

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ARTHUR OURO PRETO

**HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE FRITURA VISANDO À
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIODIESEL**

ALFENAS/MG

2025

ARTHUR OURO PRETO

**HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE FRITURA VISANDO À
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIODIESEL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfnas. Área de concentração: Biomoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Battaglia Hirata.

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Ouro Preto, Arthur.

Hidroesterificação enzimática do óleo de fritura visando à produção sustentável de biodiesel / Arthur Ouro Preto. - Alfenas, MG, 2025.

89 f. : il. -

Orientador(a): Ernandes Benedito Pereira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Biodiesel. 2. Lipase. 3. Hidroesterificação. 4. Candida rugosa. 5. Eversa Transform 2.0. I. Pereira, Ernandes Benedito, orient. II. Título.


ARTHUR OURO PRETO

**HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE FRITURA VISANDO
À PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIODIESEL**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biomoléculas.

Aprovada em: 11 de julho de 2025

Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira
Universidade Federal de Alfenas


Documento assinado digitalmente
 **ERNADES BENEDITO PEREIRA**
Data: 16/09/2025 15:59:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura:

Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
Universidade Federal de São Carlos

Assinatura:

Prof.^a Dr.^a Patrícia C. Molgero da Rós
Universidade de São Paulo

Documento assinado digitalmente
 **PATRICIA CAROLINE MOLGERO DA ROS**
Data: 25/09/2025 14:32:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar à minha mãe, Priscila, por ser essa mulher batalhadora que sempre sacrificou tudo para investir em meu futuro e que sempre acreditou em mim. Por todas as noites em claro, nos momentos em que eu não me sentia bem, pelas palavras que sempre me acalmaram e me fizeram sentir melhor.

Agradeço também aos meus avós por todo apoio emocional e financeiro, que tanto me auxiliaram nessa grande jornada acadêmica. À minha avó, Ana, em especial, por todas as orações rezadas com muita fé e amor sempre que estávamos à espera do resultado de algum edital ou de alguma prova.

Aos meus orientadores, Prof. Ernandes Benedito Pereira e Profa. Daniela Battaglia Hirata, agradeço por todas as oportunidades que me proporcionaram, pelo auxílio e pelas palavras de apoio em momentos nos quais tudo parecia estar dando errado, e pelos momentos inesquecíveis de comemoração quando conseguíamos atingir a algum objetivo. Agradeço, principalmente, por acreditarem no meu potencial e por investirem na minha formação.

Agradeço ao Prof. Paulo Waldir Tardioli pela doação das enzimas para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos mais próximos, pelos momentos de descontração e companheirismo.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pela ótima formação proporcionada, tanto na graduação, quanto no mestrado.

Ao Laboratório de Bioprocessos/UNIFAL-MG, pela infraestrutura, e a todos os seus técnicos e servidores, que sempre me ajudaram em tudo que fosse necessário para que meus projetos fossem concluídos com êxito.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Portanto, agradeço também a CAPES, por todo o apoio financeiro recebido para que este projeto pudesse ser desenvolvido e concluído com sucesso.

E, finalmente, agradeço a Deus e a todos os meus guias espirituais, pela proteção e pelo conforto que tanto precisei nas horas mais difíceis.

“A ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separadas”.

(Rosalind Franklin, 1940)

RESUMO

Milhões de toneladas de óleo de fritura são descartadas inadequadamente todos os anos, contaminando corpos hídricos em todo o planeta. No entanto, esses resíduos gerados podem ser reaproveitados como fonte lipídica para a síntese de biodiesel por meio da rota de hidroesterificação. Portanto, este trabalho teve como principal objetivo a síntese de biodiesel via hidroesterificação enzimática, avaliando-se simultaneamente a influência da concentração de óleo residual de fritura (ORF) e de lipases na etapa de hidrólise, bem como os efeitos da razão molar dos reagentes, da concentração enzimática e do tempo de reação na etapa de esterificação, com o objetivo de maximizar o rendimento de ambas as reações. O ORF foi caracterizado para verificar se suas propriedades (densidade, teor de umidade, índice de acidez total, índice de saponificação, índice de peróxidos e índice de iodo) atendem aos padrões exigidos para a síntese de biodiesel. A etapa de hidrólise, catalisada pela lipase de *Candida rugosa*, foi otimizada utilizando um delineamento composto central rotacional, avaliando a influência da concentração de ORF (x_1) e da concentração de enzima (x_2). Ambas as variáveis foram estatisticamente significativas ao nível de 95% de confiança, com condições ótimas definidas em 10% m/v para ambas, resultando numa conversão completa dos triacilgliceróis em ácidos graxos livres (AGL) após 150 minutos de reação. Na etapa de esterificação, catalisada pela lipase Eversa® Transform 2.0, obteve-se uma conversão máxima de 91,94% dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos após 4 horas de reação, utilizando uma razão molar AGL:etanol de 1:2, e 5,0% v/v de catalisador. A análise por cromatografia gasosa revelou que uma predominância de 74,57% de ésteres etílicos insaturados no composto obtido, como oleato e linoleato de etila, sugerindo propriedades favoráveis de fluxo à frio. Os resultados obtidos evidenciam que o óleo de fritura residual pode ser uma alternativa viável e sustentável para a produção de biodiesel, contribuindo para o reaproveitamento de resíduos e a redução de impactos ambientais.

Palavras-chave: biodiesel; lipase; hidroesterificação; *Candida rugosa*; Eversa® Transform 2.0.

ABSTRACT

Millions of tons of waste cooking oil (WCO) are improperly discarded each year, leading to the contamination of aquatic environments worldwide. However, this waste can be repurposed as a lipid feedstock for biodiesel synthesis through the hydroesterification route. Therefore, the main objective of this study was to produce biodiesel via enzymatic hydroesterification, simultaneously evaluating the influence of WCO and lipase concentrations during the hydrolysis step, as well as the effects of reactant molar ratio, enzyme concentration, and reaction time during esterification, aiming to maximize the yield of both reactions. The WCO was characterized to assess whether its physicochemical properties (density, moisture content, total acid value, saponification index, peroxide value and iodine value) met the requirements for biodiesel synthesis. The hydrolysis stage, catalyzed by *Candida rugosa* lipase, was optimized using a central composite rotational design, evaluating the influence of WCO concentration (x_1) and enzyme concentration (x_2). Both variables were statistically significant at 95% confidence level, with optimal conditions of 10% w/v for both, resulting in complete conversion of tryacylglycerols into free fatty acids (FFA) after 150 minutes of reaction. In the esterification step, catalyzed by Eversa® Transform 2.0 lipase, a maximum conversion of 91,94% of FFA into ethyl esters was obtained after 4 hours of reaction, using a FFA:ethanol molar ratio of 1:2 and 5,0% v/v enzyme concentration. Gas chromatography analysis revealed a predominance of 74,57% unsaturated ethyl esters in the final product, such as ethyl oleate and ethyl linoleate, indicating favorable cold-flow properties. The results demonstrate that waste cooking oil is a viable and sustainable alternative for biodiesel production, contributing to waste valorization and the reduction of environmental impacts.

Keywords: biodiesel; lipase; hydroesterification; *Candida rugosa*; Eversa® Transform 2.0

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Esquematização simplificada da rota de hidroesterificação | 22 |
| Figura 2 – Estrutura de uma molécula de TAG | 23 |
| Figura 3 – Reação de hidrólise | 23 |
| Figura 4 – Reação de esterificação | 24 |
| Figura 5 – Reação de transesterificação | 25 |
| Figura 6 – Etapas de uma reação de hidrólise | 27 |
| Figura 7 – Posição de quebra dos diferentes tipos de lipase..... | 27 |
| Figura 8 – Estrutura tridimensional de uma lipase de <i>Candida rugosa</i> | 35 |
| Figura 9 – Quantidade e posição dos tipos de aminoácidos presentes em uma Lipase de <i>Candida rugosa</i> | 35 |
| Figura 10 – Quantidade e posição dos tipos de aminoácidos presentes em uma Eversa® Transform 2.0 | 37 |
| Figura 11 – Hidrólise do óleo de fritura..... | 45 |
| Figura 12 – Esquematização do processo de separação dos AGL | 47 |
| Figura 13 – Separação dos AGL sintetizados por hidrólise | 48 |
| Figura 14 – Amostras de ésteres etílicos antes da primeira e após a última lavagem..... | 50 |
| Figura 15 – Filtração e determinação do índice de saponificação do óleo de fritura | 52 |
| Figura 16 – Gráfico de Pareto ao nível de 95% de confiança para a análise do efeito das variáveis concentração de ORF (x_1) e concentração de LCR (x_2) na porcentagem de hidrólise..... | 57 |
| Figura 17 – Comparação entre as porcentagens de hidrólise obtidas experimentalmente e as porcentagens previstas pela Equação 12 | 58 |
| Figura 18 – Superfície de resposta e curva de contorno mostrando a porcentagem de hidrólise obtida em função da concentração de ORF e da concentração de LCR utilizada no DCCR 2 ² | 59 |
| Figura 19 – Influência do tempo de reação na porcentagem de hidrólise do ORF.... | 62 |
| Figura 20 – Influência do tempo de reação na etapa de esterificação | 67 |
| Figura 21 – Separação dos ésteres etílicos por cromatografia gasosa..... | 69 |
| Figura 22 – Determinação da equação para a padronização do reagente de Bradford..... | 89 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Composição de ácidos graxos presentes em diferentes tipos de óleo | 18 |
| Tabela 2 – Revisão bibliográfica sobre a produção enzimática de biodiesel pela rota de transesterificação | 29 |
| Tabela 3 – Revisão bibliográfica sobre a produção enzimática de biodiesel pela rota de hidroesterificação | 30 |
| Tabela 4 – Níveis reais e codificados das variáveis utilizados nos ensaios de hidrólise do óleo de fritura (DCCR 2 ²) | 44 |
| Tabela 5 – Propriedades físico-químicas do óleo residual de fritura | 52 |
| Tabela 6 – Caracterização da lipase de Candida rugosa e da Eversa® Transform 2.0 em relação ao teor de proteína e à atividade enzimática | 54 |
| Tabela 7 – Porcentagem de hidrólise catalisada por LCR, variando-se a concentração de ORF e a concentração de enzima (DCCR 2 ²)..... | 56 |
| Tabela 8 – Coeficientes de regressão estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95% para a variável resposta porcentagem de hidrólise | 57 |
| Tabela 9 – Análise de variância (ANOVA) para o modelo obtido | 58 |
| Tabela 10 – Efeito da variação da concentração de lipases em reações de hidrólise | 61 |
| Tabela 11 – Porcentagem de hidrólise catalisada pela LCR, acompanhando o tempo de reação | 62 |
| Tabela 12 – Influência da razão molar AGL:etanol na etapa de esterificação | 64 |
| Tabela 13 – Influência da concentração de Eversa® Transform 2.0 na etapa de esterificação | 65 |
| Tabela 14 – Influência do tempo na etapa de esterificação..... | 67 |
| Tabela 15 – Determinação e quantificação dos ésteres etílicos por cromatografia gasosa..... | 70 |
| Tabela 16 – Reagentes utilizados na confecção deste trabalho..... | 88 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------|---|
| AGL | Ácidos Graxos Livres |
| AL | Atividade Lipolítica |
| ANOVA | Análise de Variância |
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| DAG | Diacilglicerol |
| DCCR 2 ² | Delineamento Composto Central Rotacional para 2 variáveis |
| EEI | Éster Etílico Insaturado |
| EES | Éster Etílico Saturado |
| EMAG | Ésteres Monoalquílicos de Ácidos Graxos |
| ET 2.0 | Eversa® Transform 2.0 |
| F _{calc} | Valor de F Calculado |
| F _{tab} | Valor de F Tabelado |
| IA | Índice de Acidez Total |
| II | Índice de Iodo |
| IP | Índice de Peróxido |
| IS | Índice de Saponificação |
| LCR | Lipase de <i>Candida rugosa</i> |
| LTL | Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> |
| MAG | Monoacilglicerol |
| NI | Não Informado |
| ODS | Objetivos de Desenvolvimento Sustentável |
| ONU | Organização das Nações Unidas |
| ORF | Óleo Residual de Fritura |
| PEG | Polietilenoglicol |
| TAG | Triacilglicerol |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | OBJETIVOS | 15 |
| 1.1.1 | Objetivo geral | 15 |
| 1.1.2 | Objetivos específicos | 16 |
| 2 | DESENVOLVIMENTO | 17 |
| 2.1 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 17 |
| 2.1.1 | Óleo de fritura | 17 |
| 2.1.2 | Biodiesel | 20 |
| 2.1.3 | Produção de biodiesel pela rota de hidroesterificação | 22 |
| 2.1.3.1 | Etapa de hidrólise | 22 |
| 2.1.3.2 | Etapa de esterificação | 24 |
| 2.1.3.3 | Comparação entre as rotas de transesterificação e hidroesterificação | 25 |
| 2.1.4 | Produção de biodiesel via catálise enzimática | 26 |
| 2.1.4.1 | Lipase de <i>Candida rugosa</i> | 33 |
| 2.1.4.2 | Lipase Eversa® Transform 2.0 | 35 |
| 2.2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 2.2.1 | Materiais | 37 |
| 2.2.1.1 | Enzimas | 37 |
| 2.2.1.2 | Substrato | 37 |
| 2.2.1.3 | Reagentes | 38 |
| 2.2.2 | Procedimentos experimentais | 38 |
| 2.2.2.1 | Caracterização do óleo residual de fritura | 38 |
| 2.2.2.1.1 | <i>Filtração do óleo residual de fritura</i> | 38 |
| 2.2.2.1.2 | <i>Determinação da densidade</i> | 38 |
| 2.2.2.1.3 | <i>Determinação do teor de umidade</i> | 39 |
| 2.2.2.1.4 | <i>Determinação do índice de acidez total</i> | 39 |
| 2.2.2.1.5 | <i>Determinação do índice de saponificação</i> | 40 |
| 2.2.2.1.6 | <i>Determinação do índice de peróxidos</i> | 41 |
| 2.2.2.1.7 | <i>Determinação do índice de iodo</i> | 41 |
| 2.2.2.2 | Caracterização das lipases comerciais..... | 42 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.2.2.2.1 | Determinação da concentração de proteína..... | 42 |
| 2.2.2.2.2 | Determinação da atividade lipolítica das lipases | 42 |
| 2.2.2.3 | Otimização da hidrólise enzimática do óleo residual de fritura | 43 |
| 2.2.2.3.1 | Planejamento fatorial..... | 43 |
| 2.2.2.3.2 | Procedimento experimental para o planejamento proposto | 44 |
| 2.2.2.3.3 | Influência do tempo na hidrólise do óleo de fritura | 45 |
| 2.2.2.4 | Separação, recuperação e purificação dos ácidos graxos livres | 46 |
| 2.2.2.5 | Esterificação enzimática dos ácidos graxos livres..... | 48 |
| 2.2.2.6 | Purificação dos ésteres etílicos | 49 |
| 2.2.2.7 | Análise da composição de ésteres etílicos | 50 |
| 2.3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 51 |
| 2.3.1 | Caracterizações do óleo residual de fritura | 51 |
| 2.3.2 | Propriedades dos biocatalisadores | 54 |
| 2.3.3 | Determinação das melhores condições de hidrólise | 55 |
| 2.3.3.1 | Validação do planejamento e acompanhamento do tempo de reação | 61 |
| 2.3.4 | Esterificação enzimática dos ácidos graxos livres | 63 |
| 2.3.4.1 | Influência da razão molar entre AGL e etanol na esterificação enzimática. | 63 |
| 2.3.4.2 | Influência da concentração da lipase ET 2.0 na esterificação enzimática .. | 65 |
| 2.3.4.3 | Influência do tempo na esterificação enzimática | 67 |
| 2.3.4.4 | Composição dos ésteres etílicos | 69 |
| 3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 73 |
| | REFERÊNCIAS | 74 |
| | APÊNDICE A..... | 88 |
| | APÊNDICE B | 89 |

