



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

LOUREMBERGUE SARAIVA DE MOURA JUNIOR

**EFEITO DA MISTURA DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DE ÓLEOS
RESIDUAIS PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS COM
CATALISADOR ENZIMÁTICO**

**REDEENÇÃO
2022**

LOUREMBERGUE SARAIVA DE MOURA JUNIOR

**EFEITO DA MISTURA DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DE ÓLEOS
RESIDUAIS PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS COM
CATALISADOR ENZIMÁTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Energias, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – (UNILAB), como requisito para obtenção do título de Engenheiro de Energias.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos

Coorientadora: Msc^a. Katerine da Silva Moreira.

**REDENÇÃO
2022**

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

Moura Junior, Lourebergue Saraiva de.

M884e

Efeito da mistura de ácidos graxos livres de óleos residuais para produção de ésteres etílicos com catalisador enzimático / Lourebergue Saraiva de Moura Junior. - Redenção, 2022.
49f: il.

Monografia - Curso de Engenharia de Energias, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2022.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.
Coorientador: Msc^a. Katerine da Silva Moreira.

1. Ácidos graxos livre. 2. Biodiesel. 3. Óleos residuais. I.
Título

CE/UF/BSP

CDD 662.669

LOUREMBERGUE SARAIVA DE MOURA JUNIOR

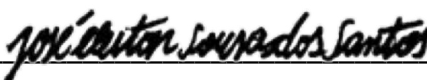
**EFEITO DA MISTURA DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DE ÓLEOS
RESIDUAIS PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS COM
CATALISADOR ENZIMÁTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Energias, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – (UNILAB), como requisito para obtenção do título de Engenheiro de Energias.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
Coorientadora: Msc^a. Katerine da Silva Moreira.

Aprovado em: 09/02/2022

BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos - IEDS

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira



Prof.^a Dra. Artemis Pessoa Guimarães - IEDS

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira



Prof.^a Dra. Rita Karolinny Chaves de Lima - IEDS

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à Deus eterno e todo poderoso, por me dar forças de enfrentar os desafios que Ele me proporciona. "Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele a glória por toda a eternidade! Amém." (Romanos 11, 36).

Ao meu pai, Lourembergue Saraiva de Moura, que é meu exemplo como profissional e como homem, obrigado por todos os ensinamentos e apoio. A minha mãe, Maria do Socorro Torres de Andrade, mulher guerreira e que foi minha primeira educadora, obrigado por sempre cuidar da nossa família. A minha irmã, Rita Raquel Andrade de Moura, por ter sido meu exemplo durante minha infância e adolescência, obrigado por ser uma irmã tão carinhosa.

A minha namorada e coorientadora, Katerine da Silva Moreira, que foi minha principal apoiadora durante minha graduação e que sempre me estimulou a seguir em frente principalmente nos momentos difíceis, muito obrigado pela sua paciência e ajuda.

A meus amigos e colegas que me ajudaram nas disciplinas e nos trabalhos laboratoriais, sei que todos teremos um futuro brilhante pela frente e com bastante energia para transformar o mundo.

Ao grupo de pesquisa GENEZ e aos professores Dr. José Cleiton Sousa dos Santos e Dr^a. Maria Cristiane Martins de Souza, por confiarem no meu potencial e serem espelhos não apenas para mim, mas para muitos alunos dos cursos de engenharia da UNILAB.

A Funcap – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por financiar o desenvolvimento dessa pesquisa.

RESUMO

Devido aos problemas socioambientais e financeiros causados pelo constante aumento no consumo de combustíveis fósseis, fontes renováveis de energia são estudadas para serem aplicadas como alternativa aos derivados de petróleo. O biodiesel trata-se de uma mistura de ésteres alquílicos e aparece como alternativa ao diesel comum devido sua baixa emissão de gases de efeito estufa. As matérias-primas mais comumente utilizadas para produção de biodiesel são óleos vegetais e gorduras animais, porém estes insumos competem com o mercado alimentício tornando o biodiesel proveniente dessas substâncias com baixo custo-benefício, sendo os óleos e gorduras residuais uma opção que evitaria tal problemática além de dar uma correta finalidade a esses materiais. A utilização de catalisadores enzimáticos na reação de produção de biodiesel, comparado ao uso de catalisadores químicos, propicia condições reacionais mais brandas e quando imobilizado pode ser reutilizado. Este trabalho tem como objetivo determinar, por meio de um planejamento de misturas, a melhor combinação de ácidos graxos livres (AGLs) proveniente dos óleos residuais de frango, babaçu e castanha-do-Pará que propicia a maior conversão em ésteres etílicos, utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada (Lipozyme RM IM) como catalisador na reação de esterificação, além de determinar as melhores condições reacionais através de um planejamento Taguchi. O melhor resultado obtido foi de $78,93 \pm 3,95\%$ de conversão em ésteres na mistura de 67% de AGLs do óleo residual de castanha-do-Pará e 33% de AGLs do óleo residual de babaçu nas condições reacionais de 50 °C, razão molar 1:1 (AGLs: álcool), 3% de conteúdo de biocatalisador e 4 horas de reação. Para essa combinação de AGLs a conversão teórica obtida foi de $90,77 \pm 4,54\%$ nas condições reacionais de 40 °C, razão molar 1:1 (AGLs: álcool), 3% de conteúdo de biocatalisador e 6 horas de reação.

Palavras-Chave: Mistura de ácidos graxos livres. Lipozyme RM IM. Biodiesel. Óleos residuais.

ABSTRACT

Due to the socio-environmental and financial problems caused by the constant increase in the consumption of fossil fuels, renewable energy sources are studied to be applied as an alternative to petroleum derivatives. Biodiesel is a mixture of alkyl esters and appears as an alternative to common diesel due to its low emission of greenhouse gases. The raw materials most commonly used for biodiesel production are vegetable oils and animal fats, but these inputs compete with the food market, making biodiesel from these substances with low cost-effectiveness, with residual oils and fats being an option that would avoid such a problem. In addition to giving a correct purpose to these materials. The use of enzymatic catalysts in the biodiesel production reaction, compared to the use of chemical catalysts, provides milder reaction conditions and, when immobilized, can be reused. The objective of this work is to determine, through a mixture design, the best combination of free fatty acids (FFAs) from the residual oils of chicken, babassu and Brazil nuts that provide the highest conversion into ethyl esters, using the Immobilized *Rhizomucor miehei* lipase (Lipozyme RM IM) as a catalyst in the esterification reaction, in addition to determining the best reaction conditions through a Taguchi design. The best result was $78.93 \pm 3.95\%$ conversion into esters in the mixture of 67% of FFAs from residual Brazil nut oil and 33% of FFAs from residual babassu oil under reaction conditions of 50 °C, 1:1 molar ratio (AGLs: alcohol), 3% biocatalyst content and 4 hours of reaction. For this combination of AGLs, the theoretical conversion obtained was $90.77 \pm 4.54\%$ under reaction conditions of 40 °C, 1:1 molar ratio (AGLs: alcohol), 3% of biocatalyst content, and 6 hours of reaction.

Keywords: Free fatty acid blend. Lipozyme RM IM. Biodiesel. Residual oils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Preço médio do diesel nos postos entre os anos de 2013 e 2021 no Brasil ...	15
Figura 2: Reação de transesterificação.....	19
Figura 3: Reação de esterificação.....	20
Figura 4: Reação de hidroesterificação	20
Figura 5: Rotas convencionais para produção de biodiesel utilizando óleos residuais.	22
Figura 6: Representação cristalográfica da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> : Conformação Fechada (código PDB: 3TGL); Conformação Aberta (código PDB: 4TGL) com resíduos do sítio catalítico SER144 (vermelho), ASP203 (verde), HIS257 (amarelo). As estruturas foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) usando pymol versão educacional.	23
Figura 7: Superfície de contorno do planejamento triangular feito na temperatura de 40 °C, tempo de 2 horas, rotação orbital de 200 rpm, conteúdo de biocatalisador igual à 1% da massa de AGLs e razão molar 1:1 (AGLs: álcool).....	34
Figura 8: Relação S/R para temperatura, razão molar, conteúdo de biocatalisador e tempo para otimização de produção de ésteres etílicos	37
Figura 9: Gráfico Pareto.....	38
Figura 10: Superfícies de contorno para esterificação da mistura de AGLs dos óleos residuais de babaçu e castanha-do-Pará. (A) Conteúdo de biocatalisador (%) versus razão molar (AGLs: álcool). (B) Tempo (h) versus razão molar (AGLs: álcool). Temperatura (°C) versus razão molar (AGLs: álcool)	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de ácidos graxos do óleo de castanha-do-Pará	17
Tabela 2: Composição de ácidos graxos do óleo residual de babaçu.....	18
Tabela 3: Composição de ácidos graxos do óleo residual de frango.....	19
Tabela 4: Reações do planejamento triangular de misturas para estudo das combinações de AGLs provenientes dos óleos residuais de babaçu, castanha-do-Pará e frango.....	29
Tabela 5: Níveis e fatores utilizados no planejamento.....	29
Tabela 6: Reações do planejamento Taguchi com suas respectivas condições reacionais	30
Tabela 7: Índice de acidez dos óleos residuais antes e depois da produção de AGLs ..	32
Tabela 8: Viscosidade cinemática dos óleos residuais à 40 °C	32
Tabela 9: Densidade dos óleos residuais à 25 °C e 40 °C	33
Tabela 10: Resultados do planejamento triangular de misturas	34
Tabela 11: Resultados do planejamento Taguchi	36
Tabela 12: Resposta para razões sinal-ruído	37
Tabela 13: ANOVA para parâmetros que afetam a esterificação da mistura de AGLs dos óleos residuais de babaçu e castanha-do-Pará	39

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnica
AGLs	Ácidos graxos livres
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
cm ³	centímetros cúbicos
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
FFAs	<i>Free fatty acids</i>
g	gramas
h	horas
HCl	Ácido clorídrico
kHz	Quilohertz
KOH	Hidróxido de Potássio
mg	miligramas
mL	mililitros
mm	milímetros
N ₂ O	Óxido nitroso
NaOH	Hidróxido de Sódio
PDB	Protein Data Bank
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
rpm	rotações por minuto
s	segundos
S/R	Sinal-ruído

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
	2.1 Objetivo Geral	14
	2.2 Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
	3.1 Combustíveis fósseis	15
	3.2 Biodiesel	16
	3.3 Matéria-prima residual	17
	3.4 Rotas para obtenção do biodiesel	19
	3.5 Catálise enzimática	21
	3.6 Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	23
	3.7 Planejamento de misturas	24
	3.8 Planejamento Taguchi	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
	4.1 Materiais	26
	4.2 Caracterização físico-química dos óleos residuais	26
	4.2.1 Índice de Acidez	26
	4.2.2 Viscosidade Cinemática	27
	4.2.3 Densidade	27
	4.3 Obtenção de ácidos graxos livres dos óleos residuais	27
	4.4 Produção de ésteres etílicos de ácidos graxos	28
	4.5 Planejamento de misturas para determinar melhor combinação de AGLs	28
	4.6 Método Taguchi: planejamento experimental e análise estatística	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
	5.1 Caracterização físico-química dos óleos residuais	32
	5.1.1 Índice de acidez	32
	5.1.2 Viscosidade cinemática	32
	5.1.3 Densidade	33
	5.2 Planejamento de misturas para determinar melhor combinação de AGLs	33
	5.3 Método Taguchi: planejamento experimental e análise estatística	36
6	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Problemas climáticos são causados em consequência do aumento da emissão de gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O), entre outros, devido ao aumento da demanda de combustíveis fósseis (FAUZAN et al., 2020). Por efeito dos problemas ambientais e as altas nos preços dos combustíveis que tem como origem o petróleo, muitos países estimulam a utilização de biodiesel como combustível para veículos (GULDHE et al., 2015). O biodiesel é um combustível renovável, não tóxico, biodegradável e libera menor quantidade de carbono contraposto ao diesel comum, tendo em vista a diminuição da difusão de carbono o acúmulo de gases de efeito estufa é reduzido (MALLAH; SAHITO, 2020; ACHARYA et al., 2019). O biodiesel é uma alternativa promissora e eficaz na tentativa de assegurar um ambiente protegido e sustentável, dessa forma políticas públicas em muitas nações levaram a um aumento em sua produção e aplicação (ESAN; ADEYEMI; GANESAN, 2020).

