácidos graxos de cadeia curta e média (C6-C14) (CASTIGLIONI et al., 2020; PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998). Por outro lado, RML e TLL possuem um sítio ativo com preferência por cadeias de ácidos graxos mais longas (C16-C18) (POPPE et al., 2015).

Analisando a Tabela 3 é possível notar que cerca de 70% dos AGLs que compõem o óleo de babaçu são de cadeia pequena ou média (Caprílico C8:0 (9,64 %), Cáprico C10:0 (6,85%), Láurico C12:0 (41,55 %) e Mirístico C14:0 (14,01 %), nessa faixa a lipase CALB apresenta atividade alta mais do que as outras duas. Portanto, as maiores conversões obtidas nos experimentos com CALB e conseqüentemente a sua presença em maior quantidade na combinação de lipases ótima se justificam pela sua região-especificidade e especificidade quanto ao tamanho da cadeia de AGLs do substrato.

Além de otimizar o processo, a combinação de lipases torna possível um barateamento da produção de biodiesel, TLL e RML são consideravelmente mais baratas do

que CALB, logo a mistura é economicamente mais viável, quando comparada a utilização da CALB sozinha (CASTIGLIONI et al., 2020; LI et al., 2006). Poppe et al. 2018, estudou a melhor combinação de lipases (entre RML, TLL e CALB) na transesterificação do óleo de soja para a síntese de biodiesel, a combinação ótima foi 50% CALB, 27,5% RML e 22,5% TLL. Poppe et al. 2018 empregou o planejamento composto central (CCD, do inglês *central composite desing*) para otimizar os parâmetros da reação (razão molar (álcool: óleo, quantidade de biocatalisador e água adicionada), utilizando a combinação de lipases e o ponto ótimo dos parâmetros da reação foi possível alcançar 94,98% de conversão.

5.2.2 Taguchi - Análise de Variância (ANOVA) de esterificação e previsão de condições ótimas

A Tabela 5 apresenta as combinações dos fatores independentes em seus respectivos níveis, os valores de conversão obtidos assim como a relação S/R para a matriz de planejamento do Taguchi. A relação S/R foi calculada pela função “larger-the-better”, já que o objetivo é maximizar a conversão.

Tabela 5 – Matriz de planejamento Taguchi L9 e seus respectivos valores de conversão e as relações S/R. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".

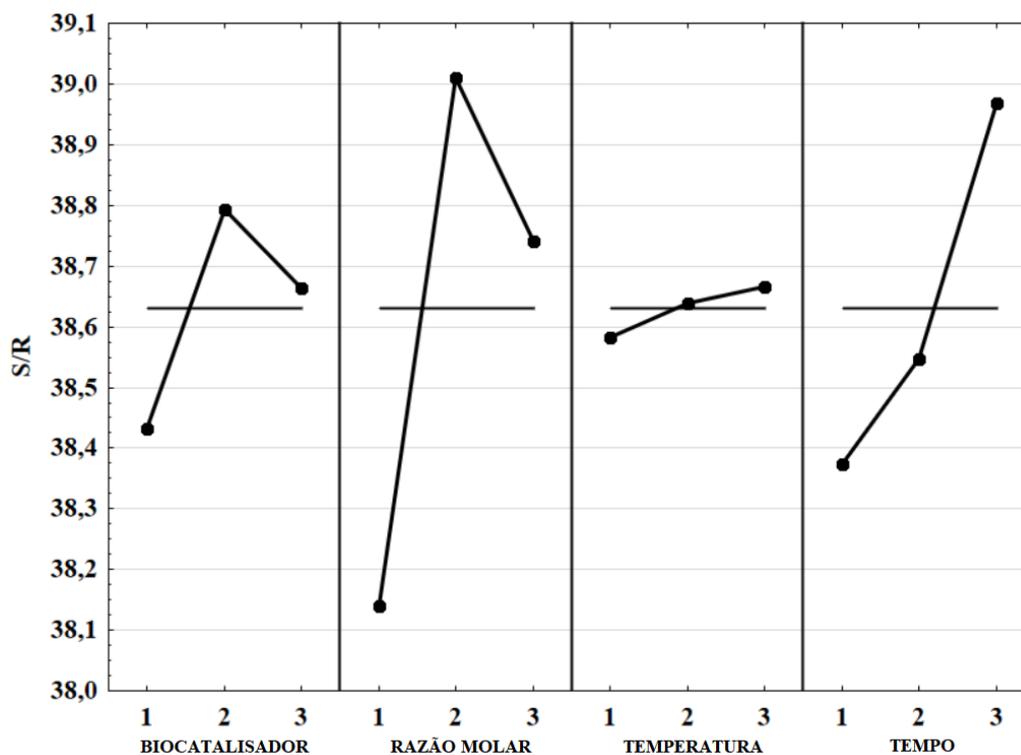
Ensaio	Biocatalisador (%)	Razão Molar (AGLs/Álcool)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Conversão (%)	S/R
1	5	1:1	40	1,5	76,20 ± 0,09	37,63
2	5	1:7	50	3,0	86,50 ± 0,03	38,74
3	5	1:13	60	4,5	88,31 ± 0,79	38,92
4	10	1:1	50	4,5	85,61 ± 0,70	38,65
5	10	1:7	60	1,5	88,65 ± 0,03	38,95
6	10	1:13	40	3,0	86,83 ± 0,03	38,77
7	15	1:1	60	3,0	80,61 ± 0,05	38,12
8	15	1:7	40	4,5	92,63 ± 0,02	39,33
9	15	1:13	50	1,5	84,41 ± 0,01	38,53

Fonte: Autor.

A maior conversão de AGL em ésteres é obtida pela maior relação S/R, o que sugere o melhor nível para cada variável independente. A razão S/R ótima prevista para as condições otimizadas foi calculada a partir da Equação 6. O valor obtido para a razão S/R ótima foi de 39,51. Com base neste valor foi calculado a conversão máxima teórica através da Equação 5, a conversão teórica sob condições ótimas é de 94,53%. A Figura 5 apresenta o melhor nível para cada parâmetro (aquele que possui maior razão S/N), logo observando a Figura 5 e a distribuição dos parâmetros e seus níveis, disponíveis na Tabela 2, temos o ponto ótimo da reação: N2 (10%) para biocatalisador, N2 (1:7) para razão molar, N3 (60°C) para temperatura

e N3 (4,5 horas) para tempo. A fim de validar a conversão teórica, realizaram-se experimentos em duplicata sob as condições ótimas, a conversão experimental foi de 93,58%.