1 INTRODUÇÃO

Os óleos de origem vegetal são amplamente empregados na culinária em todo o mundo (Teixeira *et al.*, 2018). Embora uma mesma quantidade de óleo seja comumente reaproveitada algumas vezes, após sucessivas frituras, ocorre a deterioração deste produto por meio de reações de rancificação, catalisadas pelas altas temperaturas de fritura a que o óleo é submetido, gerando subprodutos indesejáveis, responsáveis por conferir mau odor e sabor ao alimento, além de torna-lo impróprio para o consumo humano (Okparanta *et al.*, 2018).

O óleo residual de fritura (ORF) que já não pode mais ser reaproveitado deve então ser descartado adequadamente, a fim de se evitar que contamine os corpos hídricos do planeta. Embora a quantificação precisa da geração de ORF seja dificultada pela ausência de dados específicos, estima-se que milhões de toneladas desse resíduo são geradas anualmente em escala global, com destaque para os Estados Unidos e a China como os seus principais produtores (Awogbemi *et al.*, 2024).

Ademais, uma grande parcela da população não tem ciência dos enormes impactos ambientais causados pelo descarte inadequado dessas substâncias, e, por este motivo, não o realiza de maneira apropriada, o que acaba agravando ainda mais esse problema (Gurbuz; Ozkan, 2019).

Estudos recentes voltados para o reaproveitamento desses resíduos verificaram que os ORF apresentam diferentes aplicações, podendo ser utilizados como matéria-prima para a geração de produtos de alto interesse comercial, como sabões (Hartini *et al.*, 2021; Wulandari *et al.*, 2023), biolubrificantes (Guedes Jr. *et al.*, 2022; Jahromi *et al.*, 2021), biosurfactantes (Li *et al.*, 2016; Gaur *et al.*, 2022) e biocombustíveis, em especial o biodiesel, empregado como combustível sustentável voltado para a locomoção de veículos pesados (Manikandan *et al.*, 2023; Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, tem sido observado um grande incentivo governamental para substituir combustíveis fósseis por biocombustíveis, pois estes possuem um alto teor de oxigênio, o que resulta em menores emissões de gases poluentes, especialmente monóxido de carbono, devido à maior ocorrência de combustões completas (Shen *et al.*, 2018). No Brasil, a lei nº 14.993, de 8 de outubro de 2024, decretou que todo diesel fornecido ao consumidor em território nacional a partir de 1º

de março de 2025 deve apresentar, no mínimo, 15% de biodiesel em sua composição (Congresso Nacional, 2024).

O produto denominado convencionalmente como biodiesel consiste em uma mistura de ésteres monoalquílicos provenientes de ácidos graxos de cadeia longa. A rota química mais comumente empregada para sua síntese é a rota de transesterificação, utilizando catalisadores básicos. Esta rota ocorre por meio da reação entre um óleo vegetal e um álcool, gerando biodiesel e glicerol no final do processo (Ferreira *et al.*, 2017; Mukhtar *et al.*, 2016).

Essa técnica, no entanto, é restrita à utilização de óleos vegetais refinados como matéria-prima, uma vez que estes contêm uma quantidade de ácidos graxos livres (AGL) reduzida e baixo teor de umidade (Wancura *et al.*, 2020). Óleos que não atendam a esses requisitos, como óleos vegetais brutos ou óleos residuais de frituras tendem a induzir à ocorrência de saponificação, formando sabão no final do processo, o que reduz a produção de biodiesel, além de dificultar a separação e a purificação do produto de interesse (Pourzolfaghar *et al.*, 2016).

Todo biodiesel produzido a partir de substratos lipídicos inadequados ao consumo humano, como o ORF, pode ser definido como biodiesel de segunda geração (Saleh *et al.*, 2023). Uma grande vantagem da sua produção consiste no fim da competição com a produção de óleos vegetais destinados à alimentação humana (Boutesteijn *et al.*, 2016). Além disso, a utilização de ORF como fonte lipídica para a produção de biodiesel é interessante comercialmente, pois além de fornecer um meio para a reutilização de um descarte que apresenta um grande impacto ecológico (Teixeira *et al.*, 2018; Marchetti *et al.*, 2020), também reduz consideravelmente o custo da matéria-prima envolvida (Karmee *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a rota de hidroesterificação atua como uma rota alternativa para a síntese de biodiesel, possibilitando a utilização de óleos residuais como substrato sem haver necessidade da realização de tratamentos prévios para tal fim (Costa *et al.*, 2020). Esta rota pode ser subdividida em duas etapas subsequentes: A primeira consiste na hidrólise das moléculas de triacilglicerol em AGL e glicerol (Zenevycz *et al.*, 2017). Os AGL reagem, então, com um álcool de cadeia curta por meio de uma etapa de esterificação, gerando, no final do processo, água e biodiesel (Vescovi *et al.*, 2016).

Em ambas as etapas, a utilização de catalisadores é essencial para reduzir a energia de ativação necessária para a ocorrência das reações, conferindo uma

elevação da taxa reacional (Touqeer *et al.*, 2020). Embora os catalisadores químicos sejam os mais empregados atualmente nas indústrias de biocombustíveis, há um crescente apelo para o desenvolvimento de novas técnicas voltadas para a utilização da catálise enzimática (Wancura *et al.*, 2019).

Apesar do custo das enzimas ser consideravelmente mais elevado do que o dos catalisadores químicos, seu uso apresenta diversas vantagens, como alta seletividade ao substrato e a possibilidade de atuação em condições mais brandas de temperatura e pressão (Santos *et al.*, 2020), além de evitar outros problemas ocasionados pelo uso de reagentes químicos, minimizando os tratamentos voltados para a purificação do biodiesel e os impactos ambientais causados pelo descarte dos resíduos desse processo (Christopher *et al.*, 2014).

Dessa forma, o emprego de lipases como biocatalisadores vem ganhando um grande destaque atualmente na síntese de biodiesel (Rosset *et al.*, 2019). No entanto, esta via catalítica ainda é pouco explorada, não havendo muitos estudos voltados para a produção enzimática de biodiesel pela rota de hidroesterificação na literatura, especialmente quando ORF é utilizado como substrato (Vescovi *et al.*, 2016).

A lipase de *Candida rugosa* foi selecionada para a etapa de hidrólise neste trabalho em função de seu elevado potencial catalítico, atribuído à sua alta afinidade pelos triacilgliceróis, à sua inespecificidade posicional – não sendo restrita às posições sn-1,3 ou sn-2 – e à sua capacidade de atuar eficientemente tanto em meios aquosos quanto hidrofóbicos (Matinja *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019).

Por outro lado, estudos recentes têm investigado o potencial da lipase recombinante líquida Eversa Transform 2.0 (ET 2.0) na produção enzimática de biodiesel, destacando sua elevada termoestabilidade e alta atividade catalítica tanto na transesterificação de glicerídeos quanto na esterificação de AGL (Monteiro *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2024). Dessa forma, a ET 2.0 foi selecionada para catalisar a etapa de esterificação neste trabalho.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como principal objetivo a síntese de biodiesel, utilizando óleo

residual de fritura, doado pelos alunos de ensino médio da Escola Estadual Judith Viana, do município de Alfenas/MG, como substrato lipídico, por meio da rota de hidroesterificação via catálise enzimática, empregando LCR para a etapa de hidrólise e a lipase recombinante Eversa® Transform 2.0 (ET 2.0) para a etapa de esterificação.

O presente trabalho apresenta grande impacto no meio ambiente e na sociedade como um todo, pois seus objetivos estão alinhados com os seguintes Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU):

- a) ODS 7: Garante o acesso à energia limpa e sustentável;
- b) ODS 9: Promove a industrialização sustentável;
- c) ODS 12: Garante padrões de consumo e de produção sustentáveis;
- d) ODS 13: Adota medidas para combater as alterações climáticas;
- e) ODS 14: Possibilita a conservação dos corpos hídricos e da vida marinha.

1.1.2 Objetivos específicos

Para atender aos objetivos deste trabalho, as seguintes etapas foram realizadas:

- a) Caracterização dos parâmetros físico-químicos (densidade, teor de umidade, índice de acidez total, índice de saponificação, índice de peróxidos e índice de iodo) do óleo residual de fritura;
- b) caracterização e determinação da atividade lipolítica da lipase de *Candida rugosa* e da Eversa® Transform 2.0;
- c) maximização do rendimento de hidrólise, otimizando-se as concentrações de ORF e de lipase de *Candida rugosa* no meio reacional;
- d) maximização do rendimento de esterificação, otimizando-se a razão molar dos reagentes, a concentração de Eversa® Transform 2.0, e o tempo de reação;
- e) purificação dos ésteres etílicos obtidos;
- f) determinação da composição percentual dos ésteres etílicos por cromatografia gasosa.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 Óleo de fritura

Os óleos e gorduras possuem como componentes mais expressivos os triacilgliceróis, que são ésteres resultantes da ligação do glicerol com ácidos graxos. Suas propriedades físico-químicas estão diretamente relacionadas à composição e à distribuição dos ácidos graxos, uma vez que estes correspondem, em média, a 95% da massa molar dos triacilgliceróis (Moretto; Fett, 1998). Além disso, cabe destacar que a composição em ácidos graxos pode ser influenciada por fatores climáticos, regionais, pela espécie vegetal utilizada como fonte oleaginosa, pelo método de extração adotado, ou, ainda, pelo grau de pureza do óleo obtido.