Os ésteres característicos do biodiesel podem ser obtidos através da reação de transesterificação de triglicerídeos ou por meio da reação de esterificação de ácidos graxos livres (AGLs), no qual reagem com álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol), na presença de um catalisador básico, ácido ou enzimático, em ambos os processos (PATCHIMPET et al., 2020). A síntese de ésteres utilizando enzimas apresenta um elevado grau de pureza do produto, possibilita trabalhar com uma gama de matérias-primas, necessita de condições reacionais mais brandas e produz uma quantidade menor de efluentes (ARUMUGAM; PONNUSAMI, 2017; CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014). Entre as enzimas, as lipases que pertencem a classe das hidrolases (EC.3.1.1.3 triacilglicerol hidrolases) são as mais utilizadas em reações de catálise devido a sua ampla especificidade e seletividade de substratos (BINHAYEEDING et al., 2020; ARANA-PEÑA et al., 2020, 2021; BRAHAM et al., 2021; LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020; MORELLON-STERLING et al., 2021).

As enzimas ajudam a diminuir a quantidade de solvente utilizado e o total de etapas de uma determinada reação, fazendo com que o processo se torne mais sustentável e tenha melhor custo-benefício (ZDARTA et al., 2018). Para realizar suas funcionalidades fisiológicas e atuar de maneira ótima em temperaturas, pHs, entre outras condições, que estão fora das limitações fisiológicas “normais”, algumas enzimas passaram por processos de seleção no decorrer da evolução natural (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). Para ampliar o poder catalítico, aprimorar a estabilidade, dar mais

resistência aos inibidores, entre outros fatores, as enzimas industriais em geral são imobilizadas em um material de suporte, além de diminuir os gastos operacionais devido a possibilidade de reutilização da enzima (JACOB; SUTHINDHIRAN, 2020).

A lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) apresenta boa estabilidade sob inúmeros fatores e elevada atividade catalítica, esta enzima encontra-se disponível para ser comercializada tanto na sua forma livre (solúvel) como na forma imobilizada (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a). A RML é uma cadeia polipeptídica única de 269 resíduos, detém tamanho molecular equivalente à 31,600 Da, é uma enzima extracelular, e seu ponto isoelétrico é 3,8 (DE OLIVEIRA et al., 2018). Tendo como finalidade reações de esterificação a RML apresenta-se de forma apropriada em consequência de seu notório poder catalítico e sua estabilidade em meios anidros (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a).

A produção de biodiesel pode ser feita a partir de diferentes matérias-primas, principalmente óleos vegetais, como óleo de palma, óleo de soja, óleo de canola, óleo residual de fritura e gordura animal (PATCHIMPET et al., 2020; FERRERO; FABA; EIMER, 2021). Atualmente pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novas tecnologias para a purificação e produção de biodiesel, visando atingir a neutralidade em carbono e utilizar matérias-primas abundantes, renováveis e baratas que não sejam utilizadas no setor alimentício (FERRERO; FABA; EIMER, 2021; LUQUE; CAMPELO; CLARK, 2011). Nesse contexto, é necessário investigar matérias-primas alternativas que tenham potencial para a produção de biodiesel (NISAR et al., 2017; TIAN et al., 2017). Dessa forma, os óleos residuais (residuais de fritura ou que passaram do prazo de validade), os não comestíveis (óleo de frango) e outros óleos vegetais (óleo da calda de soja ácido), que não possuem valor alimentício, aparecem como uma matéria-prima promissora, devido ao seu conteúdo energético que pode ser utilizado na produção de biodiesel de segunda geração (DIAS et al., 2013; SÁNCHEZ FABA et al., 2019).

Na busca de analisar diferentes matérias-primas aplicadas simultaneamente na produção de biodiesel, para que a matriz do processo não seja limitada a um único insumo, a aplicação de um planejamento de mistura é considerada como uma tecnologia de qualidade para atingir um produto de qualidade (MARCHI et al., 2009; ORIVES et al., 2014). Em um planejamento de mistura, dois ou mais elementos são testados em diferentes proporções e as respostas e características dos produtos são registrados. Os resultados dependem apenas da proporção dos elementos que compõem as misturas (ALMANSA et al., 2015; CORNELL; DENG, 1982).

No processo de desenvolvimento de um novo produto é necessário técnicas de otimização que investiguem as melhores condições de formulação e processamento, além de um baixo custo e alta qualidade (ARTEAGA et al., 1994; CASTRO et al., 2003). No processo de catálise enzimática para a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos, o planejamento experimental utilizando o método de Taguchi é uma importante ferramenta a ser empregada para analisar os fatores (variáveis) que influenciam na conversão com uma quantidade de corridas reduzidas, proporcionando uma economia de tempo e recursos (CHAVAN; GAIKWAD, 2021; MOREIRA et al., 2020a; MURALI; FEDIUK, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como principal objetivo determinar as melhores condições reacionais para a esterificação da mistura de ácidos graxos livres obtidos de diferentes óleos residuais utilizando catalisador enzimático.

2.2 Objetivos Específicos

- Executar a caracterização dos óleos residuais de babaçu, castanha-do-Pará e de frango;
- Produzir ácidos graxos livres dos óleos residuais estudados através de saponificação seguida de hidrólise ácida;
- Realizar a produção de ésteres etílicos através da mistura dos AGLs dos óleos residuais tendo como catalisador a lipase imobilizada Lipozyme RM-IM;
- Determinar a melhor mistura de AGLs provindos dos óleos residuais de castanha-do-Pará, frango e babaçu na produção de ésteres etílicos através de um planejamento de misturas;
- Estudar a influência da temperatura, tempo de reação, razão molar (AGLs: álcool) e conteúdo de biocatalisador na produção de ésteres etílicos a partir da melhor combinação de AGLs provenientes das matérias-primas estudadas, buscando determinar as melhores condições reacionais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

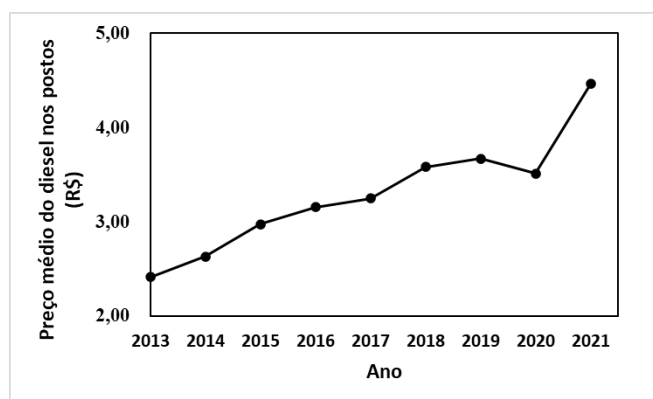
3.1 Combustíveis fósseis

A projeção de aumento da temperatura média global em mais de 2 °C, causado pelas mudanças climáticas, causará a extinção de até um milhão de espécies e a morte de centenas de milhões de pessoas, tornando assim esse problema ambiental global um dos mais imediatos (ATABANI et al., 2012). Tais mudanças climáticas possuem como fator crucial o aumento na emissão dos gases de efeito estufa, principalmente o CO₂, devido a crescente no consumo de combustíveis fósseis (MARTÍNEZ et al., 2013; VERMA et al., 2021; YUSRI et al., 2018). A diminuição global na emissão de CO₂ é obrigatória por meio de leis. A Organização das Nações Unidas (ONU) em 2009 na cúpula do clima em Copenhague, determinou uma meta de US\$ 100 bilhões em gastos com fundos para retardar as mudanças climáticas global (YUSRI et al., 2018), caso contrário é estimado um aumento na emissão de gases de efeito estufa de combustíveis fósseis em torno de 39% até 2030 (MOFIJUR et al., 2014).

Além dos problemas ambientais causados pelo aumento no consumo de combustíveis fósseis (GOH et al., 2020) junto com o seu esgotamento (MOFIJUR et al., 2014), tais fatos causam a valorização do produto fazendo com que ocorra os constantes crescimentos no preço dos derivados de petróleo tornando assim um problema, além de ambiental, financeiro (CARVALHO et al., 2020; MARTÍNEZ et al., 2013; SINGH et al., 2021; YAQOOB et al., 2021).

A Figura 1 mostra a média do preço do diesel nos postos de combustível do Brasil nos anos de 2013 a 2021. Nota-se que em todos os anos houve aumento comparado ao ano anterior com exceção do período de 2019 para 2020, sendo o maior aumento em torno de 27,12% do ano de 2020 para o ano de 2021, totalizando cerca de 85% de crescimento no preço médio do diesel de 2013 para 2021. Tal aumento no preço do diesel também é devido ao aumento no preço do biodiesel, pois nos anos analisados o diesel vendido nos postos trata-se de uma mistura entre o diesel do petróleo e o biodiesel.

Figura 1: Preço médio do diesel nos postos entre os anos de 2013 e 2021 no Brasil



Fonte: Autor

3.2 Biodiesel

Devido as consequências provocadas pelo grande consumo de combustível fósseis, pesquisadores ao redor do mundo foram forçados a buscarem fontes alternativas de energia (THOMAS; BIRNEY; AULD, 2013). Com suas baixas emissões de gases de efeito estufa, o biodiesel aparece como uma fonte de energia renovável candidato viável e potencial (ATABANI et al., 2013; PALASH et al., 2015) para motores a diesel (ONG et al., 2013) amplamente aceito devido às suas vantagens técnicas e estratégicas (AMANI et al., 2013).

O biodiesel é um combustível que pode ser definido como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, também denominado B100 (HOEKMAN et al., 2012; PALASH et al., 2015). Pode ser adicionado ao óleo diesel em pequenas quantidades, denominadas B10 e B20, sendo capaz de ser utilizado em motores de ignição por compressão sem alterações em sua estrutura (ATABANI et al., 2013). Em geral trata-se de uma fonte de energia renovável, não tóxico, não inflamável, possui ponto de fulgor superior comparado ao diesel, e não dispõe de enxofre ou compostos aromáticos em sua composição (ONG et al., 2013).

As matérias-primas para obtenção do biodiesel podem ser divididas em três gerações. A primeira geração são óleos de soja, girassol, palma, colza, coco, cártamo, amendoim e canola, ou seja, derivados diretamente de culturas alimentares (CHOZHAVENDHAN et al., 2020; GOH et al., 2020; ONG et al., 2013; SINGH et al., 2021). Biomassas residuais, como gorduras animais e óleos provenientes de sementes não comestíveis, são matérias-primas de segunda geração (ATABANI et al., 2012; GOH et al., 2020; VERMA et al., 2021). A terceira geração é a utilização de microalgas, que são microrganismos que convertem luz solar, água e CO₂ em biomassa de algas (ATABANI et al., 2012), para a produção de biodiesel (CHOZHAVENDHAN et al., 2020; GOH et al., 2020; VERMA et al., 2021).

3.3 Matéria-prima residual

O biodiesel proveniente de matérias-primas de primeira geração possui a desvantagem de tal insumo ser produzido a partir de safras alimentícias, como o óleo de soja, o que ocasiona a valorização do produto afetando assim de forma negativa, não somente o preço final do biodiesel, como a indústria de produtos alimentícios (AMANI et al., 2013; PALASH et al., 2015; SINGH et al., 2021; VERMA et al., 2021; YAQOOB et al., 2021). Tal problema tornaria limitada a contribuição do biodiesel para a diminuição no uso de derivados de petróleo e consequentemente a mitigação das mudanças climáticas (ATABANI et al., 2012; MOFIJUR et al., 2014).

Tratando-se de matérias-primas residuais para a produção de biodiesel, a concepção de economia circular favorece o reaproveitamento de resíduos, maximizando a aplicação desse insumo (GOH et al., 2020), com isso é eliminada a necessidade do descarte das biomassas residuais, além de diminuir os custos de tal produção por não interferir na indústria alimentícia (AMANI et al., 2013; ATABANI et al., 2012; ONG et al., 2013).

Jena et al. (2010) estudaram a transesterificação da mistura dos óleos de Mahua e Simarouba, ambos com alto teor de AGLs, utilizando metanol e KOH como catalisador a uma temperatura de reação de 60 °C e obtiveram conversão de 90% em ésteres metílicos.

Silva, Peixoto e Freire (2018) analisaram a mistura de AGLs, composto pelos ácidos linoléico, láurico, oleico, esteárico e palmítico, na presença de metanol e nanotubos de halloysite funcionalizados com HSO₃ como catalisador a uma temperatura de reação de 120 °C, e alcançaram conversão em biodiesel de 100% em 3 horas de reação.

A castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*) trata-se de uma fruta oleaginosa nativa das florestas da bacia da Amazônia. Conforme determinado por Sampaio Neto, Batista e Meirelles (2018), o óleo dessa fruta possui a seguinte composição de AGLs conforme presente na Tabela 1.