Figura 5 – Gráfico de relação S/R para esterificação de AGLs oriundo do óleo de babaçu empregando a combinação de lipases obtida no planejamento experimental triangular de mistura. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".



Fonte: Autor.

O nível ótimo para a razão molar foi N2 (1:7), ou seja, a razão molar 1:7 (AGLs/álcool) foi suficiente para manter o equilíbrio da reação no lado do produto, retardando a hidrólise reversa. O presente parâmetro foi o que apresentou maior influência na reação, como pode ser visto na Figura 5 e na Tabela 6, com uma contribuição de 60,734% (Tabela 7).

O tempo de reação foi o segundo parâmetro mais influente na reação (Tabela 6), o nível ótimo para este parâmetro foi N3 (4,5 h), comprovando que um tempo reacional mais longo proporciona maior interação entre substrato e o biocatalisador, gerando conversões mais altas (ROCHA et al., 2020).

Maior concentração de biocatalisador tende a proporcionar maior interação entre o substrato e o sítio ativo da lipase, resultando em um aumento no rendimento da reação (WAGHMARE; RATHOD, 2016). Por outro lado, o acréscimo de biocatalisador não obrigatoriamente favorece a reação, uma vez que o seu excesso pode atuar como inibidor, gerando um desequilíbrio químico na formação de produto (GOLIČNIK; MASSON, 2019).

Nesse contexto, é compreensível o nível ideal para a quantidade de biocatalisador ter sido N2 (10%), possivelmente a presença de 15% de biocatalisador – referente a massa de AGLs utilizada – tenha iniciado limitações de difusão. Entretanto, a classificação dos parâmetros, mostra que este parâmetro foi apenas o terceiro entre as variáveis estudadas neste estudo com um delta de 0,359 (Tabela 6), não sendo estatisticamente relevante ($p\text{-valor} > 0,05$), contribuindo apenas 10,096% no processo (Tabela 7).

Embora a temperatura tenha sido o parâmetro de menor influência na reação (Tabela 6). A temperatura ideal para a reação, foi N2 (60°C). A esterificação de AGLs com um álcool é uma reação endotérmica, com isso altas temperaturas tendem a aumentar a energia cinética do sistema, resultando em melhores interações entre as partículas enzimáticas e os substratos, aumentando assim a taxa de reação (CHOWDHURY et al., 2014). Além disso, uma alta temperatura reduz a viscosidade do sistema, aumenta a solubilidade mútua e melhora a difusão dos substratos, reduzindo assim as limitações de transferência de massa, favorecendo o rendimento do produto (CHOWDHURY et al., 2014).

A classificação dos parâmetros (biocatalisador, razão molar, temperatura e tempo) com base nos valores de delta (a diferença dos valores da razão S/R entre os níveis mais altos e mais baixos dos fatores de processo) é mostrada na Tabela 6. Entre às quatro variáveis analisadas no presente estudo, a razão molar foi a que apresentou maior valor de delta (0,870), portanto é a variável independente que possui maior influência na reação. Por outro lado, o parâmetro que possui o menor valor de delta (0,085) e conseqüentemente o que menos influência na reação é a temperatura.

Tabela 6 – Tabela de resposta de relações S/R. Mais detalhes são fornecidos na seção Materiais e Métodos. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".

	Biocatalisador (%)	Razão Molar (AGLs/Álcool)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
L1	38,433	38,139	38,582	38,373
L2	38,792	39,009	38,639	38,547
L3	38,663	38,740	38,667	38,968
Delta	0,359	0,870	0,085	0,595
Ranking	3	1	4	2

Fonte: Autor.

A Tabela 7 apresenta os resultados da ANOVA, no intervalo de confiança de 95%. No ANOVA o impacto de qualquer parâmetro é explicado por seu f-valor e a soma dos quadrados correspondente (SS), quanto maior o f-valor de um parâmetro maior a sua contribuição para a variável dependente (conversão). O p-valor é utilizado para quantificar a probabilidade de o f-valor obtido ser influenciado por ruído; valores abaixo de 0,05 ou 5%

atestam a importância do parâmetro (KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018a). No presente estudo, a soma dos quadrados obtida para o modelo é 1,961, valor alto suficiente para ser considerado significativo.

Dentre os quatro parâmetros analisados, apenas dois afetam significativamente a conversão de AGLs, a razão molar foi a variável independente que mostrou maior influência com f-valor e soma dos quadrados 107,308 e 1,191, respectivamente, o p-valor desta variável foi de 0,009, ou seja, apenas 0,9 % de chance de os valores obtidos terem influência de ruído. A outra variável relevante para o processo foi o tempo com f-valor igual a 50,577, p-valor de 0,019. A contribuição de cada parâmetros para a conversão dos AGLs em ésteres foi 60,734% para razão molar e 28,610 para tempo e 10,096% para quantidade de biocatalisador.

Tabela 7 – Resultados de ANOVA para parâmetros que afetam a conversão de éster. O efeito fatorial insignificante é agrupado conforme mostrado {}. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".

Parâmetro	DF	SS	MS	f-valor	p-valor	Contribuição (%)
Biocatalisador	2	0,198	0,099	17,911	0,052	10,096
Razão Molar	2	1,191	0,595	107,308	0,009	60,734
Temperatura	{2}	{0,011}	-	-	-	-
Tempo	2	0,561	0,280	50,577	0,019	28,610
Erro	2	0,011	0,005			0,560
Total	8	1,961				100

DF = Grau de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = Quadrados médios. Fonte: Autor.

5.2.3 Regressão da equação do modelo (Modelagem matemática)

No presente estudo, a análise de regressão linear na ferramenta de software Minitab 9.0 foi usada para desenvolver os modelos matemáticos preditivos para a variável dependente (conversão) em função da porcentagem de biocatalisador, razão molar, tempo e temperatura, respectivamente. A equação do modelo obtida a partir da análise de regressão é mostrada na Equação 10.

$$\text{Conversão} = 71,84 + 1,11 * A + 2,85 * B + 2,88 * C + 0,32 * D \quad (10)$$

Onde: A é o biocatalisador (%), B é a razão molar, C é o tempo (horas) e D é a temperatura (°C). A equação permite prever e otimizar a conversão realizando os experimentos em qualquer conjunto paramétrico de condições dentro da faixa escolhida de parâmetros de processo.