Nesse contexto, a Tabela 1 apresenta uma comparação da composição de ácidos graxos, determinada por técnicas cromatográficas, em diferentes óleos vegetais: óleo de soja bruto (Vicentini-Polette *et al.*, 2021), óleo de soja refinado (Ayyildiz *et al.*, 2015) e uma mistura de óleos residuais de fritura coletados em diversos restaurantes e estabelecimentos comerciais localizados na cidade de Jaipur, na Índia (Dubey *et al.*, 2020).

Tabela 1 – Composição de ácidos graxos presentes em diferentes tipos de óleo

| Ácido graxo | Porcentagens observadas na literatura (%) | | |
|---------------------------|---|---|---|
| | Óleo de soja bruto (Vicentini-Polette <i>et al.</i> , 2021) | Óleo de soja refinado (Ayyildiz <i>et al.</i> , 2015) | Óleo residual de fritura (Dubey <i>et al.</i> , 2020) |
| Ácido palmítico (C16:0) | 10,21 ± 0,31 | 10,99 ± 0,04 | 11,35 ± 0,56 |
| Ácido esteárico (C18:0) | 5,18 ± 0,14 | 4,29 ± 0,02 | 4,74 ± 0,45 |
| Ácido oleico (C18:1) | 21,93 ± 0,53 | 23,33 ± 0,03 | 23,30 ± 0,37 |
| Ácido linoleico (C18:2) | 48,75 ± 3,20 | 53,86 ± 0,03 | 51,23 ± 0,30 |
| Ácido linolênico (C18:3) | 3,09 ± 0,04 | 6,08 ± 0,04 | 5,58 ± 0,12 |
| Ácido araquídico (C20:0) | 0,40 ± 0,06 | 0,47 ± 0,02 | 0,54 ± 0,02 |
| Ácido gandoleico (C20:1) | 3,10 ± 0,60 | 0,25 ± 0,00 | - |
| Ácido behênico (C22:0) | - | 0,40 ± 0,04 | 0,53 ± 0,05 |
| Ácido lignocérico (C24:0) | - | 0,17 ± 0,03 | 0,20 ± 0,01 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Na Tabela 1, observa-se que os óleos residuais de fritura (ORF) exibem um perfil de ácidos graxos semelhantes ao perfil dos óleos de soja refinados, comumente empregados como matéria-prima na síntese de biodiesel. Nesse contexto, os ORF configuram-se como uma alternativa viável ao emprego de óleos vegetais refinados, oferecendo vantagens significativas do ponto de vista econômico e ambiental. A utilização de substratos lipídicos de menor qualidade, como os ORF, caracteriza a obtenção de biodiesel de segunda geração (Saleh *et al.*, 2023).

Entre os principais benefícios destaca-se a expressiva redução nos custos de produção, considerando-se que a matéria-prima representa o principal fator de custo no processo de síntese de biodiesel (Karmee *et al.*, 2015). Além disso, o uso de ORF evita a competição com a cadeia alimentar, uma vez que não interfere na

demanda por óleos vegetais destinados à alimentação humana, o que constitui uma vantagem econômica e ética adicional (Boutesteijn *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a valorização dos ORF contribui para a redução de impactos ambientais negativos, ao fornecer uma via sustentável para o reuso de um resíduo com elevado potencial poluidor (Teixeira *et al.*, 2018).

Entretanto, é importante ressaltar que os ORF podem possuir algumas características físico-químicas distintas daquelas observadas em óleos refinados, em decorrência de processos degradativos, como rancidez e oxidação, e de hidrólises, resultantes da liberação de água dos alimentos, catalisadas pelas altas temperaturas a que o óleo de fritura é submetido (Lema, 2023). Essas reações são responsáveis pela quebra das moléculas de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis, ocasionando, portanto, alterações em suas propriedades (Zenevicz *et al.*, 2017).

Assim, é de suma importância a caracterização dos ORF antes de utilizá-los para a síntese de biodiesel, com o objetivo de se verificar a conformidade dos seus parâmetros físico-químicos com os padrões esperados.

A densidade do óleo deve ser calculada com o objetivo de se verificar a presença de água e de outras substâncias oriundas do processo de rancidez de óleo de fritura, as quais podem alterar significativamente sua massa específica (Moretto; Fett, 1998).

O teor de umidade presente no ORF é um parâmetro extremamente importante para a síntese de biodiesel, pois o excesso de água pode contribuir para a ocorrência de reações indesejáveis (Wancura *et al.*, 2020), enquanto o índice de acidez total atua como um indicativo da quantidade de ácidos graxos livres presentes no óleo.

O índice de saponificação é uma medida que expressa a quantidade de base necessária para saponificar os ácidos graxos presentes em uma amostra lipídica. Esse parâmetro fornece informações indiretas sobre o perfil de ácidos graxos presentes, pois valores elevados desse índice indicam uma predominância de ácidos graxos de cadeia curta, enquanto valores mais baixos sugerem cadeias carbônicas mais longas (Maceiras *et al.*, 2017).

Os peróxidos são substâncias formadas a partir do processo de rancidez oxidativa do óleo de fritura. Logo, o índice de peróxido indica o grau de deterioração desse óleo a partir da concentração dessas substâncias em sua composição

(Maddikeri *et al.*, 2015).

O índice de iodo é uma medida utilizada para quantificar as insaturações presentes nas moléculas de ácido graxo presentes no óleo. O excesso de insaturações pode ocasionar a formação de gomas nos biocombustíveis, as quais podem causar danos aos motores dos veículos. Por este motivo, é de suma importância a determinação deste parâmetro (Maceiras *et al.*, 2017).

2.1.2 Biodiesel

Com o avanço da globalização e o conseqüente crescimento das atividades comerciais e logísticas, o setor de transportes tem experimentado uma expansão contínua, impulsionada pela necessidade de atender à crescente demanda do mercado. No Brasil, cerca de 65% do transporte de cargas e mercadorias é realizado por rodovias, o que torna o modal rodoviário a principal via de distribuição no país. Contudo, esse predomínio está diretamente associado a um elevado consumo de diesel fóssil, tornando o transporte rodoviário um dos maiores emissores de gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono (Simão *et al.*, 2024).

Nesse cenário, o biodiesel surge como uma alternativa energética promissora, destacando-se por seu caráter renovável, atóxico, biodegradável e ambientalmente mais favorável. A substituição parcial ou total do diesel convencional por biodiesel tem se mostrado eficaz na redução dos impactos ambientais, uma vez que sua combustão resulta em menores emissões de poluentes atmosféricos, como dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de carbono (CO₂), hidrocarbonetos e material particulado. Tais características posicionam o biodiesel como vetor energético para a transição energética rumo a uma matriz mais limpa e sustentável (Zandie *et al.*, 2022; Roy *et al.*, 2021).

Com o intuito de promover o uso de combustíveis renováveis, a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, instituiu a obrigatoriedade da adição mínima de 5% de biodiesel ao diesel comercializado no país (Congresso Nacional, 2014). Essa exigência foi atualizada pela lei nº 14.993, de 8 de outubro de 2024, que ampliou esse percentual para 15%, com vigência a partir de 1º de março de 2025 (Congresso Nacional, 2024). Essa medida visa não apenas reduzir a dependência de combustíveis fósseis, mas também estimular o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis.

Além das vantagens ambientais, o biodiesel apresenta benefícios do ponto de vista econômico e energético. Sua produção pode ser viabilizada a partir de uma ampla gama de matérias-primas, incluindo óleos vegetais e gorduras residuais, o que confere versatilidade ao processo e possibilidade de aproveitamento de resíduos industriais e domésticos (Karmee *et al.*, 2015).

De acordo com dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2024), o óleo de soja refinado constitui a principal matéria-prima utilizada na produção nacional de biodiesel, correspondendo a 69,15% do total produzido. Em seguida, destacam-se os óleos residuais (18,01%), as gorduras animais (8,47%) e outros óleos vegetais refinados (4,38%).

No entanto, apesar da predominância do óleo de soja refinado, a utilização de ORF como substrato para a produção de biodiesel de segunda geração configura-se como uma alternativa sustentável e de baixo custo, além de apresentar benefícios adicionais à destinação ambientalmente adequada de resíduos urbanos (Saleh *et al.*, 2023).

Do ponto de vista químico, o biodiesel é composto predominantemente por ésteres monoalquílicos de ácidos graxos (EMAG), cuja composição varia conforme a origem da matéria-prima. Os EMAG podem conter cadeias carbônicas de 14 (C14) a 24 (C24) átomos de carbono, com diferentes graus de saturação. Biodieseis obtidos a partir de óleo de soja ou ORF, por exemplo, são ricos em EMAG insaturados (Liew *et al.*, 2023).

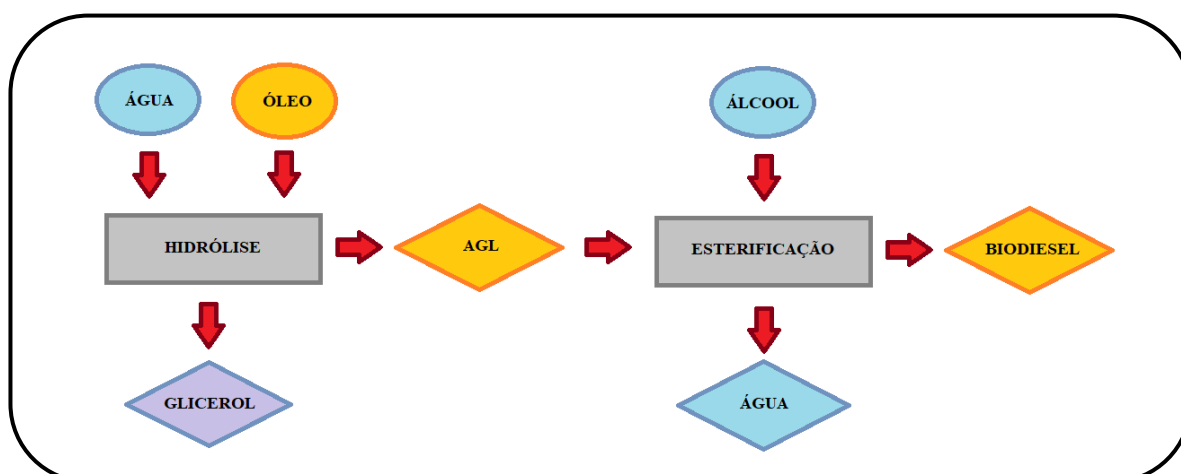
A composição desses ésteres impacta diretamente em propriedades físico-químicas críticas para o desempenho do combustível, como estabilidade oxidativa e comportamento em baixas temperaturas. Um excesso de insaturações tende a reduzir a estabilidade oxidativa, favorecendo processos de degradação (Singh *et al.*, 2024), enquanto uma elevada saturação pode aumentar o ponto de fusão do biodiesel, prejudicando seu fluxo em condições de baixa temperatura. Assim, o equilíbrio entre ésteres saturados e insaturados é essencial para assegurar a qualidade e eficiência energética do biodiesel (Karimian *et al.*, 2023).

Em síntese, o biodiesel representa uma solução energética viável e sustentável, com potencial de reduzir as emissões de carbono no setor de transportes, valorizar recursos renováveis e contribuir significativamente para o desenvolvimento de uma economia circular e de baixo carbono (Zandie *et al.*, 2022).

2.1.3 Produção de biodiesel pela rota de hidroesterificação

A rota de hidroesterificação tem se destacado como uma alternativa promissora para a produção de biodiesel de segunda geração, especialmente a partir de matérias-primas lipídicas de baixa qualidade e com elevado teor de ácidos graxos livres (AGL). Essa rota envolve duas etapas sequenciais: a hidrólise dos triacilgliceróis presentes em óleos e gorduras, liberando ácidos graxos livres, seguida da esterificação desses AGL com álcoois de cadeia curta, resultando na formação de ésteres monoalquílicos – os principais constituintes do biodiesel (Machado *et al.*, 2021). A Figura 1 apresenta um diagrama esquemático que resume as principais etapas da rota de hidroesterificação.

Figura 1 – Esquematização simplificada da rota de hidroesterificação

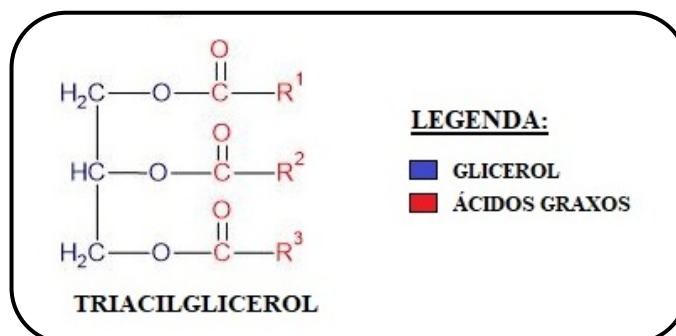


Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

2.1.3.1 Etapa de hidrólise

A etapa inicial da rota de hidroesterificação consiste na hidrólise dos triacilgliceróis, principais constituintes dos óleos e gorduras (Santos *et al.*, 2017). Cada molécula de triacilglicerol (TAG) é formada por uma unidade de glicerol esterificada a três ácidos graxos, conforme ilustrado na Figura 2.