Tabela 1: Composição de ácidos graxos do óleo de castanha-do-Pará

Ácidos Graxos Livres	Composição (%)
Ácido palmítico (C16:0)	14,70
Ácido palmitoléico (C16:1)	0,37
Ácido esteárico (C18:0)	12,55
Ácido oleico (C18:1n9c)	31,88

Ácido linoléico (C18:2n6c)	39,96
Ácido araquídico (C20:0)	0,27
Outros ácidos	0,27

Fonte: Adaptado de Sampaio Neto, Batista e Meirelles (2018)

Moura Junior et al (2019) estudaram a esterificação dos AGLs provenientes do óleo residual de castanha-do-Pará em uma temperatura de reação de 48 °C, rotação orbital de 200 rpm, razão molar 1:18 (AGLs: etanol), conteúdo de biocatalisador equivalente a 14% da massa de AGLs, se tratando de uma combinação de lipases imobilizadas referente a 67% de Novozym® 435 e 33% de Lipozyme® RM-IM, obtiveram uma conversão em ésteres etílicos de 90,08%, sendo que quando utilizada separadamente a Lipozyme® RM-IM foi obtido conversão em ésteres de 88,14%.

O babaçu (*Orbignya sp.*) trata-se de um fruto que pode ser encontrado no Cerrado brasileiro e na parte oeste da América do Sul (MELO et al., 2019). A composição de AGLs do óleo residual de babaçu foi determinado por Moreira et al. (2020), e pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2: Composição de ácidos graxos do óleo residual de babaçu

Ácidos Graxos Livres	Composição (%)
Ácido caprílico (C8:0)	9,64
Ácido capríco (C10:0)	6,85
Ácido láurico (C12:0)	41,55
Ácido mirístico (C14:0)	14,01
Ácido palmítico (C16:0)	6,96
Ácido esteárico (C18:0)	2,66
Ácido oleico (C18:1n9c)	11,04
Ácido linoleico (C18:2n6c)	1,76
Outros ácidos	5,53

Fonte: Adaptado de Moreira et al. (2020)

Moreira et al. (2020) analisaram a esterificação dos AGLs provenientes do óleo residual do babaçu em uma temperatura de reação de 48 °C, rotação orbital de 200 rpm, razão molar 1:18 (AGLs: etanol), conteúdo de biocatalisador equivalente a 14% da massa de AGLs, utilizando a lipase imobilizada Novozym® 435 como catalisador e obtiveram uma conversão em biodiesel de 96,84%, além de reutilizarem a lipase por 10 ciclos consecutivos na qual houve uma redução de aproximadamente 5,84% na conversão.

Rocha et al. (2021) investigaram a esterificação dos AGLs obtidos do óleo residual de frango utilizando uma combinação de lipases imobilizadas, 67% de Novozym® 435 e 33% de Lipozyme® RM-IM, e nas condições reacionais de razão molar 1:5 (AGLs: etanol), 30 °C, conteúdo de biocatalisador equivalente a 15% da massa de AGLs, tempo de reação de 3 horas, alcançaram conversão em ésteres de 89,95%. A Tabela 3 apresenta a composição de AGLs do óleo residual de frango.

Tabela 3: Composição de ácidos graxos do óleo residual de frango

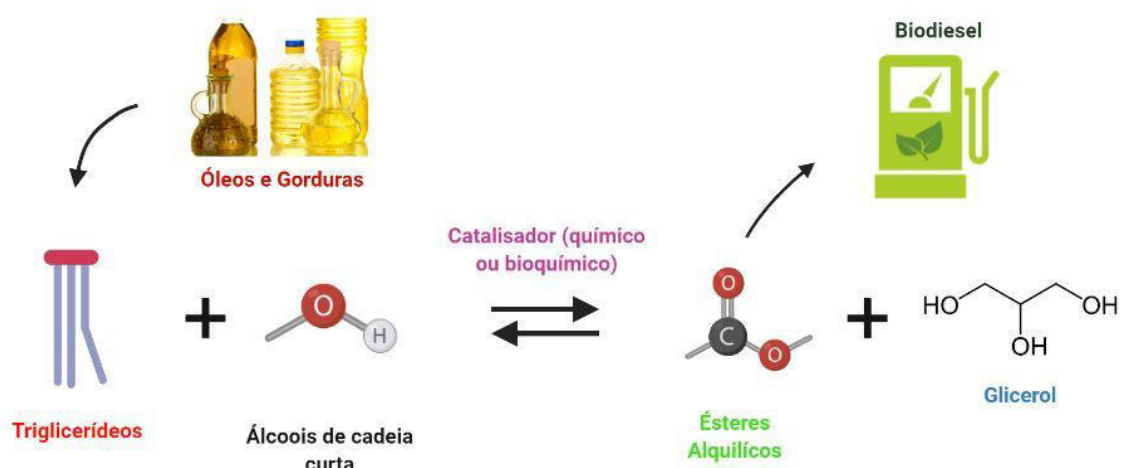
Ácidos Graxos Livres	Composição (%)
Ácido palmítico (C16:0)	38,09
Ácido palmitoléico (C16:1)	5,39
Ácido esteárico (C18:0)	11,07
Ácido oleico (C18:1n9c)	24,41
Ácido linoléico (C18:2n6c)	21,04

Fonte: Adaptado de Rocha et al. (2021)

3.4 Rotas para obtenção do biodiesel

Os ésteres alquílicos, que caracterizam o biodiesel, podem ser obtidos através da reação de transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais com álcoois de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, na presença de catalisador, tendo como subproduto o glicerol (CHOZHAVENDHAN et al., 2020; GUO; SUN; LIU, 2020; MOREIRA et al., 2020c), como mostra a Figura 2, segundo a resolução da ANP 51/2015 ANP (Agência Nacional do Petróleo) para ser considerado biodiesel a conversão em ésteres deve ser de no mínimo 96,50%. A transesterificação é a rota para produção de biodiesel mais comumente utilizada geralmente catalisada por uma base o que impossibilita a utilização de óleos residuais, pois o teor de AGLs no óleo deve ser inferior à 1% para evitar que ocorra uma saponificação (AMINI et al., 2017; GUPTA; AGARWAL; DALAI, 2020; ONG et al., 2013; TANG et al., 2020).

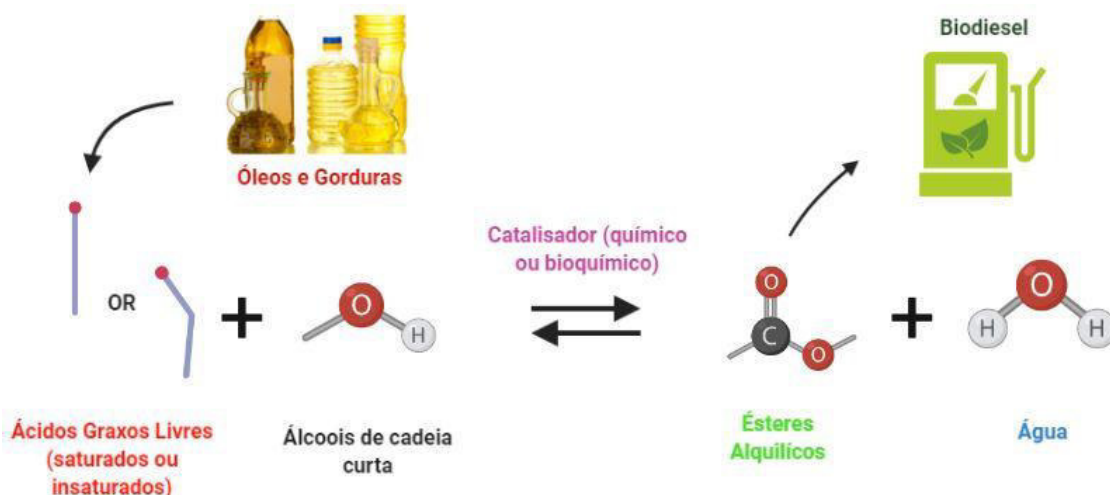
Figura 2: Reação de transesterificação



Fonte: Autor

A reação de esterificação de AGLs com álcoois de cadeia curta sob a influência de um catalisador também é uma rota para obtenção de ésteres alquílicos, que tem como subproduto a água (AGUIEIRAS et al., 2017; CASTILLO LÓPEZ et al., 2015; MATHEW et al., 2021; ZHAO et al., 2015), como mostra a Figura 3. Além de consumir menos energia comparada a transesterificação, por tratar-se de um processo mais rápido, a esterificação não se limita pelo teor de AGLs presente na amostra (CAVALCANTE et al., 2021).

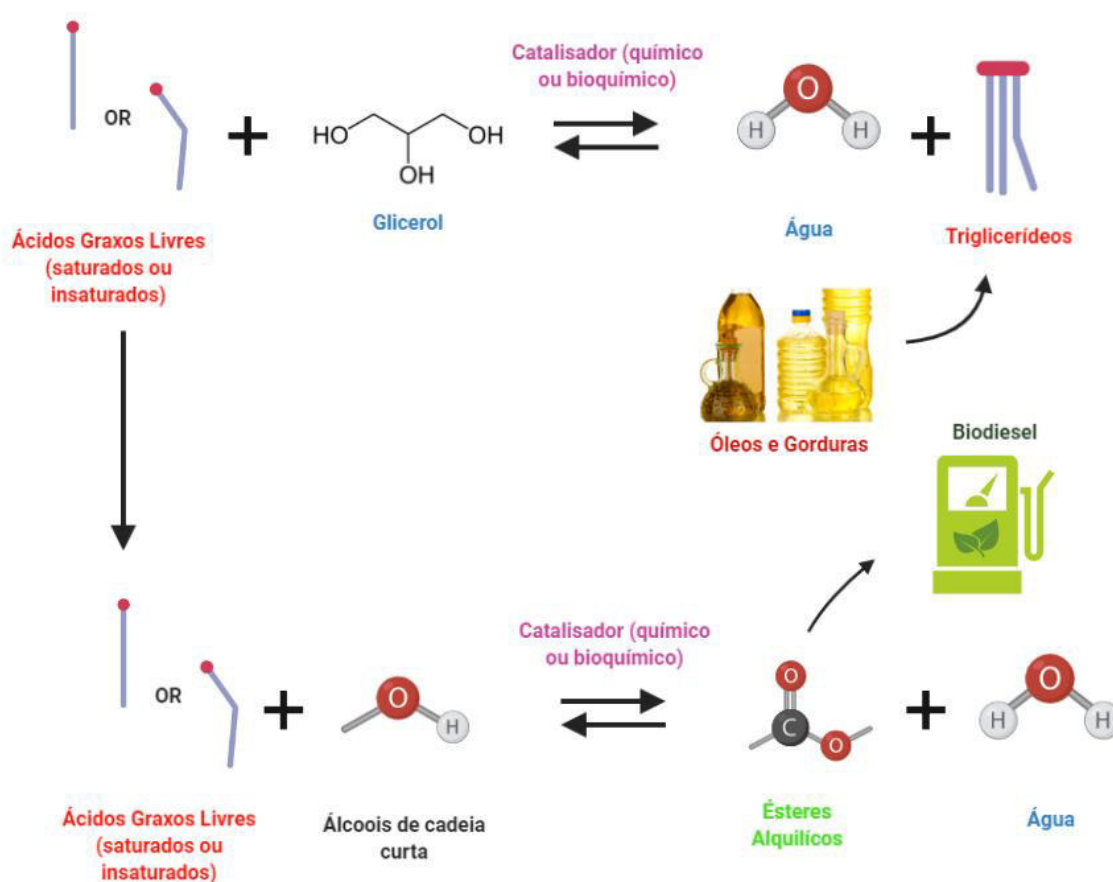
Figura 3: Reação de esterificação



Fonte: Autor

Outra rota utilizada para produção de biodiesel é a hidroesterificação. Pode ocorrer de duas formas tanto em duas etapas, reação de hidrólise seguida da reação de esterificação, como em uma única etapa, na qual a esterificação ocorre de forma imediata após a reação de hidrólise (COSTA et al., 2020). A Figura 4 detalha como ocorre a reação de hidroesterificação.

Figura 4: Reação de hidroesterificação



Fonte: Autor

Para a utilização de óleos residuais na produção de biodiesel, na qual possuem alto teor de AGLs, a aplicação de catalisadores básicos torna-se inviável devido a reação de saponificação que ocorrerá em paralelo retardando a reação para obtenção de ésteres alquílicos. Para a utilização de catalisadores ácidos se faz necessário altas temperaturas, longo tempo de reação, além de causar problemas de corrosão em equipamentos (AGUIEIRAS et al., 2014). As lipases aparecem como solução em frente aos problemas relacionados aos catalisadores químicos.