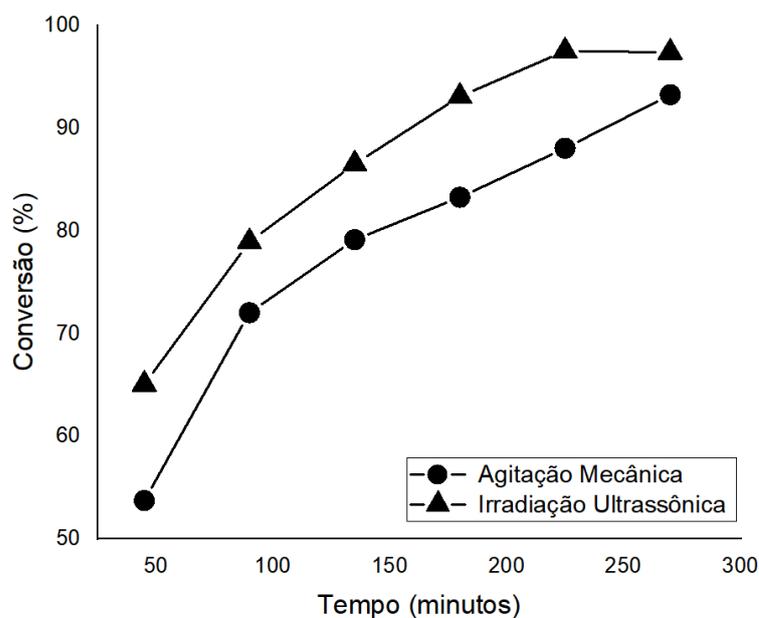
5.3 CURSO DA ESTERIFICAÇÃO

Após a determinação da condição ótima (60°C, 1:7, 4,5 horas e 10% de biocatalisador) para a síntese de biodiesel a partir de óleo de babaçu pelo planejamento experimental taguchi e validação experimental, afim de analisar a produção de biodiesel sob irradiação, estudou-se a

síntese de biodiesel com tempo variando de 45 a 270 minutos para a técnica de agitação mecânica (250 rpm) e irradiação ultrassônica (37 kHz e 300 W), as conversões obtidas são apresentadas na Figura 6.

Como apresentado na Figura 6, a melhor conversão para a técnica de agitação mecânica foi obtida após 270 minutos de reação ($93,27\% \pm 0,8\%$), sob irradiação ultrassônica foi possível alcançar conversão semelhante ($93,10 \pm 1,3\%$) após 180 minutos de incubação, provando a eficiência da técnica do ultrassom na produção de biodiesel via esterificação, por apresentar maiores conversões sob um tempo reacional menor. O melhor rendimento de conversão obtido para a técnica de irradiação ultrassônica se deu após 225 minutos ($97,53 \pm 0,7\%$).

Figura 6 – Conversão de biodiesel, sob agitação mecânicas e irradiação ultrassônica. Meio reacional: 10% de biocatalisador, 1:7 (álcool: ácido). As reações foram realizadas a 60 °C a 250 rpm para agitação mecânica ou 37 kHz e 300 W para técnica de ultrassom. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".



Fonte: Autor.

Yasvanthrajan (2020) estudou a produção de biodiesel através da transesterificação do óleo residual de algodão, a reação foi catalisada pela enzima *Rhizopus oryzae* na presença de irradiação ultrassônica. Com a aplicação da técnica do ultrassom a maior conversão obtida foi de 98,7 % após 6 horas de reação, com o mesmo tempo reacional sob agitação mecânica a conversão alcançada foi de apenas 63% (YASVANTHRAJAN et al., 2020). Ademais, o estudo demonstrou que a reação que foi realizada sob irradiação ultrassônica necessitou de condições reacionais mais amenas (menor razão molar (álcool: ácido), menor biocatalisador e menor temperatura) para atingir altas conversões (YASVANTHRAJAN et al., 2020).

Os resultados apresentados acima demonstram a eficiência da irradiação

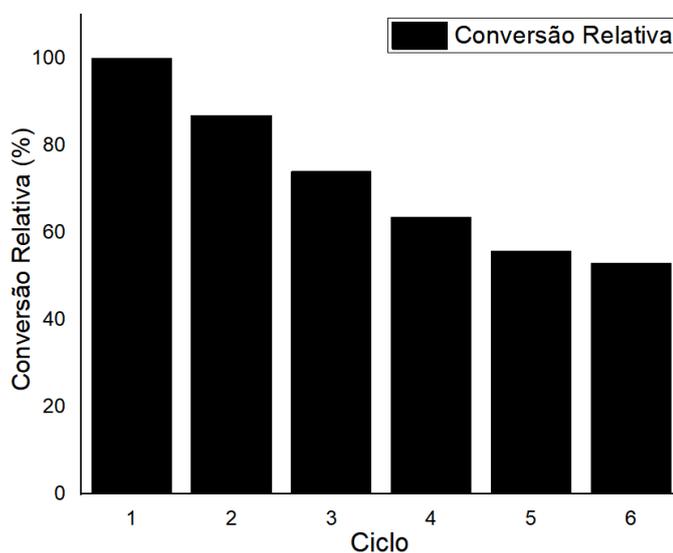
ultrassônica na síntese de biodiesel, quando comparada às técnicas tradicionais, esse fenômeno pode ser explicado pela cavitação gerada pelas ondas ultrassônicas, pois está produzindo condições supercríticas de temperatura e pressão, facilitando a transferência de massa, minimizando o tempo de reação e aumentando o rendimento (WANG et al., 2018a). Entretanto, altas frequências e potências podem ocasionar o rompimento da estrutura da enzima, gerando a desnaturação da mesma, por outro lado, baixas frequências e potências não resultarão no efeito desejável de cavitação (BANSODE; RATHOD, 2017).