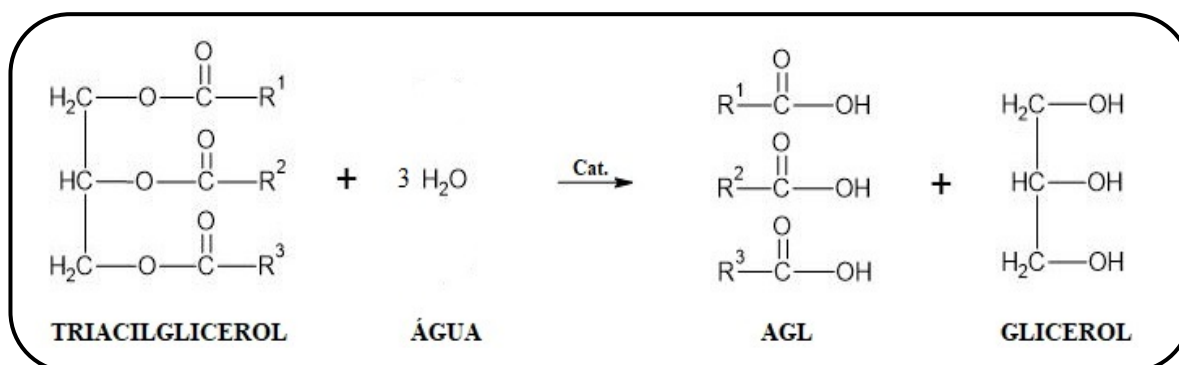
Figura 2 – Estrutura de uma molécula de TAG



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

A adição de água destilada a substratos lipídicos ricos em TAG, sob condições controladas e na presença de catalisadores, promove a clivagem das ligações éster, liberando os ácidos graxos e o glicerol, como representado na Figura 3.

Figura 3 – Reação de hidrólise



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

A hidrólise pode ser catalisada por agentes químicos, ácidos ou básicos, bem como por catalisadores biológicos, como as lipases. Todavia, o emprego de lipases vem se destacando como uma alternativa promissora devido à sua alta seletividade, à sua capacidade de atuar sob condições brandas de temperatura e pH, e menor geração de subprodutos, o que contribui para um processo mais limpo e sustentável (Rosset *et al.*, 2019).

Os ácidos graxos livres (AGL) e o glicerol obtidos nessa etapa apresentam amplo potencial de aplicação industrial, podendo ser empregados como matéria-prima na produção de biocombustíveis, cosméticos e fármacos (Pourzolfaghar *et al.*, 2016). Nesse contexto, a rota de hidroesterificação permite a conversão eficiente de substratos lipídicos de baixa qualidade e elevado teor de acidez – como óleos

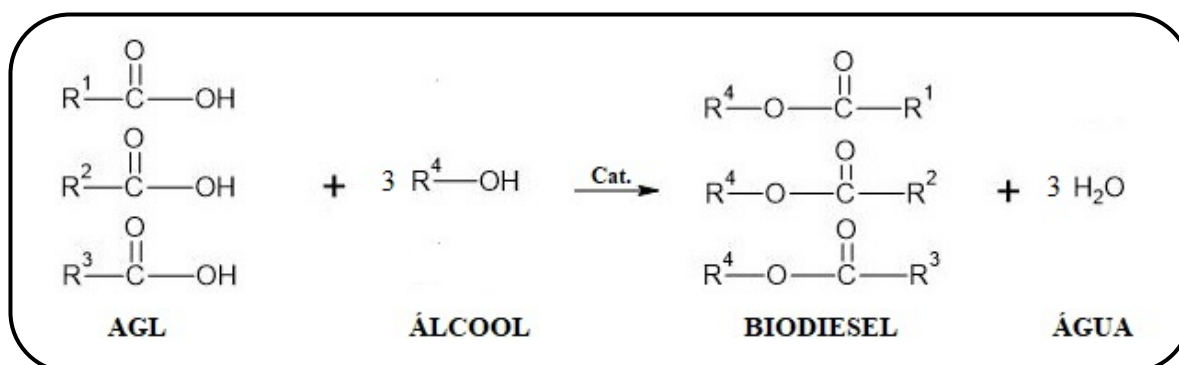
residuais de fritura – em biodiesel, sem a necessidade de pré-tratamentos para a remoção dos AGL (Machado *et al.*, 2021).

Uma vantagem adicional da rota de hidroesterificação, em relação à transesterificação convencional, consiste na obtenção de glicerol em meio isento de álcoois. Na transesterificação, o glicerol é geralmente produzido na presença de metanol, que, apesar de seu baixo custo, é tóxico e compromete o reaproveitamento do glicerol em aplicações de maior valor agregado, como na indústria alimentícia ou cosmética. A ausência de metanol no sistema reacional da rota de hidroesterificação favorece, portanto, a obtenção de um coproduto com maior pureza e aplicabilidade (Cavalcanti-Oliveira *et al.*, 2011).

2.1.3.2 Etapa de esterificação

Na etapa subsequente da rota de hidroesterificação, os AGL obtidos na etapa de hidrólise são submetidos à reação de esterificação com um álcool de cadeia curta, geralmente etanol ou metanol. Essa reação leva à formação de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos (EMAG), com a geração de água como subproduto. Os EMAG resultantes formam uma mistura com características apropriadas para uso como combustível, convencionalmente denominado biodiesel (Vescovi *et al.*, 2016). A Figura 4 apresenta uma representação esquemática dessa reação.

Figura 4 – Reação de esterificação



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

No entanto, alguns fatores devem ser considerados para aumentar o rendimento de esterificação. Um dos fatores mais relevantes é o alto grau de pureza dos AGL utilizados como matéria-prima na síntese de biodiesel, visto que a presença

de água no meio reacional pode induzir reações de hidrólise e inibir a atividade catalítica das enzimas. Por este motivo, sempre que possível, recomenda-se remover o excesso de água, gerado durante a esterificação dos AGL, o que pode ser realizado com o auxílio de peneiras moleculares (Mulalee *et al.*, 2015).

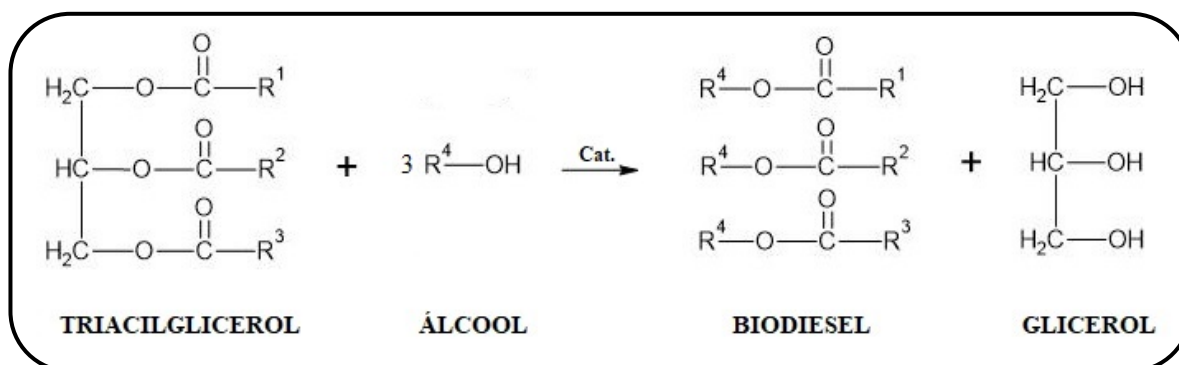
Além disso, o aumento da razão molar AGL:álcool para 1:3 ou, até mesmo, 1:6, desloca o equilíbrio da reação em direção à formação dos produtos, resultando num aumento da conversão de AGL em biodiesel (Danane *et al.*, 2018).

Por fim, outro fator que influencia o rendimento de esterificação é o tipo de álcool utilizado como reagente. As reações de esterificação que ocorrem na presença de metanol são mais rápidas e resultam em maiores rendimentos, razão pela qual o metanol é o álcool mais utilizado na indústria de biocombustíveis. No entanto, existe um forte apelo para a substituição do metanol pelo etanol na produção do biodiesel, devido à sua maior biocompatibilidade e à geração de resíduos menos tóxicos ao meio ambiente. Essa substituição torna o processo mais sustentável e alinhado aos princípios da química verde (Kanjaikeaw *et al.*, 2018).

2.1.3.3 Comparação entre as rotas de transesterificação e hidroesterificação

A rota de transesterificação ocorre pela conversão das moléculas de triacilglicerol (TAG) em ésteres monoalquílicos, constituintes do biodiesel. Para isso, o TAG reage diretamente com um álcool de cadeia curta, geralmente etanol ou metanol, na presença de um catalisador. No final do processo, além do biodiesel, também são obtidas moléculas de glicerol, que deverão ser separadas posteriormente, com o intuito de se obter um biodiesel mais puro (Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013). Este processo é ilustrado de forma resumida pela Figura 5.

Figura 5 – Reação de transesterificação



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Embora essa rota seja bastante promissora para a síntese de biodiesel, especialmente devido ao seu alto rendimento em curto prazo, sua aplicação é limitada ao uso de óleos vegetais refinados como matéria-prima. Isso ocorre porque substratos com elevado teor de acidez tendem a sofrer reações de saponificação, ao invés de transesterificação, ao entrarem em contato direto com o etanol, na presença de catalisadores básicos, resultando na formação de sabão, um subproduto indesejável que reduz a pureza final do biodiesel e promove a inibição do catalisador (Wancura *et al.*, 2020).

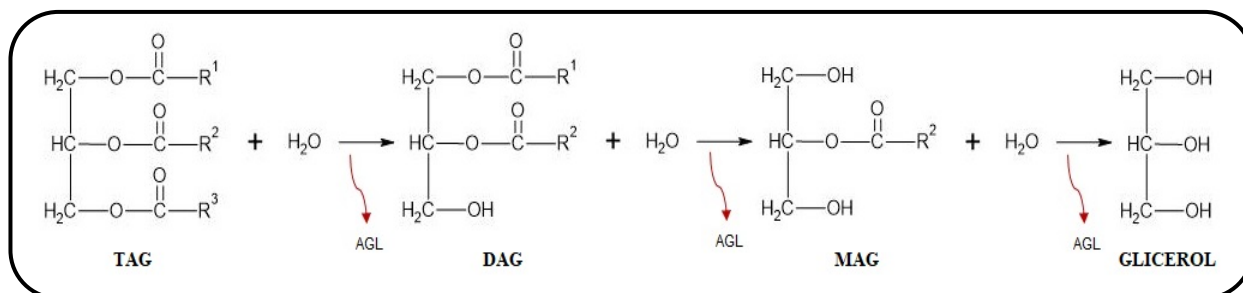
Nesse sentido, a principal vantagem da rota de hidroesterificação em relação à transesterificação é a viabilidade do uso de matérias-primas lipídicas com alto teor de ácidos graxos livres, como os ORF. Nesse caso, a alta concentração de AGL gerada pela hidrólise térmica dos TAG durante o processo de fritura não constitui um fator limitante à reação, uma vez que os próprios AGL atuam como substrato para a síntese de biodiesel na etapa de esterificação (Machado *et al.*, 2021).

2.1.4 Produção de biodiesel via catálise enzimática

As lipases, triacilglicerol acil-hidrolases (EC 3.1.1.3), compreendem um grupo de enzimas de grande ocorrência em vegetais, animais e microrganismos, que têm como papel fisiológico catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, fornecendo diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres (Singh; Mukhopadhyay, 2012; Delorme *et al.*, 2011). Além disso, essas enzimas são capazes de catalisar reações de síntese como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (Messias *et al.*, 2011).

As reações de hidrólise podem ocorrer naturalmente no metabolismo energético dos seres vivos a partir da quebra das ligações existentes entre o grupamento glicerol e os ácidos graxos presentes na molécula de TAG (Wancura *et al.*, 2023). Conforme ilustrado na Figura 6, a ruptura de moléculas de ácidos graxos gera sequencialmente um diacilglicerol (DAG), um monoacilglicerol (MAG) e, por fim, uma molécula de glicerol.