3.5 Catálise enzimática

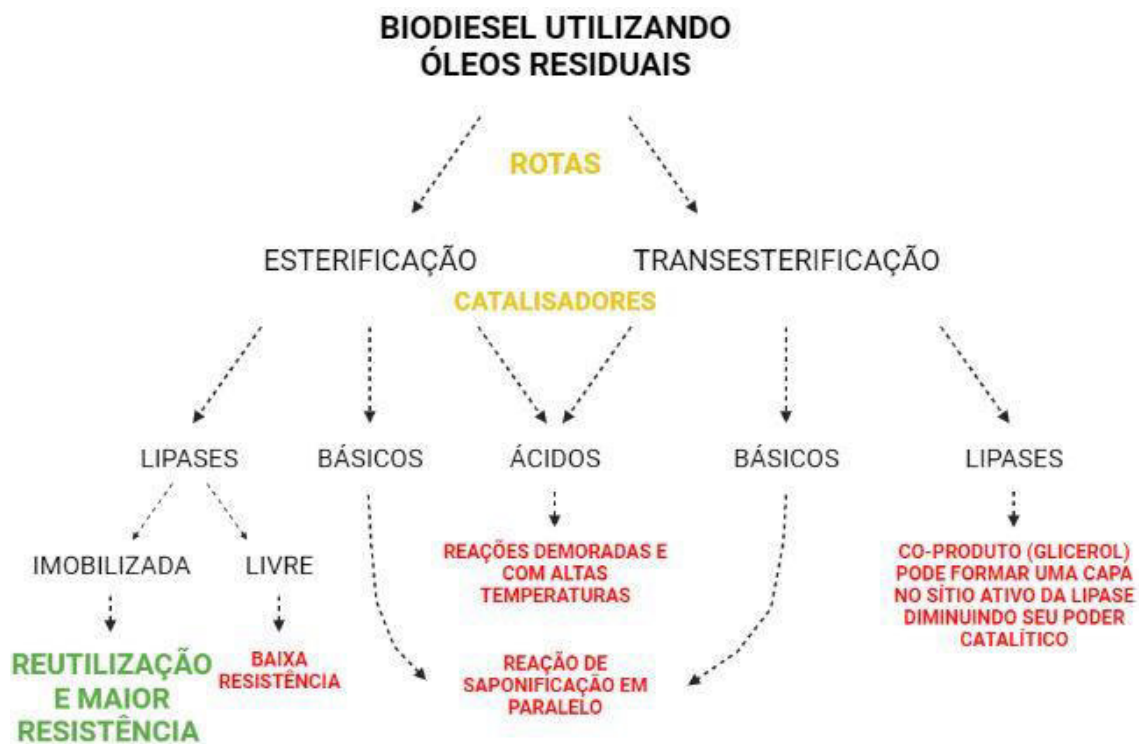
Enzimas capazes de catalisar reações de síntese de ésteres, são classificadas como lipases. As lipases, diferem em suas propriedades químicas e físicas conforme sua origem, e podem ser caracterizadas como restritas, quando se limitam a um substrato em particular, ou não restritas, quando podem atuar em diferentes substratos (GUMBYTĚ; MAKAREVIČIENĚ; SENDŽIKIENĚ, 2011). Em geral as lipases exigem condições mais leves de reação como baixa temperatura, são facilmente separadas do produto, e podem ser utilizadas em óleos e gorduras residuais e em reações de esterificação de AGLs (SINGH et al., 2021). São encontradas de forma livre ou imobilizadas, sendo a lipase livre cerca de 16 vezes mais baratas que as imobilizadas (GUO; SUN; LIU, 2020).

Apesar dos altos custos frente as lipases livres, as imobilizadas possuem vantagens como suportar condições reacionais mais intensas, por exemplo temperaturas mais elevadas, forças de cisalhamento e tolerar solventes orgânicos, que somadas a fácil recuperação do catalisador propicia a utilização dessa enzima em vários ciclos consecutivos (AMINI et al., 2017; CASTILLO LÓPEZ et al., 2015; CHOZHAVENDHAN et al., 2020). Pesquisas buscam suportes para imobilização enzimática com melhor custo-benefício, tendo como objetivo baratear a produção desses catalisadores (DUTRA et al., 2022).

Na reação de transesterificação a atividade catalítica das lipases imobilizadas podem ser limitadas, pois é possível que o subproduto dessa reação, o glicerol, forme um tipo de capa na enzima cobrindo seu sítio ativo e assim reduzindo sua capacidade catalítica (CAVALCANTE et al., 2021).

A esterificação de AGLs obtidos de óleos residuais, na presença de etanol, tendo como catalisador lipases imobilizadas aparece como uma ótima rota para produção de biodiesel, pois a reutilização da lipase somado ao baixo custo dos óleos residuais compensa o alto custo dessas enzimas possibilitando vários benefícios, um biodiesel mais limpo, descarte correto de resíduos, baratear o preço final do produto, entre outros. A Figura 5 indica as desvantagens das rotas mais convencionais para produção de biodiesel e a vantagem da utilização de lipases imobilizadas para esterificação de AGLs provenientes de óleos residuais.

Figura 5: Rotas convencionais para produção de biodiesel utilizando óleos residuais



Fonte: Autor

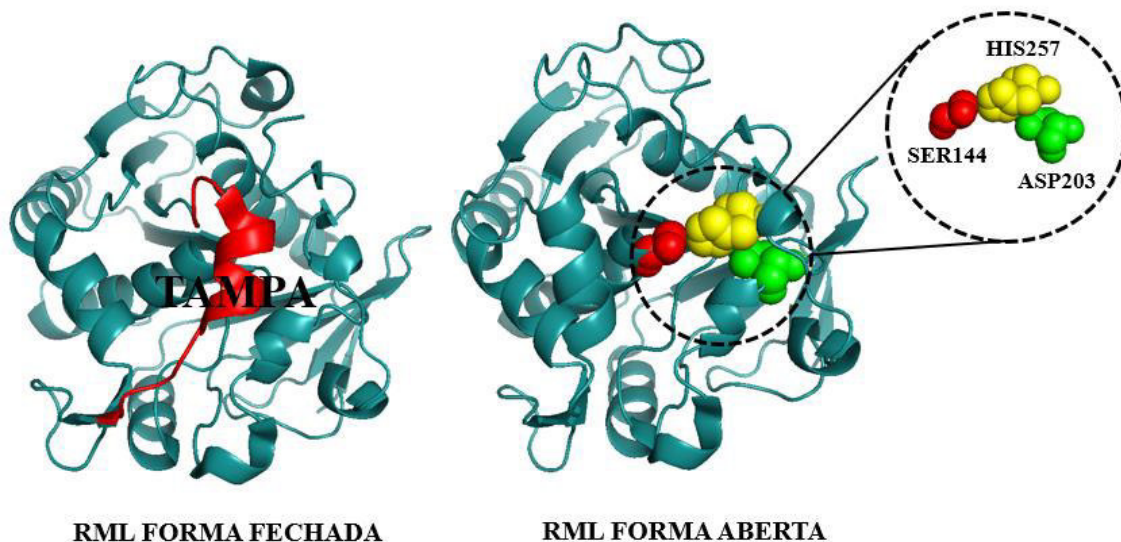
3.6 Lipase de *Rhizomucor miehei*

A lipase de *Rhizomucor miehei* trata-se de uma enzima extracelular que possui tamanho molecular de 31.600 Da (Dalton, unidade de massa atômica), caracterizada pela primeira vez por Seika (1973). Após primeiras aplicações na modificação de alimentos, ela seguiu para ser bastante utilizada na química orgânica, reações de hidrólise, reação de lactonização, síntese de isoniazida, entre outras aplicações, com destaque para seu uso na síntese de ésteres alquílicos que caracterizam biodiesel (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a). A estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei* possui uma conformação em α/β hidrolase composta por uma sequência de α hélices e folhas β pregueadas (BRADY et al., 1990). O seu sítio catalítico é formado por uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos serina144, aspartato203 e histidina257 (Figura 6). A tampa hidrofóbica da RML é formada a partir dos resíduos de aminoácidos serina82 até prolina96 (Figura 6) (BRADY et al., 1990; BRZOZOWSKI et al., 1991; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b). A forma estrutural da lipase de *Rhizomucor miehei* pode ser visualizada na Figura 6.

Figura 6: Representação cristalográfica da lipase de *Rhizomucor miehei*: Conformação

Fechada (código PDB: 3TGL); Conformação Aberta (código PDB: 4TGL) com resíduos do sítio catalítico SER144 (vermelho), ASP203 (verde), HIS257 (amarelo). As

estruturas foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) usando pymol versão educacional.



Fonte: Autor

Pode ser encontrada comercialmente tanto na forma livre como imobilizada na Novozymes com os nomes Palatase 2000 L e Lipozyme RM IM, respectivamente, sendo a Lipozyme RM IM imobilizada em suporte Duolite ES 562, que se refere a uma resina de troca aniônica fraca firmada em copolímeros de fenol-formaldeído (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a).

3.7 Planejamento de misturas

O uso de diferentes matérias-primas proporciona a não dependência do processo a um único insumo, tal fato quando pensado em grande escala traz um grande diferencial. Tratando-se das reações de obtenção do biodiesel, pode ser estudado a utilização de mistura de óleos ou AGLs, de catalisador e/ou álcoois.

Um planejamento de mistura de 3 fatores proporciona a análise da combinação de diferentes elementos através de uma superfície de resposta triangular, podendo assim identificar qual combinação obteve melhor resultado (MOURA JUNIOR et al., 2019; ROCHA et al., 2021).

3.8 Planejamento Taguchi

De acordo com MOREIRA et al. (2022), consistindo em processos enzimáticos a utilização do método Taguchi para determinar as melhores condições reacionais em um número reduzido de experimentos é importante pois dessa forma ocorre a economia de tempo e recursos.

O método Taguchi trata-se de um delineamento experimental avançado que possibilita estudar a covariância das variáveis, que na reação de biodiesel podem ser temperatura e/ou tempo de reação, razão molar, conteúdo de catalisador, rotação orbital para o caso da reação ocorrer em equipamentos com agitação orbital, frequência para o caso da reação ocorrer em um banho ultrassom, entre outros fatores. (ADEWALE; VITHANAGE; CHRISTOPHER, 2017; DA S. MOREIRA et al., 2022; KARABAS, 2013; KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018).

A metodologia propicia perceber variações resultantes de fatores de difícil controle, controláveis e incontroláveis (DA S. MOREIRA et al., 2022; MOREIRA et al., 2020b; ROCHA et al., 2021). A relação sinal-ruído (S/R), presente na metodologia, apresenta a intensidade dos fatores de controle e fature de ruído, o que diverge das metodologias tradicionais que não diferenciam estes fatores (KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018; ROCHA et al., 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O óleo residual da castanha-do-Pará e o óleo residual de babaçu foram obtidos em um mercado local, o óleo residual de frango foi obtido em um estabelecimento de venda de frango assado local. A lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (RML), Lipozyme® RM-IM, foi adquirida pela Novozymes A/S (Espanha). Álcool etílico (P.A 99,96%) e os outros reagentes usados foram obtidos da Vetec (São Paulo, Brasil), Synth (São Paulo, Brasil) e Dinâmica (São Paulo, Brasil). Os softwares STATISTICA® da StatSoft® versão 10.0 foi utilizado para elaboração dos planejamentos experimentais e o Excel 2016 da Microsoft® para a criação e manuseio de tabelas e gráficos.

4.2 Caracterização físico-química dos óleos residuais

4.2.1 Índice de Acidez

O índice de acidez, porcentagem em massa de ácidos graxos livres em relação a um ácido graxo específico, trata-se de uma característica do óleo que determina a qualidade da matéria-prima, quanto mais refinado o óleo menor o seu índice de acidez.

Buscando determinar o índice de acidez dos óleos residuais seguiu-se a metodologia indicada por Lutz (2008). Inicialmente pesou-se dois gramas do óleo residual de frango em um erlenmeyer de 125mL. Em seguida foi preparado uma solução de éter-álcool (2:1) com éter etílico e álcool etílico, que foi neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), de fator de correção de 1,0098. Adicionou-se 25mL dessa solução éter-álcool e três gotas de um agente indicador, solução alcoólica fenolftaleina 1%, ao erlenmeyer contendo a amostra do óleo e fez-se a titulação sendo a solução de NaOH o agente titulante.