5.4 ESTABILIDADE OPERACIONAL DO BIOCATALISADOR

A estabilidade operacional da melhor combinação de lipases (67,5% de CALB, 25% de TLL e 7,5% RML) foi avaliada para a síntese de biodiesel em condições otimizadas. Para tanto, foram realizados ciclos consecutivos de esterificação, conforme mostrado na Figura 7.

As enzimas são mais caras do que os catalisadores químicos. Portanto, para tornar possível aplicação em larga escala, as enzimas imobilizadas devem poder ser reutilizadas várias vezes, mantendo a estabilidade térmica e operacional (MONTEIRO et al., 2019).

Figura 7 – Estabilidade operacional do biocatalisador. Meio reacional: 10 % de biocatalisador (67,5% de CALB, 25% de TLL e 7,5% de RML), 1:7 (álcool: ácido). As reações foram realizadas por 200 minutos a 60 °C e a 300 rpm. Outras especificações estão descritas na seção "Materiais e Métodos".



Fonte: Autor.

Como mostrado na Figura 7, para a produção de biodiesel, a combinação de lipases alcançou cerca de 50% de conversão no ciclo 6. Souza *et al.*, (2020), analisou a estabilidade operacional de uma combinação de lipases (75 % RML e 25% CALB) em ciclos repetitivos de hidrólise do óleo de coco e obtiveram uma conversão de aproximadamente 40% após 4 ciclos de reutilização.

A CALB apresenta maior estabilidade, quando comparada com RML e TLL (SOUZA et al., 2020), portanto, pode-se justificar a maior estabilidade obtida no presente estudo frente ao obtido por Souza *et al.*, (2020) devido a maior porcentagem de CALB utilizada na análise.

Embora as enzimas sejam muito sensíveis às mudanças no ambiente, a imobilização de tais macromoléculas biológicas podem promover sua rigidificação, o que mantém a enzima ativa por mais tempo, permitindo reutilizações consecutivas (GUISÁN, 1988). Como é mostrado na Figura 7, nenhum dos biocatalisadores tem uma queda muito significativa na atividade após 4 ciclos consecutivos de esterificação.

6 CONCLUSÕES

O emprego do conceito de combinação de lipases na produção de biodiesel é uma alternativa promissora na produção desse biocombustível, uma vez que as enzimas são menos nocivas ao meio ambiente do que os catalisadores químicos e quando imobilizadas são facilmente reutilizadas; ademais a mistura de lipases de especificidade e seletividade diferentes gera um biocatalisador mais apropriado para o substrato (babaçu), solucionando baixas conversões por conta da complexidade do óleo.

Após determinar a melhor combinação de lipases (67,5% de CALB, 25% de TLL e 7,5% RML) a reação foi otimizada pelo planejamento experimental taguchi, sob condições otimizadas de produção (60 °C, 4,5 horas, 10 % de biocatalisador, e razão molar 1:7), foi possível obter uma conversão máxima teórica de 94,53%, esse valor foi validado experimentalmente, onde obteve-se uma conversão ótima experimental de $93,58 \pm 0,9\%$, o que mostra uma excelente correlação entre os resultados experimentais e os estatisticamente preditos.

Dentre as variáveis independentes analisadas, a razão molar (ácido graxo: álcool) apresentou maior influência na variável dependente (conversão de ésteres etílicos), com cerca de 60% de contribuição, a outra variável que foi estatisticamente significativa para a reação foi o tempo reacional com 28,61 % de contribuição.

Ademais, analisou-se a utilização da tecnologia do ultrassom na produção de biodiesel, graças as condições supercríticas geradas pela irradiação ultrassônica, foi possível obter valor semelhante ao maior valor obtido pela técnica de agitação mecânica tradicional ($93,10 \pm 1,3\%$) em menos tempo (180 minutos), 90 minutos a menos do que foi necessário para alcançar valor similar via agitação mecânica. Além disso, após 225 minutos de reação assistida por irradiação ultrassônica alcançou-se $97,53 \pm 0,7\%$ de conversão, ou seja, a tecnologia do ultrassom se mostrou eficaz tanto em reduzir o tempo reacional, quanto na maximização da conversão.

REFERÊNCIAS

- A. MUNOZ, R. A. et al. Biodiesel: Production, Characterization, Metallic Corrosion and Analytical Methods for Contaminants. In: **Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications**. [s.l.] InTech, 2012.
- ABUKHADRA, M. R. et al. Sonication induced transesterification of castor oil into biodiesel in the presence of MgO/CaO nanorods as a novel basic catalyst: Characterization and optimization. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 154, p. 108024, ago. 2020.
- ABUKHADRA, M. R.; SAYED, M. A. K⁺ trapped kaolinite (Kaol/K⁺) as low cost and eco-friendly basic heterogeneous catalyst in the transesterification of commercial waste cooking oil into biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 177, p. 468–476, dez. 2018.
- ACHARYA, N. et al. A comparative study of stability characteristics of mahua and jatropha biodiesel and their blends. **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, v. 31, n. 2, p. 184–190, abr. 2019.
- AGHEL, B. et al. Pilot-scale production of biodiesel from waste cooking oil using kettle limescale as a heterogeneous catalyst. **Renewable Energy**, v. 142, p. 207–214, nov. 2019.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67, nov. 2015.
- AKANBI, T. O.; BARROW, C. J. Candida antarctica lipase A effectively concentrates DHA from fish and thraustochytrid oils. **Food Chemistry**, v. 229, p. 509–516, ago. 2017.
- ALVES, J. S. et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. **RSC Adv.**, v. 4, n. 14, p. 6863–6868, 2014.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Influence of the reaction conditions on the enzyme catalyzed transesterification of castor oil: A possible step in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 366–374, nov. 2017.
- ANP. **Resolução normativa N° nº 17/2004 e Resolução ANP nº 734/2018**. Disponível em: <<https://www legisweb.com.br/legislacao/?id=274064>>. Acesso em: 9 dez. 2020.
- ARAKI, C. A. et al. Effects of a combination of lipases immobilised on desilicated and thiol-modified ZSM-5 for the synthesis of ethyl esters from macauba pulp oil in a solvent-free system. **Applied Catalysis A: General**, v. 562, p. 241–249, 2018.
- ARANSIOLA, E. F. et al. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 276–297, fev. 2014.
- ATABANI, A. E. et al. Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty

- acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 18, p. 211–245, fev. 2013.
- AZEVEDO, A.; LIMA, B. Biocombustíveis: desenvolvimento e inserção internacional. **Web of Science**, v. 2016, p. 77–100, 2016.
- BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9–14, jan. 2010.
- BALLANTYNE, K. N.; VAN OORSCHOT, R. A.; MITCHELL, R. J. Reduce optimisation time and effort: Taguchi experimental design methods. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 1, n. 1, p. 7–8, ago. 2008.
- BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of isoamyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1297–1303, ago. 2014.
- BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 503–529, set. 2017.
- BARBOSA, O. et al. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 12 ago. 2013.
- BARBOSA, O. et al. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435–456, set. 2015.
- BARREIROS, T. et al. Impact of biodiesel production on a soybean biorefinery. **Renewable Energy**, v. 159, p. 1066–1083, out. 2020.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, dez. 2019.
- BASUMATARY, S. et al. Utilization of renewable and sustainable basic heterogeneous catalyst from *Heteropanax fragrans* (Kesseru) for effective synthesis of biodiesel from *Jatropha curcas* oil. **Fuel**, v. 286, p. 119357, fev. 2021.
- BÉLAFI-BAKÓ, K. et al. Enzymatic Biodiesel Production from Sunflower Oil by *Candida antarctica* Lipase in a Solvent-free System. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 20, n. 6, p. 437–439, 11 jan. 2002.
- BINHAYEEDING, N. et al. Improvement of biodiesel production using waste cooking oil and applying single and mixed immobilised lipases on polyhydroxyalkanoate. **Renewable Energy**, v. 162, p. 1819–1827, dez. 2020.
- BONATO, E. R. et al. Teor de óleo e de proteína em genótipos de soja desenvolvidos após 1990. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2391–2398, 2000.
- BONAZZA, H. L. et al. Operational and Thermal Stability Analysis of *Thermomyces*

- lanuginosus Lipase Covalently Immobilized onto Modified Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 182–196, 29 jan. 2018.
- BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 66–80, mar. 2020.
- BOURLIEU, C. et al. Enzymes to unravel bioproducts architecture. **Biotechnology Advances**, p. 107546, abr. 2020.
- BRZOZOWSKI, A. M. et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 491–494, jun. 1991.
- BURUK SAHIN, Y.; AKTAR DEMIRTAŞ, E.; BURNAK, N. Mixture design: A review of recent applications in the food industry. **Pamukkale University Journal of Engineering Sciences**, v. 22, n. 4, p. 297–304, 2016.
- BUSTO, E.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4504, 2010.
- CALERO, J. et al. Rhizomucor miehei Lipase Supported on Inorganic Solids, as Biocatalyst for the Synthesis of Biofuels: Improving the Experimental Conditions by Response Surface Methodology. **Energies**, v. 12, n. 5, p. 831, 2 mar. 2019.
- CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262, 2013.
- CARRAZZA, L. R.; ÁVILA, J. C. C.; SILVA, M. L. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto e da Folha do Babaçu (Attalea spp.)**. 2. ed. Brasília-DF: ISPN, 2012. v. 2
- CASTIGLIONI, G. Z. et al. Production of volatile compounds by yeasts using hydrolysed grape seed oil obtained by immobilized lipases in continuous packed-bed reactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 8, p. 1391–1402, 21 ago. 2020.
- CAVALCANTE, F. T. T. et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, p. 119577, nov. 2020.
- CAVALCANTI, E. D. C. et al. Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Fuel**, v. 215, p. 705–713, mar. 2018.
- CHAKRABORTY, R.; ROYCHOWDHURY, D. Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 491–499, jan. 2013.

- CHAMKALANI, A. et al. A critical review on life cycle analysis of algae biodiesel: current challenges and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 134, p. 110143, dez. 2020.
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A.; DINU, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 238, 5 jun. 2018.
- CHING-VELASQUEZ, J. et al. Production and characterization of biodiesel from oil of fish waste by enzymatic catalysis. **Renewable Energy**, v. 153, p. 1346–1354, jun. 2020.
- CHOWDHURY, A. et al. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 783–789, jan. 2014.
- CHUNG, Z. L. et al. Life cycle assessment of waste cooking oil for biodiesel production using waste chicken eggshell derived CaO as catalyst via transesterification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101317, set. 2019.
- CONAB, C. N. DE A. **Boletim da sociobiodiversidade 3º trimestre de 2018**: 2. Brasília-DF: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/>>.
- COPPINI, M. et al. PRODUCTION OF METHYL ESTERS BY ENZYMATIC HYDROESTERIFICATION OF CHICKEN FAT INDUSTRIAL RESIDUE. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 923–928, jun. 2019.
- DA RÓS, P. C. M. et al. Biodiesel from babassu oil: Characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 313–320, jan. 2014.
- DALL'AGNOL, A. **Por que fazemos biodiesel de soja**. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/colunistas/convidado/porque-fazemos-biodiesel-de-soja>>. Acesso em: 29 dez. 2020.
- DANTAS, A. et al. Potential application of *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) immobilized on nonporous polystyrene particles. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 38, n. 2, p. 608–613, 22 mar. 2019.
- DAS, S.; KARMAKAR, T.; BALASUBRAMANIAN, S. Molecular Mechanism behind Solvent Concentration-Dependent Optimal Activity of *Thermomyces lanuginosus* Lipase in a Biocompatible Ionic Liquid: Interfacial Activation through Arginine Switch. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 45, p. 11720–11732, 17 nov. 2016.
- DE MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; DE SOUZA, R. O. M. A. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 372–393, set. 2015.