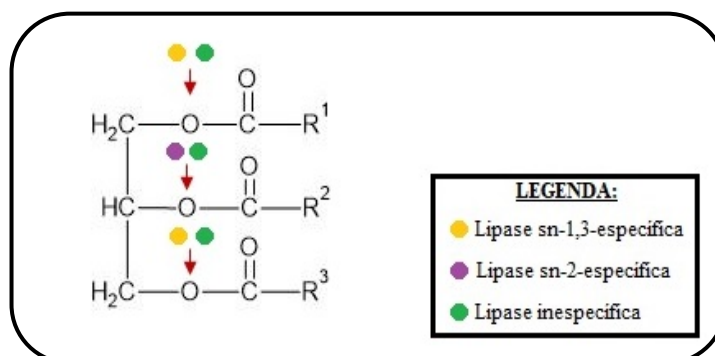
Figura 6 – Etapas de uma reação de hidrólise



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

As lipases podem atuar sobre ácidos graxos localizados em regiões específicas dos triacilgliceróis, sendo estas classificadas como lipases sn-1,3-específicas e lipases sn-2-específicas, ou atuar sobre qualquer ácido graxo disposto na molécula, sendo estas classificadas como lipases inespecíficas (Wancura *et al.*, 2023). Na Figura 7, estão representadas as posições dos ácidos graxos, em uma molécula de TAG, que podem ser clivados por cada tipo de lipase.

Figura 7 – Posição de quebra dos diferentes tipos de lipase



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Algumas substâncias químicas, em especial o NaOH e o KOH, são capazes de catalisar reações de hidrólise mais rapidamente do que as lipases. No entanto, a catálise enzimática apresenta algumas vantagens em relação à utilização de catalisadores químicos. Dentre elas, pode-se citar uma alta especificidade da enzima pelo substrato. Devido à sua especificidade, a catálise enzimática minimiza a ocorrência de reações secundárias, resultando em um produto de maior qualidade e na redução da produção de subprodutos, o que acarreta na redução de custos eventuais oriundos de purificação ao fim do processo (Teixeira; Milagre, 2020).

Outra vantagem da aplicação de enzimas é a possibilidade de atuação em

condições mais brandas de temperatura e pressão, o que reduz o custo energético envolvido no processo, evitando, mais uma vez, a formação de subprodutos. (Santos *et al.*, 2020). Além disso, as lipases não são tóxicas, são biodegradáveis e permitem a sua reutilização, contribuindo positivamente em questões ambientais. Essas particularidades fomentam seu potencial de aplicação, que é amplamente expresso em diferentes setores industriais (Salihu; Alam, 2015; Bilal *et al.*, 2021).

Dentre as aplicações industriais das lipases, pode-se citar a sua utilização em algumas reações de síntese, como transesterificação e esterificação, sob condições controladas em meio orgânico, possibilitando a geração de produtos de grande interesse comercial, como biolubrificantes, biosurfactantes e biodiesel, através da catálise enzimática (Wancura *et al.*, 2023).

Nas Tabelas 2 e 3 estão sumarizadas, respectivamente, algumas aplicações de lipases na síntese de biodiesel pelas rotas de transesterificação e hidroesterificação encontradas na literatura.

Tabela 2 – Revisão bibliográfica sobre a produção enzimática de biodiesel pela rota de transesterificação

| Substrato | Lipase | Parâmetros | Tempo | Rendimento | Referência |
|-----------------------|---|-----------------|-------|------------|---------------------------------|
| Óleo de soja (2:8) | <i>Pseudomonas cepacia</i> (Lipase PS) (imobilizada em TMOS) | 35°C 700 rpm | 1h | 67,00% | Noureddini <i>et al.</i> , 2005 |
| Óleo de algas (1:3) | Lipase de <i>Candida sp.</i> (99-125) (imobilizada) | 38°C 180 rpm | 12h | 98,15% | Li <i>et al.</i> , 2007 |
| Sebo bovino (1:3) | <i>Mucor miehei</i> (Lipozyme IM60) (forma livre) | 45°C 200 rpm | 5h | 99,60% | Nelson <i>et al.</i> , 1996 |
| Óleo de soja (1:1) | <i>Candida antarctica</i> (Lipase B) (imobilizada em resina acrílica) | 40°C 150 rpm | 4h | 30,00% | Du <i>et al.</i> , 2004 |
| Trioleína (1:3) | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (imobilizada em caulinita porosa) | 50°C - | 10h | 100,00% | Iso <i>et al.</i> , 2001 |
| Óleo de fritura (1:4) | <i>Candida antarctica</i> (imobilizada em nanocomposto magnético) | 40°C - | 30h | 96,00% | Parandi <i>et al.</i> , 2022 |
| Óleo de soja (1:10) | Lipase de <i>Candida rugosa</i> (imobilizada em ECL) | 50°C - | 10h | 95,40% | Aghaei <i>et al.</i> , 2021 |
| Óleo de fritura (1:6) | Lipase de <i>Aspergillus terreus</i> (imobilizada em Fe ₃ O ₄ -PDA) | 37°C - | 30h | 92,00% | Touqeer <i>et al.</i> , 2020 |
| Óleo de soja (1:4) | Lipase de <i>Candida rugosa</i> (imobilizada em copolímero) | 40°C 600 rpm | 54h | 92,80% | Xie; Huang, 2020 |
| Óleo de fritura (1:5) | <i>Candida antarctica</i> (Lipase A) (livre, em fase líquida) | 30°C 400 rpm | 22h | 94,60% | Guo <i>et al.</i> , 2020 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 3 – Revisão bibliográfica sobre a produção enzimática de biodiesel pela rota de hidroesterificação

(continua)

| Etapa de hidrólise | | | | | |
|---------------------------------------|--|-------------------|--------|--------------------|---|
| Substrato | Lipase | Parâmetros | Tempo | Rendimento | Referência |
| Óleo de macaúba (50% v/v) | Lipase de mamona (extrato da semente) | 40°C - | 6h | 99,60% | Aguieiras <i>et al.</i> , 2014 |
| Óleo de pinhão-manso (50% m/v) | Lipase de pinhão-manso (extrato da semente) | 40°C 450 rpm | 2h | 98,00% | Sousa <i>et al.</i> , 2010 |
| Óleo de soja (50% v/v) | <i>Thermomyces lanuginosus</i> (livre, em fase líquida) | 60°C - | 48h | 89,00% | Cavalcanti-Oliveira <i>et al.</i> , 2011 |
| Óleo de fritura (20% v/v) | <i>Thermomyces lanuginosus</i> (livre, em fase líquida) | 30°C 300 rpm | 24h | 100,00% | Vescovi <i>et al.</i> , 2016 |
| Óleo de soja degomado (18,2% v/v) | Eversa® Transform (livre, em fase líquida) | 48,4°C 250 rpm | 16h | 100,00% | Miranda <i>et al.</i> , 2024 |
| Óleo de babaçu refinado (50% v/v) | <i>Thermomyces lanuginosus</i> (livre, em fase líquida) | 40°C - | 4h | 98,00% | Alexandre <i>et al.</i> , 2022 |
| Óleo de fritura (20% m/v) | <i>Geotrichum candidum</i> (extrato bruto) | 40°C 900 rpm | 40 min | 52,03 mg NAOH/g | Costa <i>et al.</i> , 2020 |
| Óleo de polpa de macaúba (25% m/v) | Lipase de mamona (extrato da semente) | 35°C 1000 rpm | 6h | 98,36% | Machado <i>et al.</i> , 2021 |

Tabela 3 – Revisão bibliográfica sobre a produção enzimática de biodiesel pela rota de hidroesterificação

(conclusão)

| Etapa de esterificação | | | | | |
|--------------------------------------|---|------------------|-------|------------|--------------------------------|
| Substrato | Lipase | Parâmetros | Tempo | Rendimento | Referência |
| AGL de óleo de soja (1:3) | <i>Burkholderia cepacia</i> (extrato bruto) | 50°C 200 rpm | 31h | 93,00% | Soares <i>et al.</i> , 2013 |
| AGL de óleo de macaúba (1:2) | <i>Candida antarctica</i> (forma livre) | 40°C - | 8h | 91,00% | Aguieiras <i>et al.</i> , 2014 |
| AGL de óleo de fritura (1:7) | <i>Candida antarctica</i> (forma livre) | 40°C 300 rpm | 6h | 90,00% | Vescovi <i>et al.</i> , 2016 |
| AGL de óleo de babaçu refinado (1:5) | Eversa® Transform 2.0 (livre, em fase líquida) | 40°C 200 rpm | 5h | 95,97% | Alexandre <i>et al.</i> , 2022 |
| AGL de óleo de soja degomado (1:6) | Eversa® Transform 2.0 (livre, em fase líquida) | 35°C 400 rpm | 12h | 91,00% | Ketzer <i>et al.</i> , 2022 |
| AGL de óleo de fritura (1:6.3) | Eversa® Transform 2.0 (livre, em fase líquida) | 40°C 1700 rpm | 8h | 96,20% | Wancura <i>et al.</i> , 2021 |
| AGL de óleo de fritura (1:1.5) | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (imobilizada em SDB) | 40°C 200 rpm | 9h | 94,30% | Costa <i>et al.</i> , 2020 |

Fonte: elaborada pelo autor (2025).

A Tabela 2 reúne dados da literatura referentes à produção de biodiesel por meio da rota de transesterificação enzimática, empregando diferentes lipases e fontes lipídicas. De modo geral, observa-se que a maioria dos estudos alcançaram elevados rendimentos, com valores variando entre 92% e 100%. No entanto, os tempos de reação reportados foram bastante heterogêneos, oscilando entre 5 e 54 horas. Essa variação pode ser atribuída à diversidade dos substratos utilizados, às características intrínsecas das lipases aplicadas e às condições operacionais adotadas em cada estudo.

Como exemplo, Aghaei *et al.* (2021), obtiveram uma conversão de 95,40% em apenas 10 horas de reação, utilizando óleo de soja refinado à razão molar de 1:10, com 0,1 g de lipase de *Candida rugosa* imobilizada em ECL. Em contraste, Xie & Huang (2020) alcançaram uma conversão 92,80% após 54 horas de reação, empregando o mesmo substrato com razão molar de 1:4 e lipase de *Candida rugosa* imobilizada em copolímero magnético, na concentração de 25%. Esses resultados mostram que a razão molar entre os reagentes, bem como o tipo de suporte utilizado na imobilização da enzima exercem influência direta tanto sobre a taxa de conversão quanto sobre o tempo necessário para a realização da reação de esterificação.

No entanto, é importante ressaltar que a maioria desses estudos foi conduzida utilizando-se óleos vegetais refinados, os quais apresentam baixos teores e umidade e de ácidos graxos livres. Em contrapartida, a aplicação dessa rota reacional a substratos lipídicos de menor qualidade, como os ORF, requer etapas adicionais de purificação ou neutralização prévias, elevando os custos operacionais e a complexidade do processo (Wancura *et al.*, 2020).

Por outro lado, a rota de hidroesterificação enzimática tem se consolidado como uma alternativa promissora para a produção de ésteres monoalquílicos a partir de substratos lipídicos com baixo grau de pureza. Essa abordagem apresenta como principais vantagens a tolerância a elevadas concentrações de ácidos graxos livres e umidade, além de permitir conversões expressivas em tempos significativamente mais curtos, evidenciando sua viabilidade técnica para a valorização de resíduos lipídicos (Machado *et al.*, 2021).

Nesse contexto, os dados apresentados na Tabela 3 reforçam a eficiência da rota de hidroesterificação enzimática, especialmente para substratos de baixa qualidade. Na etapa de hidrólise, Vescovi *et al.* (2016) reportaram uma conversão completa do óleo de fritura – à concentração de 20% v/v – após 24 horas de reação,

utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* em sua forma livre, operando em meio aquoso e sob razão molar de 1:5,6. Já Costa *et al.* (2020) obtiveram 98,36% de hidrólise de óleo de fritura – à concentração de 20% m/v – em apenas 40 minutos, empregando 4,4 U/g de extrato bruto de *Geotrichum candidum*, demonstrando o alto desempenho catalítico de lipases fúngicas em condições brandas de temperatura – variando-se entre 30 e 60°C.

De maneira análoga, a etapa de esterificação também apresentou elevados rendimentos sob condições moderadas de temperatura, variando entre 35 e 50%. Alexandre *et al.* (2022) alcançaram 95,97% de conversão de ácidos graxos livres provenientes de óleo de babaçu refinado, utilizando razão molar AGL:metanol de 1:5, com aplicação da lipase Eversa® Transform 2.0 em sua forma livre – 0,5% v/v – em meio líquido, após 5 horas de reação. Em adição, Wancura *et al.* (2021) relataram um rendimento de 96,20% na conversão de AGL de óleo de fritura, sob razão molar de 1:6,3 em metanol, empregando uma solução de Eversa® Transform 2.0 a 0,7 % v/v, após 8 horas de reação. Esses resultados evidenciam o potencial catalítica da Eversa® Transform 2.0, mesmo diante de substratos residuais e álcoois primários em excesso.