Para calcular o índice de acidez da amostra foi utilizado a Equação 1, o procedimento descrito também foi adotado para os óleos residuais de babaçu e de castanha-do-Pará.

$$IA = \frac{v * f * 5,61}{P} \quad (1)$$

Sendo v o volume de NaOH utilizado para neutralizar a amostra em mililitros, f o fator de correção da solução de NaOH, p a massa da amostra de óleo em gramas, e IA o índice de acidez em mgKOH/g.

4.2.2 Viscosidade Cinemática

Utilizando a norma ASTM D445-14a determinou-se a viscosidade cinemática a 40 °C dos óleos residuais. Operando um viscosímetro modelo Visco Bath da Petrotest a temperatura de 40 °C, com capilar Cannon Fenske de S200 e constante igual à 0,1320 para o óleo, realizou-se o ensaio. Foi mantido o viscosímetro durante 15 minutos em um banho termostático, à 40 °C, até que ele alcançasse o equilíbrio térmico, após esse período com a ajuda de uma pêra o óleo foi transportado para o menisco superior e após a remoção da pêra foi cronometrado o tempo que a amostra levou para atingir o menisco inferior. Para calcular a viscosidade cinemática foi utilizado a Equação 2.

$$v = k * t \quad (2)$$

Sendo t o tempo que a amostra levou para sair do menisco superior e chegar ao menisco inferior, k a constante do tubo capilar, e v a viscosidade cinemática em mm²/s.

4.2.3 Densidade

Seguiu-se a norma ABNT NBR 14065 para determinação da densidade dos óleos a 25 °C e 40 °C, operando um densímetro digital modelo DMA 4500 da Anton Paar. Tal parâmetro está ligado ao tamanho da cadeia carbônica do alquiléter e com o número de insaturações na molécula.

4.3 Obtenção de ácidos graxos livres dos óleos residuais

Em uma reação de saponificação seguida de hidrólise ácida utilizando um sistema com banho ultrassom descrito na metodologia de Lima e Fernandes (2014) com modificações, foram obtidos ácidos graxos livres dos óleos residuais em estudo.

Inicialmente foi adicionado 50,21 g do óleo residual de castanha-do-Pará em um balão de fundo redondo o qual foi imerso no banho ultrassom estando a uma frequência de 25 kHz. Após o óleo atingir a temperatura de 50 °C foi acrescentado uma mistura alcoólica de Hidróxido de Potássio (KOH), composta por 10,11 g de KOH e 100 mL de álcool etílico.

Após 45 minutos em constante ação do banho ultrassônico na mistura do óleo com a solução alcoólica de Hidróxido de Potássio, o produto da etapa de saponificação foi diluído em uma solução de Ácido Clorídrico (HCl), composto por 20 mL de HCl e 67 mL de água, na qual essa diluição ocorreu até que a solução alcançasse pH próximo a 2,0, o qual foi avaliado utilizando papel universal indicador de pH (MANO; SEABRA, 1987).

Em seguida, a solução foi colocada em um funil de decantação de 500 mL, na qual após a separação em duas fases (fase aquosa e AGLs) a fase inferior

correspondente a fase aquosa foi removida. Os AGLs foram lavados diversas vezes com água destilada à temperatura de 40 °C até que atingisse um pH equivalente a 6. Por fim, os ácidos graxos foram transferidos para um béquer de 100 mL e aquecidos a uma temperatura de 80 °C por 10 minutos para remoção da umidade.

Tal procedimento também foi adotado para obtenção de ácidos graxos dos óleos residuais de babaçu e de frango. A determinação do índice de acidez seguiu a metodologia adotada por Lutz (2008).

4.4 Produção de ésteres etílicos de ácidos graxos

As reações de esterificação foram realizadas em erlenmeyers de 10mL com tampa comportando o catalisador e o substrato, formado pelos ácidos graxos livres e o etanol, e colocadas em uma Incubadora TE – 4200 onde foram programados o tempo, a rotação orbital e a temperatura de acordo com o planejamento estatístico a ser realizado.

Após término do tempo de reação especificado no planejamento as conversões foram obtidas através de análise do índice de acidez. Retirou-se 0,3 g da amostra (ésteres etílicos produzidos), foi adicionado 7,5 mL de álcool etílico, 3 gotas de fenolftaleína, e por fim titulada com a solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1M) (AGUIEIRAS et al., 2017). O índice de acidez da amostra foi calculado seguindo a Equação 3 (CAVALCANTI et al., 2018).

$$IA(mgKOH/g) = \frac{v * M * f * 56,11}{m} \quad (3)$$

A Equação 3 apresenta o cálculo para se obter o índice de acidez de uma amostra, onde IA é o índice de acidez da amostra, V é o volume titulado, M a molaridade da solução de NaOH, f o fator de correção da solução de NaOH, e m a massa da amostra.

$$Conversão(\%) = \frac{IA_B - IA_A}{IA_A} * 100 \quad (4)$$

A Equação 4 apresenta o cálculo para se obter a conversão em ésteres etílicos de uma amostra, onde IA_B é o índice de acidez da amostra sem o catalisador, e IA_A é o índice de acidez da amostra, com a presença do catalisador, na qual quer se obter a conversão em ésteres etílicos.

4.5 Planejamento de misturas para determinar melhor combinação de AGLs

Para determinar a melhor combinação de ácidos graxos livres um planejamento experimental para misturas com superfície de resposta triangular de três fatores foi realizado no software STATISTICA® 10.0, este software também foi usado para analisar os rendimentos das reações e obter uma superfície de resposta triangular. Os

parâmetros utilizados nas reações foram temperatura de 40 °C, razão molar 1:1 (ácidos graxos livres: álcool), conteúdo de biocatalisador equivalente a 1% da massa de ácidos graxos livres, tempo de 2 horas, e rotação orbital igual à 200 rpm. A Tabela 4 apresenta as combinações de AGLs utilizadas em cada reação.

Tabela 4: Reações do planejamento triangular de misturas para estudo das combinações de AGLs provenientes dos óleos residuais de babaçu, castanha-do-Pará e frango

Reação	AGLs Frango	AGLs Babaçu	AGLs Castanha-do-Pará
1	1,00	0,00	0,00
2	0,00	1,00	0,00
3	0,00	0,00	1,00
4	0,33	0,67	0,00
5	0,33	0,00	0,67
6	0,00	0,33	0,67
7	0,67	0,33	0,00
8	0,67	0,00	0,33
9	0,00	0,67	0,33
10	0,33	0,33	0,33

Fonte: Autor

4.6 Método Taguchi: planejamento experimental e análise estatística

Após determinar a melhor combinação de ácidos graxos, um planejamento experimental avançado pelo método Taguchi com matriz ortogonal padrão L9 (simboliza o quadrado latino e o número de experimentos, respectivamente) foi adotado para avaliar quatro fatores em três níveis a fim de verificar as melhores condições reacionais para a produção de éster etílico de ácido graxo. Os parâmetros analisados foram temperatura, razão molar (AGLs: álcool), conteúdo de biocatalisador e tempo, a faixa de variação de cada um deles foi determinado por estudos previamente feitos, a Tabela 5, gerada pelo software Statistica® 10.0, mostra esses fatores e seus respectivos níveis. A rotação orbital utilizada em todas as reações foi de 200 rpm, resultado determinado por estudos anteriormente realizados (MOREIRA et al., 2020c; MOURA JUNIOR et al., 2019; ROCHA et al., 2021). A Tabela 6 apresenta o número total de experimentos com suas respectivas condições reacionais.

Tabela 5: Níveis e fatores utilizados no planejamento

	Temperatura (°C)	Razão Molar (AGLs: Álcool)	Conteúdo de Biocatalisador (%*)	Tempo (h)
Nível 1	40	1:1	1	2
Nível 2	45	1:5	2	4
Nível 3	50	1:9	3	6

Fonte: Autor

* % em gramas da quantidade de ácidos graxos livres utilizado na reação

Tabela 6: Reações do planejamento Taguchi com suas respectivas condições reacionais

Reação	Temperatura (°C)	Razão Molar (AGLs: Álcool)	Conteúdo de Biocatalisador (%*)	Tempo (h)
1	40	1:1	1%	2
2	40	1:5	2%	4
3	40	1:9	3%	6
4	45	1:1	2%	6
5	45	1:5	3%	2
6	45	1:9	1%	4
7	50	1:1	3%	4
8	50	1:5	1%	6
9	50	1:9	2%	2

Fonte: Autor

* % em gramas da quantidade de ácidos graxos livres utilizado na reação

Utilizando o software Statistica® 10.0 realizou-se um estudo estatístico e delineamento experimental. A Tabela 6 apresenta o planejamento experimental junto das conversões obtidas e as relações S/R (sinal/ruído) calculadas utilizando os atributos da função “maior é melhor”, este estudo é feito para potencializar a resposta (conversão). A Equação 5 apresenta o cálculo para se obter o valor da razão S/R de cada experimento.

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

Na qual n representa a quantidade de experimentos para a combinação de níveis de fatores para quaisquer combinações de planejamento, i representa o total de repetições, e y_i simboliza as variáveis de resposta, conversão. Para determinar a razão S/R esperada para as condições ideais a fim de alcançar a máxima conversão prevista, utilizou-se a Equação 6 (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013).

$$S/R_{predicted} = \bar{S}/R + \sum_{j=1}^n (S/R_j - \bar{S}/R) \quad (6)$$

Em que n é a quantidade de fatores o processo de maneira significativa, S/R_j é a razão S/R no ponto ótimo para cada fator, e \bar{S}/R é a média aritmética de todas as relações S/R .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química dos óleos residuais

5.1.1 Índice de acidez

Os resultados das análises dos índices de acidez dos óleos residuais antes e depois da produção de AGLs são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Índice de acidez dos óleos residuais antes e depois da produção de AGLs

Óleo residual	Índice de acidez inicial (mgKOH/g)	Índice de acidez após produção de AGLs (mgKOH/g)
Babaçu	4,97	178,50
Castanha-do-Pará	15,67	181,57
Frango	21,45	184,24

Fonte: Autor

O resultado do índice de acidez dos óleos residuais condiz com o esperado para essas matérias-primas por se tratar de recursos residuais, apresentando baixa qualidade. Tal fato foi notado por diversos autores na literatura, por exemplo Moreira et al. (2020) que estudaram o óleo residual de babaçu e constataram índice de acidez igual à 4,85 mgKOH/g, Moura Junior et al. (2019) obtiveram para o óleo residual de castanha-do-Pará índice de acidez equivalente à 18,80 mgKOH/g, e Hochscheidt et al. (2020) ao trabalharem com a gordura residual de frango alcançaram índice de acidez de 8,62 mgKOH/g.

A metodologia adotada para produção de AGLs foi eficaz para as três amostras, tal sucesso foi comprovado devido ao aumento no índice de acidez apontado após a reação de saponificação seguida de hidrólise ácida. Por se tratar de uma reação de esterificação por catálise enzimática o alto índice de acidez não traz impactos negativos a esse procedimento, o contrário de uma reação utilizando catalisador alcalino que acarretaria a formação de sais de AGLs que ocasionam emulsão no processo de lavagem do biodiesel, devido ao meio básico (SANTOS, 2016).

5.1.2 Viscosidade cinemática

Ao analisar a viscosidade cinemática dos óleos residuais à 40 °C foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Viscosidade cinemática dos óleos residuais à 40 °C

Óleo residual	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Viscosidade cinemática na literatura (mm ² /s)
---------------	--	--

Babaçu	6,70	3,96 (MOREIRA et al., 2020c)
Castanha-do-Pará	31,86	41,51 (SANTOS et al., 2013)
Frango	37,85	36,91 (ROCHA et al., 2021)

Fonte: Autor

Observa-se que o óleo residual com menor viscosidade foi de babaçu e o mais viscoso foi o óleo residual de frango. Os resultados obtidos se mostram próximos aos encontrados na literatura, sendo a viscosidade cinemática do óleo residual de castanha-do-Pará o resultado mais distinto. Tal parâmetro está relacionado a saturação dos AGLs presentes no óleo e o tamanho da cadeia carbônica, quanto maior o tamanho da cadeia carbônica e do número de insaturações existentes no óleo maior a viscosidade (SANTOS, 2016).

5.1.3 Densidade

As densidades dos óleos residuais à 25 °C e 40 °C, determinadas nas análises, encontram-se na Tabela 9 junto com dados obtidos na literatura para a densidade à 25 °C referente aos óleos estudados.