- DE OLIVEIRA, U. M. F. et al. Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts' Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase onto Chitosan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1263–1285, 10 abr. 2018.
- DE OLIVEIRA, V. F. et al. Fatty acid alkyl esters obtained from babassu oil using C1–C8 alcohols and process integration into a typical biodiesel plant. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 160, p. 224–232, ago. 2020.
- DEREWENDA, Z. S.; DEREWENDA, U. Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 69, n. 12, p. 842–851, 1 dez. 1991.
- DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. et al. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1–6, p. 36–46, dez. 2005.
- DOS SANTOS, J. C. S. et al. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Advances**, v. 5, n. 45, p. 35801–35810, 2015.
- DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3–5, p. 194–200, ago. 1999.
- DU, Y. et al. Enzyme nanocapsules armored by metal-organic frameworks: A novel approach for preparing nanobiocatalyst. **Chemical Engineering Journal**, v. 327, p. 1192–1197, nov. 2017.
- EDERINGTON, L. H. et al. Characteristics of petroleum product prices: A survey. **Journal of Commodity Markets**, v. 14, p. 1–15, jun. 2019.
- ESTRADÃO. **Percentual de 12% de biodiesel no diesel passa a valer a partir de 1º de março**. Disponível em: <<https://estradao.estadao.com.br/caminhoes/12-de-biodiesel-passa-a-valer/>>. Acesso em: 9 dez. 2020.
- FERNANDES, M. L. . et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isocetane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 1, p. 43–49, jul. 2004.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, mar. 2010.
- GAMEIRO, A. et al. **Boletim Siarma**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://esalqlog.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/2015/07/Boletim-SIARMA-2009-Outrubro-e-Novembro-Regiao-Sudeste.pdf>>.

- GANJALIKHANY, M. R. et al. Functional Motions of *Candida antarctica* Lipase B: A Survey through Open-Close Conformations. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40327, 10 jul. 2012.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, nov. 2011.
- GAUR, A. et al. A review on factor affecting biodiesel production from waste cooking oil: An Indian perspective. **Materials Today: Proceedings**, out. 2020.
- GIRASSOL, JORNAL O. **Coco babaçu pode ajudar na sustentabilidade como fonte de biodiesel**. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/coco-babacu-ajudar-sustentabilidade-fonte-biodiesel-181010>>. Acesso em: 10 dez. 2020.
- GOFFERJÉ, G. et al. Kinetics of enzymatic esterification of glycerol and free fatty acids in crude *Jatropha* oil by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 1–7, set. 2014.
- GOLIČNIK, M.; MASSON, P. Time-course of enzyme-catalyzed competing substrate degradation for michaelian behavior and for enzymes showing activation/inhibition by excess substrate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 309, p. 108704, ago. 2019.
- GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 7–8, p. 797–812, maio 2006.
- GUISÁN, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375–382, jun. 1988.
- HANSEN, R. B. et al. Esterification using a liquid lipase to remove residual free fatty acids in biodiesel. **Process Biochemistry**, v. 97, p. 213–221, out. 2020.
- HIRATA, D. B. et al. Evaluation of different immobilized lipases in transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 117–123, 2016.
- HÖCK, H. et al. Comparison of *Candida antarctica* Lipase B Variants for Conversion of ϵ -Caprolactone in Aqueous Medium—Part 2. **Polymers**, v. 10, n. 5, p. 524, 14 maio 2018.
- HØEGH, I. et al. Two lipases from *Candida antarctica* : cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. S1, p. 869–875, 31 dez. 1995.
- HOSSEINI, S. M. et al. Lipase-immobilized chitosan-crosslinked magnetic nanoparticle as a biocatalyst for ring opening esterification of itaconic anhydride. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 141–150, mar. 2019.
- ISSARIYAKUL, T.; DALAI, A. K. Biodiesel from vegetable oils. **Renewable and**

- Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 446–471, mar. 2014.
- JACOBSON, K. et al. Solid acid catalyzed biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 85, n. 1–2, p. 86–91, 17 dez. 2008.
- JAHANSHAHI, M.; SANATI, M. H.; BABAEI, Z. Optimization of parameters for the fabrication of gelatin nanoparticles by the Taguchi robust design method. **Journal of Applied Statistics**, v. 35, n. 12, p. 1345–1353, 10 dez. 2008.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, abr. 2012.
- KARMAKAR, B.; DHAWANE, S. H.; HALDER, G. Optimization of biodiesel production from castor oil by Taguchi design. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2684–2695, 2018a.
- KARMAKAR, B.; DHAWANE, S. H.; HALDER, G. Optimization of biodiesel production from castor oil by Taguchi design. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2684–2695, abr. 2018b.
- KAUR, M.; ALI, A. Lithium ion impregnated calcium oxide as nano catalyst for the biodiesel production from karanja and jatropha oils. **Renewable Energy**, v. 36, n. 11, p. 2866–2871, nov. 2011.
- KILLOL, A. et al. Experimental studies of a diesel engine run on biodiesel n-butanol blends. **Renewable Energy**, v. 135, p. 687–700, maio 2019.
- KLEINAITĚ, E. et al. A cleaner approach for biolubricant production using biodiesel as a starting material. **Journal of Cleaner Production**, v. 75, p. 40–44, jul. 2014.
- KUALITAS, P. **Taguchi Method Taguchi Method Taguchi Method**. [s.l: s.n.].
- KUMAR, D. et al. Preparation and characterization of novel hybrid bio-support material immobilized from *Pseudomonas cepacia* lipase and its application to enhance biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 147, p. 11–24, mar. 2020.
- KUMAR, S.; CHARY, G. H. V. C.; DASTIDAR, M. G. Optimization studies on coal–oil agglomeration using Taguchi (L16) experimental design. **Fuel**, v. 141, p. 9–16, fev. 2015.
- LAO, J. et al. Reducing atmospheric pollutant and greenhouse gas emissions of heavy duty trucks by substituting diesel with hydrogen in Beijing–Tianjin–Hebei–Shandong region, China. **International Journal of Hydrogen Energy**, out. 2020.
- LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1–2, p. 161–172, out. 2009.
- LERIN, L. A. et al. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 12, p. 2381–2394, 7 dez. 2014.