Por fim, vale destacar que as lipases oriundas de espécies fúngicas são as mais comumente empregadas em processos industriais. Essa preferência existe em decorrência da alta disponibilidade e fácil produção das lipases fúngicas em relação àquelas provenientes de outros organismos vivos. As lipases mais comumente empregadas na produção de biodiesel pertencem aos gêneros *Candida*, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Termomyces* (Hama *et al.*, 2018).

2.1.4.1 Lipase de *Candida rugosa*

A *Candida rugosa* é um tipo de levedura esférica que forma colônias rugosas, cuja coloração varia de branca a creme. Sua reprodução ocorre principalmente por brotamento multilateral, podendo apresentar ramificações e pseudohifas. Esta levedura apresenta uma temperatura ótima de crescimento entre 20°C e 30°C e para seu crescimento necessita de macronutrientes como enxofre, potássio e nitrogênio, além de uma fonte de carbono. Embora possa ser patogêna quando presente na corrente sanguínea, raramente causa infecção (Schaechter, 2009; Pfaller *et al.*, 2006). Esse microrganismo produz lipases não específicas que catalisam a hidrólise

das moléculas de acilglicerol de maneira aleatória, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis como intermediários (Lerin *et al.*, 2012).

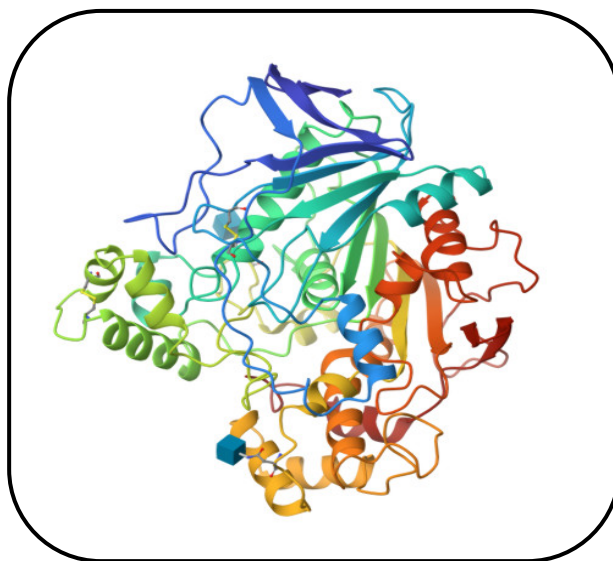
A lipase de *Candida rugosa* (LCR) é uma enzima de regiospecificidade inespecífica, o que possibilita a hidrólise dos ácidos graxos presentes em todas as posições das moléculas de triacilglicerol no meio reacional. Essa característica, aliada à sua elevada atividade catalítica em meios aquosos e hidrofóbicos, bem como à sua alta especificidade de substrato, estereosseletividade e quimiosseletividade, favorece amplamente suas aplicações em processos de biotransformações (Domínguez de Maria *et al.*, 2006). As LCR apresentam maior atividade catalítica na temperatura de 40°C e pH 7,0, condições frequentemente empregadas em reações de hidrólise enzimática (Frazão *et al.*, 2024).

Dessa forma, essas propriedades conferem à LCR um grande potencial catalítico na etapa de hidrólise. Esse potencial foi comprovado por Talukder *et al.* (2010) e Domingues *et al.* (2022), que obtiveram, respectivamente, um rendimento final de hidrólise de 99% e 96%, após duas horas de reação.

Os sítios ativos das lipases são formados por grupamentos de aminoácidos polares – serina, histidina e aspartato. Esses sítio-ativos podem ser reversivelmente fechados por uma sequência de aminoácidos apolares, mantendo a enzima em sua forma inativa até que haja o contato com um substrato oleaginoso. Portanto, para que uma lipase possa se apresentar em ambas as formas, ativa e inativa, é crucial que haja um equilíbrio adequado entre a quantidade de aminoácidos polares e apolares em sua composição (Cavalcante *et al.*, 2021).

Um trabalho realizado por Grochulski e colaboradores (1994) teve como intuito o sequenciamento e a caracterização morfológica das LCR, possibilitando a determinação da conformação tridimensional dessas enzimas (Figura 8).

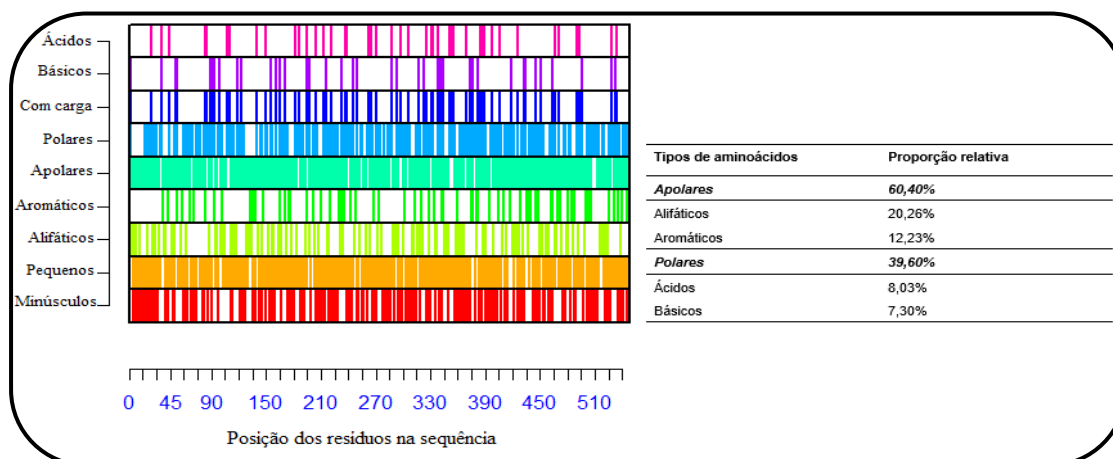
Figura 8 – Estrutura tridimensional de uma lipase de *Candida rugosa*



Fonte: Protein Data Bank (Código: 1TRH).

A partir da sequência de aminoácidos obtida por este trabalho, foi possível, com o auxílio do programa *Rstudio*, determinar a posição e quantidade de cada tipo de aminoácido presente em sua estrutura (Figura 9), além de verificar suas proporções relativas e o ponto isoelétrico dessa enzima, sendo este igual a 5,08.

Figura 9 – Quantidade e posição dos tipos de aminoácidos presentes em uma Lipase de *Candida rugosa*



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

2.1.4.2 Lipase Eversa® Transform 2.0

A lipase Eversa® Transform 2.0 (ET 2.0) é uma enzima líquida derivada da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), produzida por uma cepa geneticamente

modificada do microrganismo *Aspergillus oryzae*, e tem se destacado como uma solução catalítica eficiente e economicamente viável para a síntese de biodiesel e biolubrificantes (Alexandre *et al.*, 2022). Desenvolvida comercialmente pela empresa dinamarquesa *Novozymes* em 2016, essa lipase apresenta excelente termoestabilidade e alta eficiência na catálise das reações de transesterificação e esterificação (Monteiro *et al.*, 2021). Sua atividade catalítica máxima de esterificação é observada em temperaturas entre 40 e 50 °C e em pH próximo de 7,0 (Zou *et al.*, 2020).

Sua capacidade de atuar em ambas as rotas reacionais permite a conversão dos triacilgliceróis e ácidos graxos livres em ésteres monoalquílicos, mesmo quando se utilizam matérias-primas com elevado teor de acidez, como óleos residuais e gorduras animais. Dessa forma, um dos principais diferenciais da ET 2.0 é sua elevada flexibilidade quanto à qualidade da matéria-prima, sendo compatível com substratos lipídicos de baixa pureza (Facin *et al.*, 2021; Sousa Jr. *et al.*, 2023).

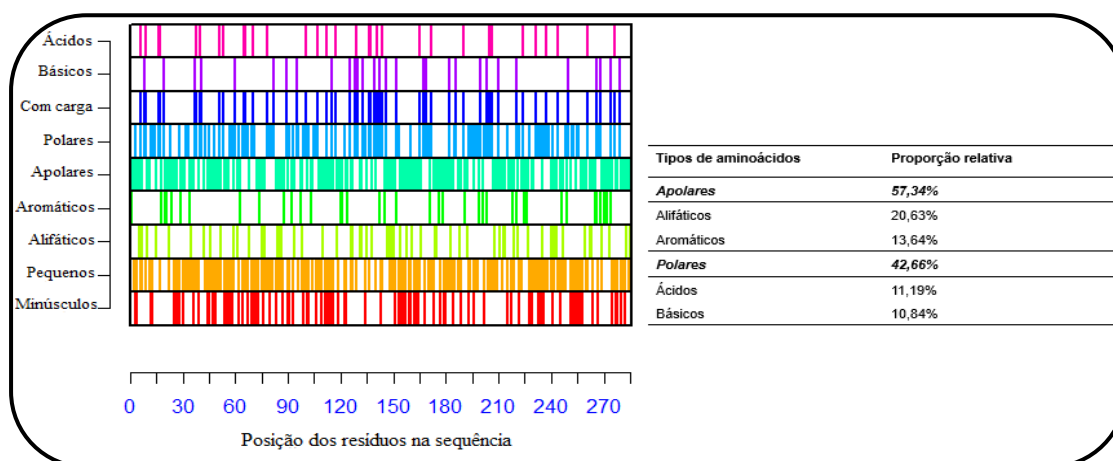
Entre as vantagens associadas ao uso de lipases líquidas destaca-se o menor custo em comparação às lipases imobilizadas, o que contribui para a redução do custo final do processo (Sun *et al.*, 2021). Além disso, lipases imobilizadas tendem a apresentar menor desempenho na rota de transesterificação devido ao acúmulo de glicerol sobre o suporte sólido, formando um filme hidrofílico que compromete a transferência de massa e, conseqüentemente, a sua atividade catalítica. Em contrapartida, lipases em meio líquido, como a ET 2.0, não apresentam essa limitação, demonstrando elevada eficiência catalítica na produção de biodiesel tanto pela rota de transesterificação, quanto pela rota de hidroesterificação (Bhatt *et al.*, 2020; Monteiro *et al.*, 2021).

Estudos prévios evidenciam o alto desempenho dessa lipase na etapa de esterificação de AGL, com conversões expressivas reportadas: 86,56% (Vieira *et al.*, 2021), 91,00% (Ketzner *et al.*, 2022) e 96,20% (Wancura *et al.*, 2021). No entanto, por se tratar de uma enzima relativamente recente no mercado, ainda há uma quantidade limitada de estudos voltados à sua aplicação prática, o que reforça a relevância de investigações adicionais utilizando a ET 2.0 na etapa de esterificação neste trabalho.

Diferentemente da LCR, cuja estrutura e propriedades já são amplamente descritas na literatura (Grochulski *et al.*, 1994), a ET 2.0 ainda não foi completamente caracterizada. Contudo, o estudo conduzido por Sousa Jr. *et al.*,

(2023) possibilitou a estimativa da sequência de aminoácidos desta enzima. A partir desta sequência e por meio do software *Rstudio*, foi possível determinar a composição, a localização e a sua proporção relativa dos aminoácidos, bem como o ponto isoelétrico da enzima, calculado em 5,31. Esses dados estão representados na figura 10.

Figura 10 – Quantidade e posição dos tipos de aminoácidos presentes em uma Eversa® Transform 2.0



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

2.2.1.1 Enzimas

Foram utilizadas duas preparações de lipases comerciais ambas microbianas: LCR, tipo VII, adquirida da empresa Sigma Co. (EUA) e a Eversa Transform 2.0 (ET 2.0), cedida pelo Prof. Paulo Waldir Tardioli, do DEQ/UFSCar.

2.2.1.2 Substrato

O óleo de fritura foi coletado durante a execução do Projeto de Extensão em interface com a Pesquisa, intitulado “*Produção de biodiesel empregando rotas alternativas e óleo de fritura como matéria-prima*”. Este projeto teve como principal objetivo a conscientização da população, no âmbito escolar, sobre os problemas

relacionados ao descarte inadequado do ORF no meio ambiente, além de promover uma solução para a sua reutilização, como na síntese de biodiesel. Para isso, os alunos do Ensino Médio da Escola Estadual Judith Vianna, Alfenas/MG, doaram o ORF, coletado à domicílio, de composição desconhecida.

2.2.1.3 Reagentes

Os outros reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho incluem Azeite de oliva, da Carbonell® e Albumina sérica bovina (BSA), da Sigma-Aldrich®. Os demais reagentes utilizados em grau analítico estão descritos no Apêndice A.

2.2.2 Procedimentos experimentais

2.2.2.1 Caracterização do óleo residual de fritura

2.2.2.1.1 Filtração do óleo residual de fritura

Para a remoção de impurezas do ORF, foi realizada uma filtração a vácuo. Após a filtração, o óleo clarificado foi armazenado para uso posterior.