Tabela 9: Densidade dos óleos residuais à 25 °C e 40 °C

Óleo residual	Densidade à 25 °C (g/cm ³)	Densidade à 25 °C na literatura (g/cm ³)	Densidade à 40 °C (g/cm ³)
Babaçu	0,88	0,92 (BAUER et al., 2020; MOREIRA et al., 2020c)	0,87
Castanha-do-Pará	0,91	0,96 (SANTOS et al., 2013)	0,90
Frango	0,92	0,92 (ROCHA et al., 2021)	0,91

Fonte: Autor

Observou-se que a amostra que apresentou menor densidade foi o óleo residual de babaçu. Comparando com os dados presentes na literatura, os óleos residuais de babaçu e castanha-do-Pará apresentaram densidade menor que os determinados por Bauer et al. (2020) e Moreira et al. (2020) para o óleo residual de babaçu e Santos et al. (2013) para o óleo de castanha-do-Pará, e o óleo residual de frango obteve o mesmo resultado apresentado por Rocha et al. (2021), como pode ser visto na Tabela 9. Além de sofrer impacto com a alteração da temperatura, tal parâmetro também indica o grau de insaturação do óleo e é inversamente proporcional ao peso médio das moléculas dos ácidos graxos presentes no óleo (SANTOS, 2016).

5.2 Planejamento de misturas para determinar melhor combinação de AGLs

Observando a Tabela 10, constata-se que a melhor combinação de AGLs é a presente na reação 6, formada por 33% de AGLs do óleo residual de babaçu e 67% de

AGLs do óleo residual de castanha-do-Pará, onde obteve $71,04 \pm 3,56\%$ de conversão em ésteres etílicos. A outra combinação destes AGLs, presente na reação 9, apresentou conversão de $69,14 \pm 3,46\%$, os outros resultados que obtiveram melhores conversões foram os das reações 2 ($58,93 \pm 2,95\%$) e 3 ($67,36 \pm 3,37\%$), compostos por 100% de AGLs Babaçu e 100% AGLs Castanha-do-Pará, respectivamente. O que implica afirmar que os AGLs dos óleos residuais de babaçu e castanha-do-Pará obtiveram os melhores resultados para produção de ésteres etílicos nas condições reacionais de temperatura à 40 °C, razão molar 1:1 (AGLs: álcool), conteúdo de biocatalisador equivalente a 1% da massa de AGLs, 2 horas de duração, e rotação orbital igual à 200 rpm.

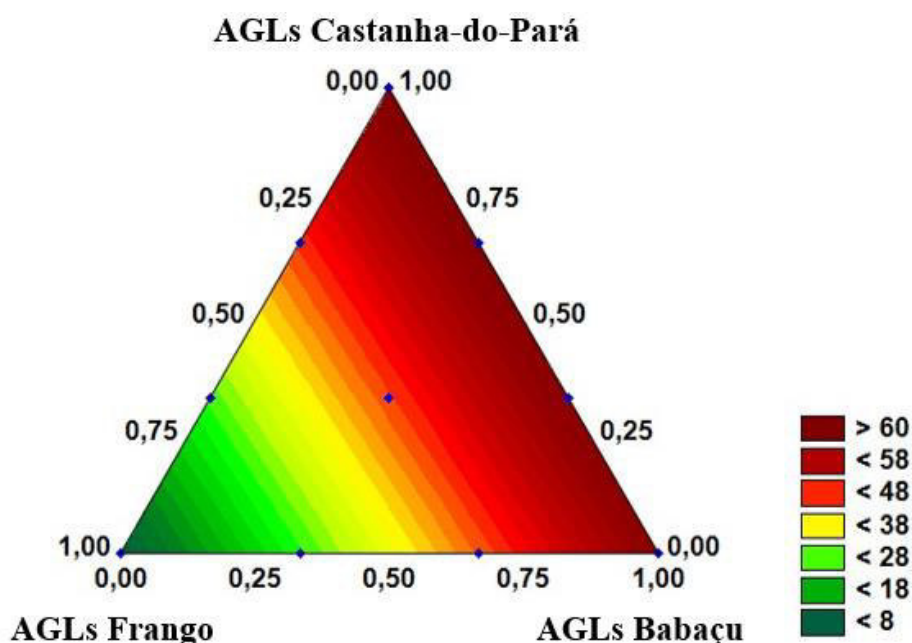
Tabela 10: Resultados do planejamento triangular de misturas

Reação	AGLs Frango	AGLs Babaçu	AGLs Castanha-do-Pará	Conversão (%)
1	1,00	0,00	0,00	$13,01 \pm 0,66$
2	0,00	1,00	0,00	$58,93 \pm 2,95$
3	0,00	0,00	1,00	$67,36 \pm 3,37$
4	0,33	0,67	0,00	$44,46 \pm 2,23$
5	0,33	0,00	0,67	$42,14 \pm 2,11$
6	0,00	0,33	0,67	$71,04 \pm 3,56$
7	0,67	0,33	0,00	$25,87 \pm 1,30$
8	0,67	0,00	0,33	$20,75 \pm 1,04$
9	0,00	0,67	0,33	$69,14 \pm 3,46$
10	0,33	0,33	0,33	$42,60 \pm 2,13$

Fonte: Autor

A Figura 7 apresenta uma superfície de contorno triangular formada pelos resultados das conversões obtidas, onde comprova a afirmação apresentada anteriormente, referente aos bons resultados obtidos pelos AGLs dos óleos residuais de babaçu e castanha-do-Pará, e complementa mostrando que os AGLs do óleo residual de Frango não atingiu resultados satisfatórios.

Figura 7: Superfície de contorno do planejamento triangular feito na temperatura de 40 °C, tempo de 2 horas, rotação orbital de 200 rpm, conteúdo de biocatalisador igual à 1% da massa de AGLs e razão molar 1:1 (AGLs: álcool)



Fonte: Autor

Em seus estudos Rocha et al. (2021) obtiveram 14,60% de conversão em ésteres etílicos dos AGLs provenientes do óleo residual de frango utilizando a lipase imbolizada Novozyme® RML-IM na temperatura de 30 °C, tempo de reação de 1 hora, rotação orbital de 150 rpm, razão molar 1:1 (AGLs: álcool), e conteúdo de biocatalisador equivalente à 10% da massa de AGLs, tal resultado se mostra bastante semelhante ao obtido nesse trabalho, conversão de $13,01 \pm 0,66\%$ utilizando apenas AGLs do óleo residual de frango, comprovando a baixa afinidade da lipase de *Rhizomucor miehei* com essa matéria-prima (ROCHA et al., 2021).

Utilizando a lipase Lipozyme® RM-IM como catalisador na esterificação dos AGLs do óleo de Castanha-do-Pará, Moura Junior et al. (2019) alcançaram 88,14% de conversão na temperatura de 48 °C, razão molar 1:18 (AGLs: álcool), durante 4 horas de reação, rotação orbital de 200 rpm, e conteúdo de biocatalisador equivalente à 14% da massa de AGLs, o que confirma a compatibilidade dessa lipase com os AGLs do óleo de castanha-do-Pará (MOURA JUNIOR et al., 2019).

Moreira et al. (2020a) conseguiram 81,70% de conversão em ésteres etílicos utilizando AGLs do óleo residual de babaçu e a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em nanopartículas magnéticas nas condições reacionais de razão molar 1:1 (AGLs: álcool), 6 horas de reação, 40 °C, e conteúdo de biocatalisador equivalente à 5% da massa de AGLs, o que comprova a atratividade da lipase quando utilizada em conjunto com essa matéria-prima (MOREIRA et al., 2020b).

A mistura dos AGLs dos óleos residuais de babaçu e castanha-do-Pará por propiciarem boas conversões independente da mistura, possibilita a independência de ser utilizado apenas uma combinação de proporção, por exemplo, caso uma delas se valorize bastante economicamente a ponto de inviabilizar sua utilização na proporção que possui melhor conversão, a troca dessa proporção, para evitar o aumento nos custos, pode ser uma solução frente este problema.

5.3 Método Taguchi: planejamento experimental e análise estatística

A combinação de AGLs utilizado no planejamento Taguchi foi de 33% de AGLs do óleo residual de babaçu e 67% de AGLs do óleo residual de castanha-do-Pará com base nos resultados obtidos no planejamento de misturas.

Analisando os resultados presentes na Tabela 11 verifica-se que o melhor resultado foi obtido utilizando as condições reacionais presentes na reação 7, 50 °C, 2 h, 3% de conteúdo de biocatalisador, razão molar 1:1 (AGLs: álcool), na qual obteve conversão em ésteres etílicos equivalente à $78,93 \pm 3,95\%$ e razão sinal-ruído de 37,95, quanto maior esse indicador maior a conversão. Comparando com o resultado obtido por Silva, Peixoto e Freire (2018), que obteve conversão de 100% da mistura de AGLs (composto pelos ácidos linoléico, láurico, oleico, esteárico e palmítico) em ésteres metílicos sob as condições reacionais de 3 horas de reação e temperatura equivalente a 120 °C, é possível observar que apesar da conversão em ésteres etílicos do presente estudo apresentar um valor de conversão inferior, o resultado obtido ocorreu em condições reacionais mais brandas, e proporcionou a utilização de recursos residuais.

Tabela 11: Resultados do planejamento Taguchi

Reação	Temperatura (°C)	Razão Molar (AGLs: álcool)	Conteúdo de Biocatalisador (%*)	Tempo (h)	Conversão (%)	S/R
1	40	1:1	1%	2	71,04 ± 3,56	37,03
2	40	1:5	2%	4	52,79 ± 2,64	34,45
3	40	1:9	3%	6	30,45 ± 1,53	29,67
4	45	1:1	2%	6	75,03 ± 3,76	37,50
5	45	1:5	3%	2	66,78 ± 3,34	36,49
6	45	1:9	1%	4	5,89 ± 0,30	15,40
7	50	1:1	3%	4	78,93 ± 3,95	37,95

8	50	1:5	1%	6	23,17 ± 1,16	27,30
9	50	1:9	2%	2	7,70 ± 0,39	17,73

Fonte: Autor

* % em gramas da quantidade de AGLs utilizado na reação

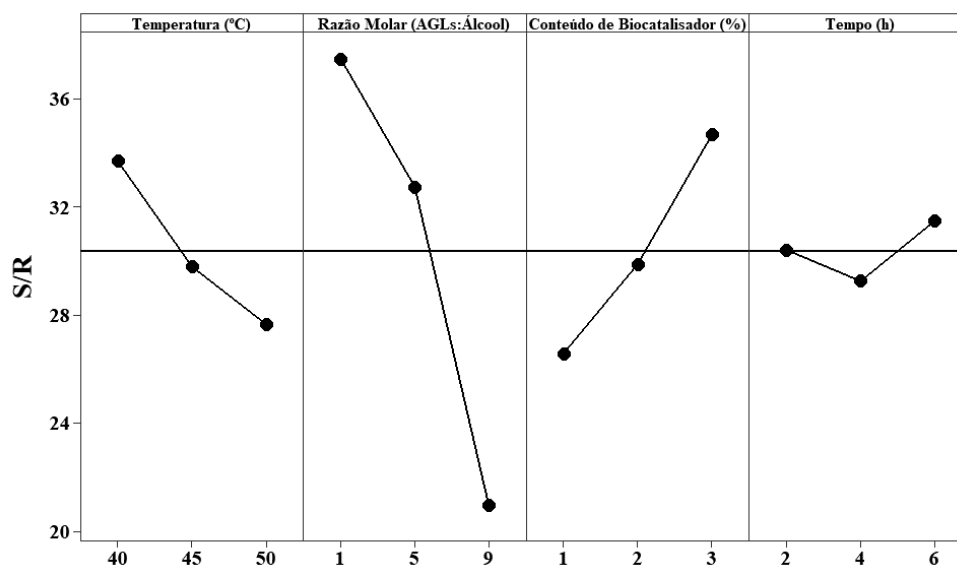
Buscando determinar os melhores níveis referente as variáveis de reação a função “maior é melhor” foi utilizada. A Tabela 12 apresenta os valores da razão sinal-ruído para os níveis de cada fator. Como pode ser visto na Tabela 12 e constatado na Figura 8, os níveis que apresentaram maior razão sinal-ruído são aqueles que proporcionam maior conversão, ou seja, para temperatura de reação o nível 1 (40 °C), nível 1 para razão molar (1:1), nível 3 para o conteúdo de biocatalisador (3%), e para o tempo de reação nível 3 (6 h), para tais condições a conversão teórica foi de 90,77 ± 4,54% sendo a razão sinal-ruído equivalente a 46,23.