- LI, L. et al. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1–4, p. 58–62, dez. 2006.
- LI, N. et al. A review on mixture design methods for geopolymer concrete. **Composites Part B: Engineering**, v. 178, p. 107490, dez. 2019.
- LIMA, L. N. et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 523–535, 28 abr. 2015.
- LIMA, R. N. et al. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. **Molecular Catalysis**, v. 466, p. 75–105, abr. 2019.
- LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332–342, maio 2018.
- LIU, D.-M.; DONG, C. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. **Process Biochemistry**, v. 92, p. 464–475, maio 2020.
- LLAMAS, A. et al. Biokerosene from Babassu and Camelina Oils: Production and Properties of Their Blends with Fossil Kerosene. **Energy & Fuels**, v. 26, n. 9, p. 5968–5976, 20 set. 2012.
- LUTZ, I. A. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. [s.l: s.n.].
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1–15, out. 1999.
- MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco de babaçu. **Revista Ceres**, v. 53, n. 308, 2006.
- MANO, E. B.; SEABRA, A. DO P. **Práticas de Química Orgânica**. [s.l: s.n.].
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119–134, jun. 2012.
- MOHAMMADI, M. et al. Rapid and high-density covalent immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase using a multi component reaction: application in biodiesel production. **RSC Advances**, v. 5, n. 41, p. 32698–32705, 2015.
- MOHAN, S. et al. Optimization and evaluation of fermentative hydrogen production and wastewater treatment processes using data enveloping analysis (DEA) and Taguchi design of

experimental (DOE) methodology. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 1, p. 216–226, jan. 2009.

MOHD HUSSIN, F. N. N.; ATTAN, N.; WAHAB, R. A. Taguchi design-assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase onto a ternary alginate/nanocellulose/montmorillonite composite: Physicochemical characterization, thermal stability and reusability studies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 136, p. 109506, maio 2020.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Immobilization of Lipase A from *Candida antarctica* onto Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4018, 2019.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, v. 164, p. 1566–1587, fev. 2021.

MORAES, P. S. et al. Biodiesel produced from crude, degummed, neutralized and bleached oils of Nile tilapia waste: Production efficiency, physical-chemical quality and economic viability. **Renewable Energy**, v. 161, p. 110–119, dez. 2020.

MOREIRA, K. S. et al. Optimization of the Production of Enzymatic Biodiesel from Residual Babassu Oil (*Orbignya* sp.) via RSM. **Catalysts**, v. 10, n. 4, p. 414, 9 abr. 2020.

MOUAD, A. M. et al. Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p. 64–68, abr. 2016.

MURILLO, G. et al. Scaled-up biodiesel synthesis from Chinese Tallow Kernel oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipase through ultrasonic assisted technology: A non-edible and alternative source of bio energy. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 58, p. 104658, nov. 2019.

NAVAS, M. B. et al. Transesterification of soybean and castor oil with methanol and butanol using heterogeneous basic catalysts to obtain biodiesel. **Chemical Engineering Science**, v. 187, p. 444–454, set. 2018.

NISAR, J. et al. Enhanced biodiesel production from *Jatropha* oil using calcined waste animal bones as catalyst. **Renewable Energy**, v. 101, p. 111–119, fev. 2017.

NOGUEIRA, T. R. et al. Evaluation of oxidative stability of soybean biodiesel using ethanolic and chloroform extracts of *Platymiscium floribundum* as antioxidant. **Renewable Energy**, v. 159, p. 767–774, out. 2020.

NORJANNAH, B. et al. Enzymatic transesterification for biodiesel production: a comprehensive review. **RSC Advances**, v. 6, n. 65, p. 60034–60055, 2016.

OLIVEIRA, U. M. F. **Desenvolvimento de biocatalisadores utilizando lipase *Rhizomucor Miehei* (RML) imobilizada em suporte quitosana e sua aplicação na síntese dos ésteres**

butirato de metila e butirato de etila. [s.l.] Universidade Federal do Ceara, 2012.

PAIVA, E. J. M. et al. Non-edible babassu oil as a new source for energy production—a feasibility transesterification survey assisted by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 3, p. 833–838, maio 2013.

PANG, Y. L.; ABDULLAH, A. Z.; BHATIA, S. Review on sonochemical methods in the presence of catalysts and chemical additives for treatment of organic pollutants in wastewater. **Desalination**, v. 277, n. 1–3, p. 1–14, ago. 2011.

PAULA, R. S. F. et al. Castor–babassu biodiesel blends: estimating kinetic parameters by Differential Scanning Calorimetry using the Borchardt and Daniels method. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 8, p. 884, 20 ago. 2019.

PETERSEN, D. et al. Displacement and Strain Fields at a Stone/Mortar Interface by Digital Image Processing. **Journal of Testing and Evaluation**, v. 29, n. 2, p. 115, 2001.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 67–80, jun. 1998.

PONTE, F. A. F. DA. **Obtenção de bioquerosene a partir de resíduos dos óleos de babaçu e coco via catálise heterogenea.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2017.

POPPE, J. K. et al. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 490, p. 50–56, jan. 2015.

POPPE, J. K. et al. Enzymatic synthesis of ethyl esters from waste oil using mixtures of lipases in a plug-flow packed-bed continuous reactor. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 4, p. 952–959, jul. 2018a.

POPPE, J. K. et al. Transesterification of Waste Frying Oil and Soybean Oil by Combi-lipases Under Ultrasound-Assisted Reactions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 186, n. 3, p. 576–589, 21 nov. 2018b.

PORRO, R. A economia invisível do babaçu e sua importância para meios de vida em comunidades agroextrativistas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, n. 1, p. 169–188, abr. 2019.

POURHOSEINI, S. H. et al. A comparative exploration of thermal, radiative and pollutant emission characteristics of oil burner flame using palm oil biodiesel-diesel blend fuel and diesel fuel. **Energy**, p. 119338, nov. 2020.

POURZOLFAGHAR, H. et al. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245–257, ago. 2016.

PRASAD, K. S.; RAO, C. S.; RAO, D. N. Application of design of experiments to plasma arc

welding process: A review. **Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering**, v. 34, n. 1, p. 75–81, 2012.

RANUCCI, C. R. et al. Potential alternative aviation fuel from jatropha (*Jatropha curcas* L.), babassu (*Orbignya phalerata*) and palm kernel (*Elaeis guineensis*) as blends with Jet-A1 kerosene. **Journal of Cleaner Production**, v. 185, p. 860–869, jun. 2018.

REZANIA, S. et al. Review on transesterification of non-edible sources for biodiesel production with a focus on economic aspects, fuel properties and by-product applications. **Energy Conversion and Management**, v. 201, p. 112155, dez. 2019.

RIOS, N. S. et al. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99–120, dez. 2018.