2.2.2.1.2 Determinação da densidade

A determinação da densidade (d) foi realizada conforme os procedimentos descritos na norma ASTM D891, que estabelece a metodologia para a medição da gravidade específica de líquidos industriais (ASTM International, 2000). Para tanto, um picnômetro de 50 mL foi preenchido com ORF e, em seguida, submetido à pesagem. A partir dos valores observados e da Equação 1, foi possível calcular a densidade dessa substância.

$$d = \frac{m_{\text{cheio}} - m_{\text{vazio}}}{V} \quad (1)$$

m_{cheio} = Massa do picnômetro preenchido com ORF (mg);

m_{vazio} = Massa do picnômetro vazio (mg);

V = Volume de ORF pesado (mL).

2.2.2.1.3 Determinação do teor de umidade

A determinação da umidade (%wt) foi realizada conforme as normas estabelecidas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Para isso, foram pesadas 5 g de ORF, em triplicata, dentro de um cadinho de porcelana. Essas amostras foram submetidas a uma operação de secagem, dentro de uma estufa, a 105°C, por 1 hora. Após esse tempo, as amostras foram resfriadas à vácuo, com o intuito de evitar o acúmulo de umidade do ar e, em seguida, pesadas novamente.

Este processo foi repetido até que as massas das amostras se mantivessem constantes. Então, a partir dos resultados obtidos, pôde-se determinar o teor de umidade por meio da Equação 2.

$$\%wt = [1 - (m_f / m_i)] \times 100 \quad (2)$$

m_i = Massa inicial da amostra de ORF (g);

m_f = Massa da amostra de ORF após a operação de secagem (g).

2.2.2.1.4 Determinação do índice de acidez total

O índice de acidez total (IA) é definido como a quantidade de KOH, em mg, necessárias para neutralizar a quantidade de ácidos graxos livres presentes em 1 g de amostra (Moretto; Fett, 1998).

A metodologia utilizada para determinar o valor de IA foi modificada a partir do método proposto por Moretto & Fett (1998). Para isso, foram pesadas, em triplicata, 2 gramas da amostra de ORF, às quais foram adicionadas 25 mL de uma solução de éter etílico/álcool etílico 2:1 (v/v), à temperatura ambiente, sob agitação constante. Reações em triplicata sem a presença do óleo (branco), também foram realizadas, a fim de se corrigir potenciais alterações de pH presentes na solução de éter/álcool.

Foram adicionadas três gotas de fenolftaleína como indicador ácido-base e titularam-se as amostras com uma solução de KOH 0,01 mol/L, até o aparecimento de uma coloração rósea. O índice de acidez total, dado em mg KOH/g óleo foi calculado pela Equação 3.

$$IA = \frac{(V_A - V_B) \times MM_{KOH} \times C_{KOH}}{m} \quad (3)$$

C_{KOH} = Concentração molar da solução de KOH (mol/L);

m = Massa da amostra de ORF (g);

MM_{KOH} = Massa molar do KOH (56,11 g/mol);

V_A = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_B = Volume de KOH gasto na titulação do controle (mL).

2.2.2.1.5 Determinação do índice de saponificação

O índice de saponificação (IS) foi determinado conforme metodologia adaptada descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Foi preparada uma solução de KOH 0,5 mol/L em etanol 70%. Dessa solução, foram adicionadas, em duplicata, 25 mL em conjunto com 2 g de amostra de óleo dentro de um balão de fundo redondo.

Esses balões foram adaptados a um condensador de refluxo e as amostras foram aquecidas brandamente à temperatura de ebulição (aproximadamente, 95°C), por 30 minutos, visando-se induzir à formação de sais alcalinos de ácidos graxos, por saponificação.

Em seguida, as amostras foram resfriadas e após adição de três gotas de fenolftaleína como indicador ácido-base, os conteúdos foram titulados com uma solução de HCl 0,5 mol/L até o desaparecimento da coloração rósea.

Esse mesmo procedimento foi feito em duplicata para o branco (na ausência do óleo). A diferença entre os volumes de HCl gastos nas duas titulações é equivalente à quantidade de KOH gasto na saponificação. O índice de saponificação foi calculado de acordo com a equação 4.

$$IS = \frac{(V_B - V_A) \times MM_{KOH} \times C_{HCl}}{m} \quad (4)$$

C_{HCl} = Concentração molar da solução de HCl (mol/L);

m = Massa da amostra de ORF (g);

MM_{KOH} = Massa molar do KOH (56,11 g/mol);

V_A = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_B = Volume de KOH gasto na titulação do controle (mL).

2.2.2.1.6 Determinação do índice de peróxidos

O índice de peróxido (IP) da matéria prima foi determinado de acordo com a metodologia adaptada e proposta pela AOCS (2004). Para essa determinação uma massa de 3 gramas em triplicatas foi pesada, sendo dissolvidas em 30 mL de uma solução de ácido acético/clorofórmio 3:2 (v/v). Soluções em branco também foram preparadas sem a adição das amostras de óleo.

Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de uma solução saturada de iodeto de potássio. Após essa adição, as soluções foram imediatamente guardadas, ao abrigo da luz, por 1 minuto. Após esse tempo, foram adicionados 30 mL de água destilada e 0,5 mL de uma solução de amido 1% às reações, homogeneizando-se seu conteúdo com agitação manual.

Por fim, as reações foram tituladas com tiosulfato de sódio 0,01 mol/L. Em seguida, o índice de peróxido foi calculado utilizando-se a Equação 5.

$$IP = \frac{(V_A - V_B) \times C_{\text{tios}} \times 10^3}{m} \quad (5)$$

C_{tios} = Concentração molar da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (mol/L);

m = Massa da amostra de ORF (g);

V_A = Volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação da amostra (mL);

V_B = Volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação do controle (mL).

2.2.2.1.7 Determinação do índice de iodo

O índice de iodo (II) foi determinado conforme metodologia modificada proposta por Friedman (Tubino; Aricetti, 2013). Para essa determinação, 0,1 g de amostra de óleo foram pesadas, em duplicata, 0,1 g de amostra de óleo foram pesadas, em duplicata, às quais foram adicionados 15 mL de etanol, sob agitação constante, por 2 minutos. Após esse tempo, foi adicionada uma solução etanólica de iodo 0,1 mol/L, com agitação constante, por 5 minutos.

As amostras foram tituladas com uma solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol/L, até verificar o aparecimento de uma coloração fracamente amarelada. Em

seguida, foram adicionados 2 mL de uma solução de amido 1%, retomando-se a titulação até verificar o volume necessário para o aparecimento de uma coloração branca com aspecto leitoso.

O procedimento foi repetido para soluções branco, na ausência de amostras de óleo. O cálculo do índice de iodo foi realizado pela Equação 6.

$$II = \frac{(V_B - V_A) \times C_{\text{tios}} \times 12,69}{m} \quad (6)$$

C_{tios} = Concentração molar da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (mol/L);

m = Massa da amostra de ORF (g);

V_A = Volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação da amostra (mL);

V_B = Volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação do controle (mL).

2.2.2.2 Caracterização das lipases comerciais

2.2.2.2.1 Determinação da concentração de proteína

O teor de proteína das preparações enzimáticas comerciais foi dosado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Albumina sérica bovina (BSA) foi usada como padrão para preparar uma curva de calibração na faixa de concentração de 0 a 0,8 mg/mL, conforme apresentado no Apêndice B.

Como a solução líquida de ET 2.0 disponibilizada comercialmente é extremamente concentrada, foi realizada uma diluição (1:100) para que esta pudesse ser devidamente caracterizada.

Com a curva obtida foi possível obter uma equação da reta (Equação 7) que estabelece a relação entre a leitura da absorbância de uma amostra no espectrofotômetro a 595 nm (y) e a sua respectiva concentração de proteína (x).

$$y = 0,9864x + 0,0309 \quad (7)$$

2.2.2.2.2 Determinação da atividade lipolítica das lipases

A atividade lipolítica (AL) das preparações enzimáticas foi determinada,

conforme metodologia estabelecida por Soares *et al.* (1999). O substrato foi preparado pela emulsão do azeite de oliva e água destilada na proporção 1:1 e goma arábica a 7% (m/v). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, 4,9 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,0) e 0,1 mL da solução enzimática. Para a LCR, essa solução foi padronizada a 5 mg sólido/mL, enquanto que a solução líquida de ET 2.0 foi diluída em água destilada (1:10).

Os frascos foram incubados a 37 °C por 5 min, em banho termostático com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,02 mol/L, utilizando fenolftaleína como indicador.

Os cálculos foram realizados pela equação 8 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. Em paralelo, foi realizado um ensaio controle utilizando água destilada. As atividades foram expressas em μmoles/mg.min (U).

$$AL = \frac{(V_A - V_B) \times C_{NaOH} \times 10^3}{t \times V} \quad (8)$$

C_{NaOH} = Concentração molar da solução de NaOH (mol/L);

t = Tempo de reação (min);

V = Volume de solução enzimática (mL)

V_A = Volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_B = Volume do NaOH gasto na titulação do controle (mL).

2.2.2.3 Otimização da hidrólise enzimática do óleo residual de fritura

2.2.2.3.1 Planejamento fatorial

Foi conduzido um estudo experimental para avaliar o efeito das variáveis concentração de ORF (% m/v) e concentração de LCR (% m/v) sobre a porcentagem de hidrólise do óleo residual de fritura. Para isso, utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR 2²), composto por 11 ensaios: quatro pontos fatoriais, quatro pontos axiais e três repetições no ponto central. O planejamento experimental foi elaborado com o auxílio do software *Protimiza Experimental Design*.

A seleção dos níveis das variáveis considerou dados reportados na literatura. Costa *et al.* (2020) obtiveram as maiores porcentagens de hidrólise em meios reacionais com concentração de 20% m/v de ORF. Kannan *et al.* (2015), por sua vez, relataram os maiores rendimentos de hidrólise em concentrações enzimáticas entre 10 e 20% m/v. Diante disso, os pontos centrais adotados para este experimento foram as concentrações de 20% m/v para o ORF e de 15% m/v para a LCR. A Tabela 4 apresenta os demais níveis reais e codificados das variáveis, bem como os ensaios propostos para a etapa de hidrólise.

Tabela 4 – Níveis reais e codificados das variáveis utilizados nos ensaios de hidrólise do óleo de fritura (DCCR 2²)

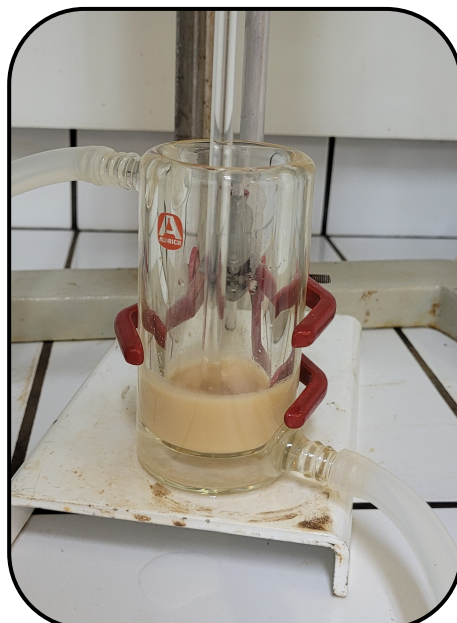
| Ensaio | Concentração de ORF (% m/v) | Concentração de LCR (% m/v) | Volume de ORF (mL) | Volume de água destilada (mL) | Massa de enzima (g) |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------|
| 1 | -1 (10) | -1 (10) | 1,55 | 13,45 | 1,50 |
| 2 | +1 (30) | -1 (10) | 4,64 | 10,36 | 1,50 |
| 3 | -1 (10) | +1 (20) | 1,55 | 13,45 | 3,00 |
| 4 | +1 (30) | +1 (20) | 4,64 | 10,36 | 3,00 |
| 5 | -1,41 (5,86) | 0 (15) | 0,91 | 14,09 | 2,25 |
| 6 | +1,41 (34,14) | 0 (15) | 5,26 | 9,74 | 2,25 |
| 7 | 0 (20) | -1,41 (7,93) | 3,09 | 11,91 | 1,17 |
| 8 | 0 (20) | +1,41 (22,07) | 3,09 | 11,91 | 3,31 |
| 9 | 0 (20) | 0 (15) | 3,09 | 11,91 | 2,25 |
| 10 | 0 (20) | 0 (15) | 3,09 | 11,91 | 2,25 |
| 11 | 0 (20) | 0 (15) | 3,09 | 11,91 | 2,25 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

2.2.2.3.2 Procedimento experimental para o planejamento proposto

As reações de hidrólise foram realizadas em um reator de vidro de 100 mL encamisado contendo quantidades apropriadas de óleo de fritura e solução enzimática, de acordo com os ensaios estabelecidos pela matriz do planejamento fatorial. As misturas foram incubadas sob agitação mecânica constante de 1000 rpm e a temperatura do sistema foi mantida em 40 ± 2 °C (Figura 11).