Tabela 12: Resposta para razões sinal-ruído

Níveis	Temperatura	Razão Molar	Conteúdo de Biocatalisador	Tempo
1	33,72	37,49	26,58	30,42
2	29,80	32,75	29,90	29,27
3	27,66	20,93	34,70	31,49
Delta	6,06	16,56	8,13	2,23
Ranking	3	1	2	4

Fonte: Autor

Figura 8: Relação S/R para temperatura, razão molar, conteúdo de biocatalisador e tempo para otimização de produção de ésteres etílicos



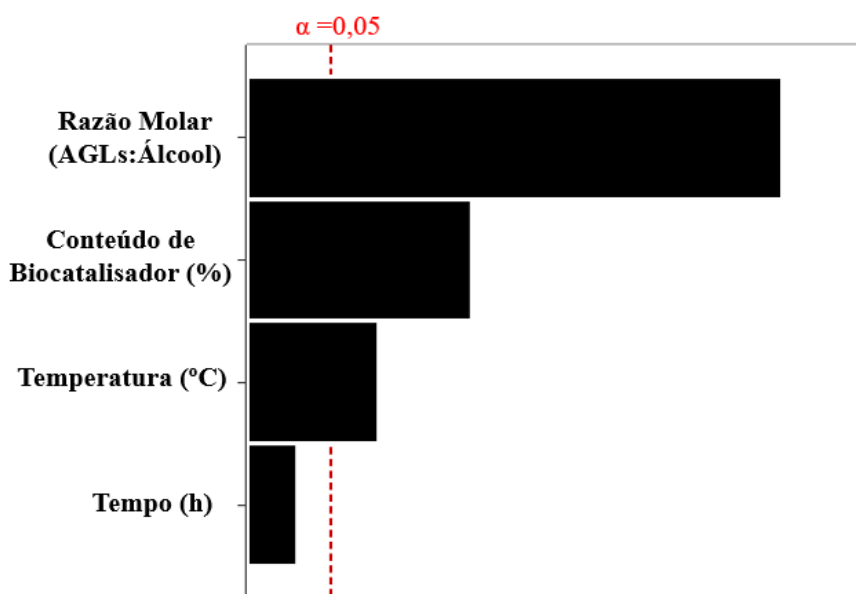
Fonte: Autor

A Equação 7 apresenta a equação de regressão linear que tem como resultado a conversão, e as variáveis são os parâmetros reacionais. Observa-se que ao aumentar a temperatura, razão molar ou tempo ocorre um impacto negativo a conversão, e para o conteúdo de biocatalisador ocorre a análise inversa, pois ele se apresenta como diretamente proporcional a conversão, este fato também foi notado por Moreira et al. (2020a), pois ao aumentar a porcentagem de conteúdo de biocatalisador consequentemente maior parte do substrato seria catalisado pelo sítio ativo da lipase ((DURAIARASAN et al., 2016; MOREIRA et al., 2020b). Analisando os coeficientes que multiplicam cada fator nota-se que o impacto da temperatura e do tempo de reação na conversão é menor comparado a razão molar e ao conteúdo de biocatalisador.

$$\begin{aligned}
 & \text{Conversão (\%)} && (7) \\
 & = 130,4 - [1,483 * \text{Temperatura (}^\circ\text{C)}] \\
 & - [7,540 * \text{Razão Molar (AGLs: Álcool)}] \\
 & + [12,68 * \text{Conteúdo de Biocatalisador (\%)}] \\
 & - [1,406 * \text{Tempo (h)}]
 \end{aligned}$$

Os dados apresentados na Tabela 12 que mostra o ranking de influência dos parâmetros na conversão, também pode ser notado no gráfico Pareto presente na Figura 9. Como pode ser observado, a razão molar é o parâmetro que mais influenciou, seguido pelo conteúdo de biocatalisador, a temperatura da reação aparece como terceiro, e por último o tempo, sendo os três primeiros fatores classificados como estatisticamente significativos por possuírem alfa maior que 0,05.

Figura 9: Gráfico Pareto



Fonte: Autor

A Tabela 13 apresenta a Análise de Variância (ANOVA) na qual também pode ser verificado o nível de significância dos fatores, sendo os fatores classificados como estatisticamente significantes os que apresentam *p*-valor menor que 0,05, totalizando 3. A significância do fator indica que sua variação influencia na conversão, com isso tem-se que quanto maior o número de fatores com esta característica mais preciso e eficaz no seu objetivo foi o estudo estatístico. Tal fato demonstra que o planejamento Taguchi foi eficaz no estudo dos parâmetros reacionais pois apresentou um número maior de fatores significativos comparado ao trabalho de Moreira et al. (2020a) que estudaram a influência dos parâmetros reacionais na esterificação dos AGLs do óleo residual de babaçu e obtiveram 1 fator estatisticamente significativo. Além disso é observado que o fator de maior contribuição é a razão molar, apresentando contribuição de 79,44%, seguido do conteúdo de biocatalisador com contribuição de 14,03%.

Tabela 13: ANOVA para parâmetros que afetam a esterificação da mistura de AGLs dos óleos residuais de babaçu e castanha-do-Pará

Fator	GL	SS	MS	<i>F</i> -valor	<i>p</i> -valor*	Contribuição (%)
Temperatura (°C)	1	329,75	28,33	18,55	0,013	4,80
Razão Molar (AGLs: álcool)	1	5457,75	218,13	307,10	0,000	79,44
Conteúdo de Biocatalisador (%)	1	964,19	50,08	54,25	0,002	14,03
Tempo (h)	1	47,43	3,72	2,67	0,178	0,69
Erro	4	71,09	17,77			1,03

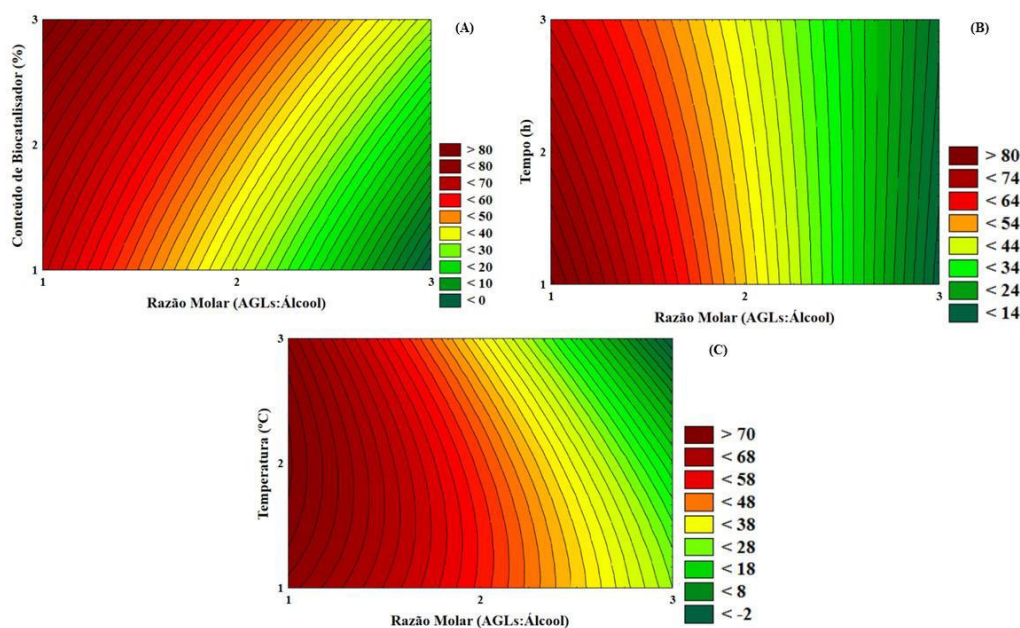
Total	8	6870,21	100,00
-------	---	---------	--------

Fonte: Autor

*Significa que um intervalo de confiança de 95% reflete um nível de significância $< 0,05$.

A Figura 10 apresenta um quadro onde exibe gráficos de superfície de contorno que analisa a razão molar versus os demais fatores, onde fica ainda mais evidente o impacto da razão molar na conversão da mistura de AGLs em ésteres etílicos comparado aos outros fatores, quanto menor a razão molar maior a conversão.

Figura 10: Superfícies de contorno para esterificação da mistura de AGLs dos óleos residuais de babaçu e castanha-do-Pará. (A) Conteúdo de biocatalisador (%) versus razão molar (AGLs: álcool). (B) Tempo (h) versus razão molar (AGLs: álcool). Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) versus razão molar (AGLs: álcool)



Fonte: Autor

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo analisar a melhor combinação de ácidos graxos livres obtidos dos óleos residuais de babaçu, frango e castanha-do-Pará para produção de ésteres etílicos (biodiesel) e a determinação dos parâmetros reacionais que propiciam um melhor rendimento. Além de evidenciar as vantagens de utilizar matérias-primas residuais para a produção de biodiesel e buscar diminuir os custos para a obtenção desta fonte de energia renovável.

Ao analisar as características físico-químicas dos óleos residuais estudados, tem-se que os índices de acidez das amostras retratam suas características residuais apresentando altos valores. O óleo residual de frango apresentou os maiores valores de densidade e viscosidade cinemática, acompanhado pelo óleo residual de castanha-do-Pará, sendo o óleo de babaçu o que apontou menores valores para tais parâmetros.

Buscando analisar a melhor mistura dos AGLs dos óleos residuais foi adotado um planejamento de misturas nas condições reacionais de 40 °C, conteúdo de biocatalisador igual à 1% da massa de AGLs, razão molar 1:1 (AGLs: álcool) e 2h de reação, que apontou a mistura de 67% de AGLs do óleo residual de castanha-do-Pará e 33% do óleo residual de babaçu como sendo a melhor combinação, conversão de $71,04 \pm 3,56\%$ em ésteres etílicos. A mistura de 33% de AGLs do óleo residual de castanha-do-Pará e 67% do óleo residual de babaçu obteve a segunda melhor combinação, apresentando $69,14 \pm 3,46\%$ de conversão em ésteres etílicos. Os AGLs do óleo residual de frango não apresentaram boas conversões frente as outras duas matérias-primas. Adotar a mistura de AGLs de dois óleos propicia a não dependência de uma única matéria-prima principalmente quando essa mistura aplicada em diferentes proporções obtém resultados semelhantes.

Para determinar as melhores condições reacionais para a mistura de AGLs que apresentou melhor conversão no planejamento de misturas, 67% de AGLs do óleo residual de castanha-do-Pará e 33% do óleo residual de babaçu, um planejamento Taguchi foi empregado e obteve uma conversão em ésteres etílicos de $78,93 \pm 3,95\%$ nas condições de 50 °C, 3% de conteúdo de biocatalisador, razão molar 1:1 (AGLs: álcool) e em 2 h de reação. Após analisar os resultados foi determinado pelo software Statistica as melhores condições reacionais, sendo elas 40 °C, 3% de conteúdo de biocatalisador, razão molar 1:1 (AGLs: álcool) e em 6 h de reação, apresentando um rendimento teórico de $90,77 \pm 4,54\%$. O planejamento Taguchi apontou três parâmetros (razão molar, temperatura e conteúdo de biocatalisador) como estatisticamente significativos, o que

implica afirmar que o estudo foi eficaz em analisar as condições reacionais para a esterificação da mistura de AGLs dos óleos de babaçu e castanha-do-Pará.

Portanto, tem-se que a mistura de AGLs dos óleos residuais de babaçu e castanha-do-Pará utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada aparece como alternativa as rotas convencionais de produção de biodiesel (que utilizam matérias-primas de primeira geração e catalisadores químicos) tendo como principais vantagens o baixo custo para obtenção das matérias-primas, além da não dependência exclusiva de uma única proporção de mistura trazendo flexibilidade ao processo de produção, e de uma reação mais limpa e com condições reacionais mais suaves devido a utilização do catalisador enzimático.