ROCHA, T. G. et al. Lipase Cocktail for Optimized Biodiesel Production of Free Fatty Acids from Residual Chicken Oil. **Catalysis Letters**, 2 set. 2020.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 963–968, set. 2009.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 1–2, p. 1–22, jun. 2010a.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 15–32, set. 2010b.

ROGALSKA, E. et al. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. **Chirality**, v. 5, n. 1, p. 24–30, 1993.

SAIFUDDIN, N. et al. The Production of Biodiesel and Bio-kerosene from Coconut Oil Using Microwave Assisted Reaction. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 32, p. 012039, mar. 2016.

SANTOS, N. A. **Propriedades Termo-Oxidativas e de Fluxo do Biodiesel de Babaçu (*Orbignya phalerata*)**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review. **Biotechnology(Faisalabad)**, v. 10, n. 1, p. 23–40, 1 jan. 2011.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SHIMADA, Y. et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3–5, p.

133–142, jun. 2002.

SKJOLD-JØRGENSEN, J. et al. Altering the Activation Mechanism in *Thermomyces lanuginosus* Lipase. **Biochemistry**, v. 53, n. 25, p. 4152–4160, 16 jul. 2014.

SOARES, A. DE S. et al. Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction. **LWT**, v. 130, p. 109636, ago. 2020.

SOARES DIAS, A. P. et al. Biodiesel by Co-processing animal fat/vegetable oil mixtures over basic heterogeneous Ca catalyst. **Cleaner Engineering and Technology**, p. 100012, nov. 2020.

SOUZA, J. E. S. et al. Sonohydrolysis using an enzymatic cocktail in the preparation of free fatty acid. **3 Biotech**, v. 10, n. 6, p. 254, 15 jun. 2020.

SUSANTO, B. H.; EFENDI, Y. **Synthesis of bio-jet fuel from coconut (*Cocos nucifera*) oil through hydrodeoxygenation using NiMoP/Al₂O₃ catalyst**. 2020Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/5.0014341>>

SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. APPLICATIONS OF ULTRASOUND TO MATERIALS CHEMISTRY. **Annual Review of Materials Science**, v. 29, n. 1, p. 295–326, ago. 1999.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628–634, set. 2010.

TAVARES, A. P. M. et al. Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 454, p. 52–60, set. 2015.

TIOSSO, P. C. et al. Utilization of immobilized lipases as catalysts in the transesterification of non-edible vegetable oils with ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 839–847, dez. 2014.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1–2, p. 52–59, nov. 2010.

UPPENBERG, J. et al. Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, n. 2, p. 790–792, jan. 1994.

VESCOVI, V. et al. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 12, p. 1615–1624, 23 dez. 2016.

VIDAL, M. DE F. Produção e uso de biocombustíveis no Brasil. **Caderno Setorial ETENE**, v. 4, n. 79, p. 1–13, 2019.

WAGHMARE, G. V.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted enzyme catalyzed hydrolysis of waste cooking oil under solvent free condition. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 60–67,

set. 2016.

WANCURA, J. H. C. et al. Production of biodiesel catalyzed by lipase from *Thermomyces lanuginosus* in its soluble form. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 11, p. 2361–2368, nov. 2018.

WANCURA, J. H. C. et al. Feeding strategies of methanol and lipase on eversa® transform-mediated hydroesterification for FAME production. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 97, n. S1, p. 1332–1339, 4 jun. 2019.

WANG, D. et al. **Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems**. [s.l.] Elsevier B.V, 2018a. v. 119

WANG, D. et al. Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 453–461, nov. 2018b.

WANG, M. et al. Biodiesel production by combined fatty acids separation and subsequently enzymatic esterification to improve the low temperature properties. **Bioresource Technology**, v. 174, p. 302–305, dez. 2014.

WANG, P. et al. Enzyme stabilization by covalent binding in nanoporous sol-gel glass for nonaqueous biocatalysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 3, p. 249–255, 5 ago. 2001.

XU, Y. et al. In situ visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3–4, p. 213–219, nov. 2011.

YAHYAEE, R.; GHOBADIAN, B.; NAJAFI, G. Waste fish oil biodiesel as a source of renewable fuel in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 17, p. 312–319, jan. 2013.

YANG, J. et al. An overview on performance characteristics of bio-jet fuels. **Fuel**, v. 237, p. 916–936, fev. 2019.

YANG, Y. et al. Shallow porous microsphere carriers with core-shell structure based on glass beads cross-linking chitosan for immobilizing inulinase. **Molecular Catalysis**, v. 486, p. 110871, maio 2020.

YASVANTHRAJAN, N. et al. Production of biodiesel from waste bio-oil through ultrasound assisted transesterification using immobilized lipase. **Environmental Technology & Innovation**, p. 101199, out. 2020.

YEW, G. Y. et al. Recent advances in algae biodiesel production: From upstream cultivation to downstream processing. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100227, set. 2019.

- YÜCEL, Y.; DEMIR, C. The Optimization of Immobilized Lipase-catalyzed Transesterification of Canola Oil by Response Surface Methodology and Mixture Design. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 34, n. 22, p. 2031–2040, nov. 2012.
- YUSOFF, N.; RAMASAMY, M.; YUSUP, S. Taguchi's parametric design approach for the selection of optimization variables in a refrigerated gas plant. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 6, p. 665–675, jun. 2011.
- ZDARTA, J. et al. Spongin-Based Scaffolds from *Hippospongia communis* Demosponge as an Effective Support for Lipase Immobilization. **Catalysts**, v. 7, n. 5, p. 147, 10 maio 2017.
- ZECHNER, R. et al. FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 279–291, mar. 2012.
- ZHANG, J.-H. et al. Correction: Structure-Guided Modification of *Rhizomucor miehei* Lipase for Production of Structured Lipids. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 24 out. 2013.
- ZHANG, J. Z.; CHEN, J. C.; KIRBY, E. D. Surface roughness optimization in an end-milling operation using the Taguchi design method. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 184, n. 1–3, p. 233–239, abr. 2007.
- ZHANG, W.-W. et al. Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 83–89, maio 2015.
- ZHONG, L. et al. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 207–222, jun. 2020.
- ZHONG, N. et al. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production. **Food Chemistry**, v. 271, p. 739–746, jan. 2019.