REFERÊNCIAS

- ADEWALE, P.; VITHANAGE, L. N.; CHRISTOPHER, L. Optimization of enzyme-catalyzed biodiesel production from crude tall oil using Taguchi method. **Energy Conversion and Management**, v. 154, p. 81–91, 15 dez. 2017.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, 1 nov. 2014.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from *Rhizomucor miehei* grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions. **Renewable Energy**, v. 113, p. 112–118, 2017.
- ALMANSA, A. R. et al. Micronutrient dynamics after thermal pretreatment of olive mill solid waste. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 337–341, set. 2015.
- AMANI, M. A. et al. Biodiesel production from *Phoenix dactylifera* as a new feedstock. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 40–43, maio 2013.
- AMINI, Z. et al. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 339–353, 2017.
- ARTEAGA, G. E. et al. Systematic experimental designs for product formula optimization. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, n. 8, p. 243–254, ago. 1994.
- ARUMUGAM, A.; PONNUSAMI, V. Production of biodiesel by enzymatic transesterification of waste sardine oil and evaluation of its engine performance. **Heliyon**, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14065: Destilados de petróleo e óleos viscosos — Determinação da densidade e da densidade relativa pelo densímetro digital**. Rio de Janeiro, 2013.
- ASTM D445-14^a. **Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and the Calculation of Dynamic Viscosity)**, ASTM International, West Conshohocken, 2014.
- ATABANI, A. E. et al. **A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, maio 2012.
- ATABANI, A. E. et al. Fuel Properties of *Croton megalocarpus*, *Calophyllum inophyllum*, and *Cocos nucifera* (coconut) Methyl Esters and their Performance in a Multicylinder Diesel Engine. **Energy Technology**, v. 1, n. 11, p. 685–694, 1 nov. 2013.
- BAUER, L. C. et al. Physicochemical and thermal characterization of babassu oils (*Orbignya phalerata* Mart.) obtained by different extraction methods. **Food Research International**, v. 137, 1 nov. 2020.
- BINHAYEEDING, N. et al. Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 174–185, 1 ago. 2020.

BRADY, L. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 767–770, fev. 1990.

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.

CARVALHO, N. B. et al. **How likely is Brazil to achieve its NDC commitments in the energy sector? A review on Brazilian low-carbon energy perspectives Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, 1 nov. 2020.

CASTILLO LÓPEZ, B. et al. Production of biodiesel from vegetable oil and microalgae by fatty acid extraction and enzymatic esterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 706–711, 1 jun. 2015.

CASTRO, I. A. et al. Simultaneous optimization of response variables in protein mixture formulation: constrained simplex method approach. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 103–110, fev. 2003.

CAVALCANTE, F. T. T. et al. **Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis Fuel** Elsevier Ltd, 15 mar. 2021.

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, 1 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, 5 jan. 2013.

CHAVAN, S.; GAIKWAD, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of bamboo biomass for enhanced saccharification of cellulose through Taguchi orthogonal design. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 104807, fev. 2021.

CHOZHAVENDHAN, S. et al. **A review on influencing parameters of biodiesel production and purification processes Current Research in Green and Sustainable Chemistry** Elsevier B.V., 1 fev. 2020.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.

CORNELL, J. A.; DENG, J. C. Combining Process Variables and Ingredient Components in Mixing Experiments. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 3, p. 836–843, maio 1982.

COSTA, M. J. et al. Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 157, 1 nov. 2020.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization Enzyme and Microbial Technology**, 10 set. 2011.

DA S. MOREIRA, K. et al. Taguchi design-assisted co-immobilization of lipase A and B from *Candida antarctica* onto chitosan: Characterization, kinetic resolution application,

and docking studies. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 177, p. 223–244, jan. 2022.

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, 1 abr. 2018.

DIAS, J. M. et al. Biodiesel production using calcium manganese oxide as catalyst and different raw materials. **Energy Conversion and Management**, v. 65, p. 647–653, jan. 2013.

DURAIARASAN, S. et al. Direct conversion of lipids from marine microalga *C. salina* to biodiesel with immobilised enzymes using magnetic nanoparticle. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 1393–1398, 1 mar. 2016.

DUTRA, L. DA S. et al. How the biodiesel from immobilized enzymes production is going on: An advanced bibliometric evaluation of global research. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 153, p. 111765, jan. 2022.

ESAN, A. O.; ADEYEMI, A. D.; GANESAN, S. **A review on the recent application of dimethyl carbonate in sustainable biodiesel production** *Journal of Cleaner Production* Elsevier Ltd, 1 jun. 2020.

FAUZAN, N. A. et al. Physicochemical properties evaluation of *Calophyllum inophyllum* biodiesel for gas turbine application. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 32, p. 56–61, 1 abr. 2020.

FERRERO, G. O.; FABBA, E. M. S.; EIMER, G. A. Biodiesel production from alternative raw materials using a heterogeneous low ordered biosilicified enzyme as biocatalyst. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 67, 15 dez. 2021.

GOH, B. H. H. et al. **Progress in utilisation of waste cooking oil for sustainable biodiesel and biojet fuel production** *Energy Conversion and Management* Elsevier Ltd, 1 nov. 2020.

GULDHE, A. et al. **Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, 2015.

GUMBYTĖ, M.; MAKAREVIČIENĖ, V.; SENDŽIKIENĖ, E. **Esterification of By-products of Biodiesel Fuel Production with Methanol and Technical Glycerol Using Biocatalysts** *Environmental Research, Engineering and Management*. Disponível em: <<http://erem.ktu.lt>>.

GUO, J.; SUN, S.; LIU, J. Conversion of waste frying palm oil into biodiesel using free lipase A from *Candida antarctica* as a novel catalyst. **Fuel**, v. 267, 1 maio 2020.

GUPTA, J.; AGARWAL, M.; DALAI, A. K. **An overview on the recent advancements of sustainable heterogeneous catalysts and prominent continuous reactor for biodiesel production** *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* Korean Society of Industrial Engineering Chemistry, 25 ago. 2020.

HOCHSCHEIDT, B. D. et al. Neutralization or esterification as input improvement techniques for biodiesel production. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 2, p. 325–334, 2020.

HOEKMAN, S. K. et al. **Review of biodiesel composition, properties, and specifications** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, jan. 2012.

JACOB, J. J.; SUTHINDHIRAN, K. Immobilisation of lipase enzyme onto bacterial magnetosomes for stain removal. **Biotechnology Reports**, v. 25, 1 mar. 2020.

JENA, P. C. et al. Biodiesel production from mixture of mahua and simarouba oils with high free fatty acids. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 8, p. 1108–1116, ago. 2010.

KARABAS, H. Biodiesel production from crude acorn (*Quercus frainetto* L.) kernel oil: An optimisation process using the Taguchi method. **Renewable Energy**, v. 53, p. 384–388, maio 2013.

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, 1 abr. 2018.

LIMA, L. P.; FERNANDES, F. A. N. AVALIAÇÃO DO USO DE ULTRASSOM NA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VIA REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO SEGUIDA DE HIDRÓLISE ÁCIDA. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - (COBEQ) 2014 [Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**, p. 10889–10896, 19 out. 2014.

LUQUE, R.; CAMPELO, J. M.; CLARK, J. H. Introduction: an overview of biofuels and production technologies. In: **Handbook of Biofuels Production**. Elsevier, 2011. p. 3–12.

LUTZ, I. A. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

MALLAH, T. A.; SAHITO, A. R. Optimization of castor and neem biodiesel blends and development of empirical models to predicts its characteristics. **Fuel**, v. 262, 15 fev. 2020.

MANO, E. B.; SEABRA, A. P. **Práticas de Química Orgânica**. Editora EDART, 1987.

MARCHI, J. et al. Mixture Design and Response Surface Analysis of Densification of Silicon Carbide Ceramics with (SiO_2 - Dy_2O_3 - Al_2O_3) Additives. **International Journal of Applied Ceramic Technology**, mar. 2009.

MARTÍNEZ, J. D. et al. **Waste tyre pyrolysis - A review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, 2013.

MATHEW, G. M. et al. **Recent advances in biodiesel production: Challenges and solutions** *Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 10 nov. 2021.

MELO, E. et al. First study on the oxidative stability and elemental analysis of babassu (*Attalea speciosa*) edible oil produced in Brazil using a domestic extraction machine. **Molecules**, v. 24, n. 23, 21 nov. 2019.

MOFIJUR, M. et al. Comparative evaluation of performance and emission characteristics of *Moringa oleifera* and Palm oil based biodiesel in a diesel engine. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 78–84, fev. 2014.

MOREIRA, K. DA S. et al. Lipase From *Rhizomucor miehei* Immobilized on Magnetic Nanoparticles: Performance in Fatty Acid Ethyl Ester (FAEE) Optimized Production by the Taguchi Method. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 30 jun. 2020a.

MOREIRA, K. DA S. et al. Lipase From *Rhizomucor miehei* Immobilized on Magnetic Nanoparticles: Performance in Fatty Acid Ethyl Ester (FAEE) Optimized Production by the Taguchi Method. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 30 jun. 2020b.

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, 1 abr. 2020c.

MOURA JUNIOR, L. S. et al. **ENZYMATIC PRODUCTION OF ETHYL ESTERS USING BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa*) OIL.**

MURALI, G.; FEDIUK, R. A Taguchi approach for study on impact response of ultra-high-performance polypropylene fibrous cementitious composite. **Journal of Building Engineering**, v. 30, p. 101301, jul. 2020.

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.

ONG, H. C. et al. Production and comparative fuel properties of biodiesel from non-edible oils: *Jatropha curcas*, *Sterculia foetida* and *Ceiba pentandra*. **Energy Conversion and Management**, v. 73, p. 245–255, 2013.

ORIVES, J. R. et al. Multiresponse optimisation on biodiesel obtained through a ternary mixture of vegetable oil and animal fat: Simplex-centroid mixture design application. **Energy Conversion and Management**, v. 79, p. 398–404, mar. 2014.

PALASH, S. M. et al. Biodiesel production, characterization, diesel engine performance, and emission characteristics of methyl esters from *Aphanamixis polystachya* oil of Bangladesh. **Energy Conversion and Management**, v. 91, p. 149–157, 2015.

PATCHIMPET, J. et al. Optimization of process variables for the production of biodiesel by transesterification of used cooking oil using lipase from Nile tilapia viscera. **Renewable Energy**, v. 153, p. 861–869, 1 jun. 2020.

ROCHA, T. G. et al. Lipase Cocktail for Optimized Biodiesel Production of Free Fatty Acids from Residual Chicken Oil. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 4, p. 1155–1166, 1 abr. 2021.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process** **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 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.

SAMPAIO NETO, O. Z.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. DE A. The employment of ethanol as solvent to extract Brazil nut oil. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 866–875, 10 abr. 2018.

SÁNCHEZ FABBA, E. M. et al. Alternative Raw Materials to Produce Biodiesel through Alkaline Heterogeneous Catalysis. **Catalysts**, v. 9, n. 8, p. 690, 15 ago. 2019.

SANTOS, A. M. C. M. **PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE ÓLEO DE BABAÇU (*Attalea spp.*) e SOJA (*Glycine max*) UTILIZANDO COMO CATALISADORES LÍQUIDOS IÔNICOS E COMPLEXOS DE PIRIDINA**. São Luís.

SANTOS, O. V. et al. Yield, nutritional quality, and thermal-oxidative stability of Brazil nut oil (*Bertolletia excelsa* H.B.K) obtained by supercritical extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 499–504, 2013.

SEIKA, M. **Purification of Mucor Lipases and Their Properties**•ô Kozo NAGAOKA and Yujiro YAMADA **Biol. Chem.**

SILVA, S. M.; PEIXOTO, A. F.; FREIRE, C. HSO₃-functionalized halloysite nanotubes: New acid catalysts for esterification of free fatty acid mixture as hybrid feedstock model for biodiesel production. **Applied Catalysis A: General**, v. 568, p. 221–230, 25 nov. 2018.

SINGH, D. et al. **A comprehensive review of biodiesel production from waste cooking oil and its use as fuel in compression ignition engines: 3rd generation cleaner feedstock** **Journal of Cleaner Production** Elsevier Ltd, , 20 jul. 2021.

TANG, Z. E. et al. Utilisation of biomass wastes based activated carbon supported heterogeneous acid catalyst for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 158, p. 91–102, 1 out. 2020.

THOMAS, T. P.; BIRNEY, D. M.; AULD, D. L. Optimizing esterification of safflower, cottonseed, castor and used cottonseed oils. **Industrial Crops and Products**, v. 41, n. 1, p. 102–106, jan. 2013.

TIAN, X. et al. A novel process of lipase-mediated biodiesel production by the introduction of dimethyl carbonate. **Catalysis Communications**, v. 101, p. 89–92, nov. 2017.

VERMA, T. N. et al. **A comprehensive review of the influence of physicochemical properties of biodiesel on combustion characteristics, engine performance and emissions** **Journal of Traffic and Transportation Engineering (English Edition)** Chang'an University, , 2021.

YAQOUB, H. et al. **Potential of tire pyrolysis oil as an alternate fuel for diesel engines: A review** **Journal of the Energy Institute** Elsevier B.V., , 1 jun. 2021.

YUSRI, I. M. et al. **A review on the application of response surface method and artificial neural network in engine performance and exhaust emissions characteristics in alternative fuel** **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, 1 jul. 2018.

ZDARTA, J. et al. **A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility** Catalysts MDPI AG, , 24 fev. 2018.

ZHAO, X. et al. **Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization** Renewable and Sustainable Energy Reviews Elsevier Ltd, , 2015.