Figura 11 – Hidrólise do óleo de fritura



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

As amostras de 1 g dessa mistura foram retiradas no tempo inicial e após 100 minutos de reação para acompanhamento da evolução da hidrólise. Cada 1 g de amostra foi adicionado a 10 mL de álcool/acetona 1:1 (v/v), e tituladas com uma solução aquosa de KOH 0,02 mol/L, utilizando-se fenolftaleína como indicador ácido-base. Os experimentos foram efetuados de maneira randômica.

Como variável resposta foi considerada a porcentagem de hidrólise ($H\%$), calculada como descrito na equação 9.

$$H\% = \frac{(V_x - V_0) \times C_{\text{KOH}} \times \text{MM}_{\text{KOH}}}{\text{IS} \times m \times f} \quad (9)$$

C_{KOH} = Concentração molar da solução de KOH (mol/L);

f = Fração mássica de óleo (%);

IS = Índice de Saponificação do ORF (mg KOH/g óleo);

m = Massa de ORF presente na amostra (g);

MM_{KOH} = Massa molar do KOH (56,11 g/mol);

V_0 = Volume de KOH gasto na titulação da amostra no tempo 0 (mL);

V_x = Volume de KOH gasto na titulação da amostra no tempo x (mL).

2.2.2.3.3 Influência do tempo na hidrólise do óleo de fritura

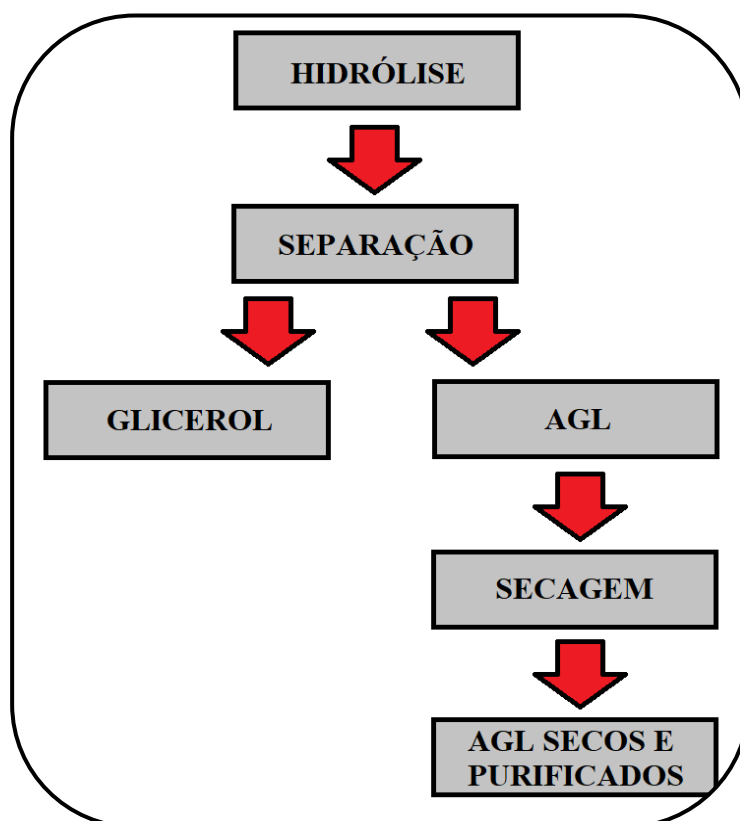
Após os testes preliminares baseados no planejamento experimental foram realizados ensaios de hidrólise variando-se o tempo de retirada das amostras, com o intuito de analisar a influência do tempo no teor de hidrólise, assim como verificar a reprodutibilidade deste experimento. Para isso, foram utilizadas as porcentagens mássicas de enzima e substrato que produziram os melhores resultados em experimentos anteriores. Alíquotas de 1 grama de amostra foram retiradas nos tempos t_0 , t_{30} , t_{60} , t_{100} e t_{150} , ou seja, no início da reação e após 30, 60, 100 e 150 minutos, respectivamente.

Essas amostras foram tituladas de maneira similar aos experimentos descritos no item 2.2.2.3.2, anotando-se o volume gasto no tempo zero (V_0) e após cada intervalo (V_x) e as porcentagens de hidrólise para cada intervalo foram calculadas de acordo com a equação 9.

2.2.2.4 Separação, recuperação e purificação dos ácidos graxos livres

No final da etapa do processo de hidrólise foram formados os ácidos graxos livres e glicerol (Cavalcante *et al.*, 2021). Conforme esquematizado pela Figura 12, os AGL devem ser separados do glicerol e toda água presente removida para que possam seguir para a etapa de esterificação.

Figura 12 – Esquematização do processo de separação dos AGL



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

O conteúdo do reator foi transferido para um funil de separação de 125 mL e deixado em repouso por 24 horas para a separação das fases (AOAC, 1990). Após 24 horas, as duas fases contendo essas substâncias estavam completamente separadas, conforme é ilustrado pela Figura 13. A fase inferior (glicerol), por ser a mais densa, foi separada e decantada no funil, podendo ser reaproveitada posteriormente para uso cosmético.

Figura 13 – Separação dos AGL sintetizados por hidrólise



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Para a separação dos ácidos graxos livres (AGL) remanescentes na fase superior, foram realizadas cinco lavagens com 15 mL de água destilada aquecida a aproximadamente 70°C com um intervalo de um dia entre cada lavagem. A água de lavagem decantada com impurezas foi descartada ao final de cada processo.

Na sequência, os ácidos graxos livres (AGL) foram filtrados em um filtro de papel contendo 1 grama de sulfato de sódio anidro.

2.2.2.5 Esterificação enzimática dos ácidos graxos livres

As reações de esterificação foram conduzidas entre os AGL puros, obtidos no item 2.2.2.4, e o álcool etílico anidro, segundo a metodologia proposta por Reis *et al.* (2020), com pequenas adaptações.

Em frascos de vidro âmbar de 10 mL foram adicionados os AGL, o etanol anidro e a solução enzimática de ET 2.0, sendo incubados em banho-maria a 35°C, com agitação orbital constante de 240 rpm. As proporções de AGL e etanol variaram de acordo com as razões molares estudadas. A porcentagem de enzima utilizada e o

tempo de reação também foram variáveis que foram avaliadas.

Para se avaliar o efeito da razão molar, foram usadas as proporções de 1:1, 1:2 e 1:3 entre AGL e etanol. O processo de esterificação foi conduzido por 4 h.

Em seguida, mantendo-se a razão molar AGL:etanol em 1:2 e o tempo de reação em 4 h, avaliou-se o efeito da concentração enzimática, variando-se a porcentagem de enzima adicionada em 1,5%, 2,5%, 5% e 7,5%.

Por fim, o efeito do tempo de reação na porcentagem de esterificação foi avaliado, utilizando 2,5% de solução enzimática. As amostras foram coletadas nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 6 horas de reação.

Amostras de 100 µL foram retiradas no final da reação, adicionadas a um *Erlenmeyer* de 250 mL, contendo 10 mL de uma solução de etanol:acetona 1:1 e três gotas de fenolftaleína, e tituladas com uma solução de KOH 0,02 mol/L.

As reações controle (branco) foram conduzidas na ausência da enzima, substituindo-a por água destilada no meio reacional. A porcentagem de esterificação (E%) foi estimada por meio da Equação 10.

$$E\% = \frac{(V_B - V_A)}{V_B} \times 100 \quad (10)$$

V_A = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_B = Volume de KOH gasto na titulação do branco (mL).

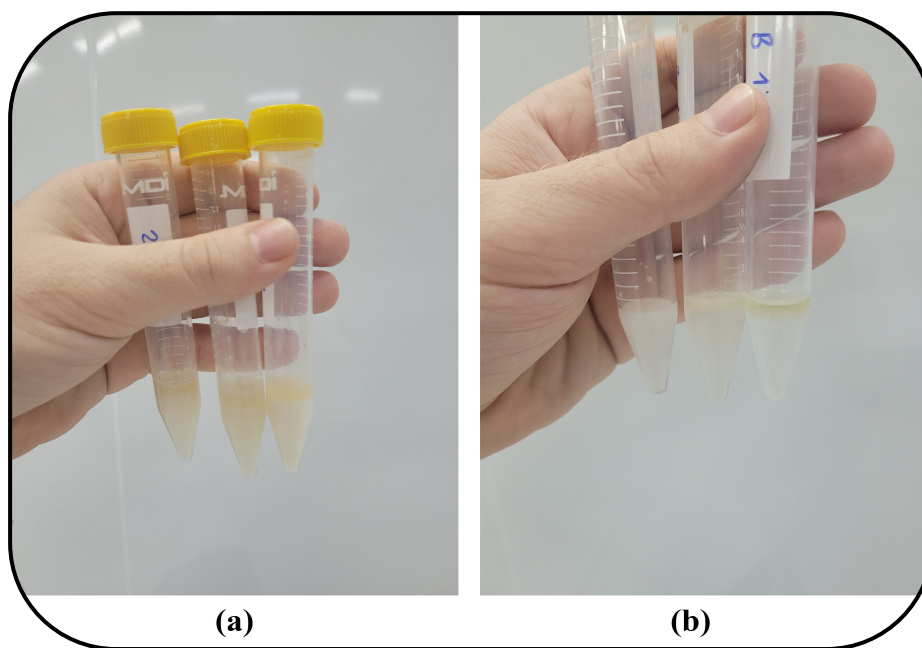
2.2.2.6 Purificação dos ésteres etílicos

O processo de separação e purificação dos ésteres etílicos foi adaptado com base na metodologia descrita pela AOAC (1990), originalmente desenvolvida para a separação de ácidos graxos livres. Para isso, os ésteres etílicos produzidos foram transferidos para tubos *Falcon* de 15 mL, aos quais foram adicionados 1,4 mL de água destilada à aproximadamente 70°C e agitados vigorosamente.

Os tubos foram então vedados e submetidos à centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Em seguida, a fase sobrenadante, correspondente aos ésteres etílicos, foi cuidadosamente transferida para um novo tubo Falcon, e o procedimento de lavagem com água destilada foi repetido mais duas vezes para garantir a remoção de impurezas.

A Figura 14 ilustra as amostras de ésteres etílicos antes da primeira (Figura 14a) e após a última lavagem com água destilada (Figura 14b).

Figura 14 – Amostras de ésteres etílicos antes da primeira e após a última lavagem



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).
Legenda: a) Antes da primeira lavagem.
b) Após a última lavagem.

Ao término da terceira lavagem, os ésteres foram colocados em uma estufa a 60°C por 24 horas para a remoção da água presente na amostra.

2.2.2.7 Análise da composição de ésteres etílicos

A análise da composição dos ésteres etílicos produzidos foi realizada por cromatografia gasosa. Para tal, as amostras de ésteres foram diluídas a 50 mg/mL em uma solução de heptadecanoato de metila, preparada em heptano, na concentração de 10 mg/mL. O heptano foi empregado como fase móvel, e o heptadecanoato de metila foi utilizado como padrão interno.

As análises foram conduzidas em um cromatógrafo a gás, modelo 7890A (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA), acoplado a um detector de ionização por chama, operando de acordo com as normas ASTM D6751 e EN 14103, e seguindo a metodologia descrita por Duvekot (2020).

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna capilar polar de

polietilenoglicol (PEG), modelo Rtx-Wax (*Restek Corporation*, Bellefonte, PA, EUA), com dimensões de 30 m × 0,25 m × 0,25 µm. O hélio foi empregado como gás de arraste, a uma temperatura constante de 210°C.

Após a injeção de alíquotas de 1 µL das soluções, os compostos foram separados na coluna cromatográfica, e os picos obtidos no cromatograma foram comparados, a partir de seus tempos de retenção, a padrões previamente caracterizados de ésteres etílicos presentes em amostras de biodiesel, conforme banco de dados desenvolvido pelos pós-graduandos do Laboratório de Tecnologia Enzimática, do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Essa comparação permitiu a identificação dos ésteres etílicos presentes nas amostras analisadas.

A quantificação dos ésteres foi realizada por meio da determinação das áreas relativas de cada pico cromatográfico, expressas em termos percentuais, conforme estabelecido na Equação 11.

$$\text{Éster}\% = \frac{A_i}{\sum A - A_{PI}} \times 100 \quad (11)$$

A_i = Área do pico do éster analisado;

$\sum A$ = Soma da área de todos os picos;

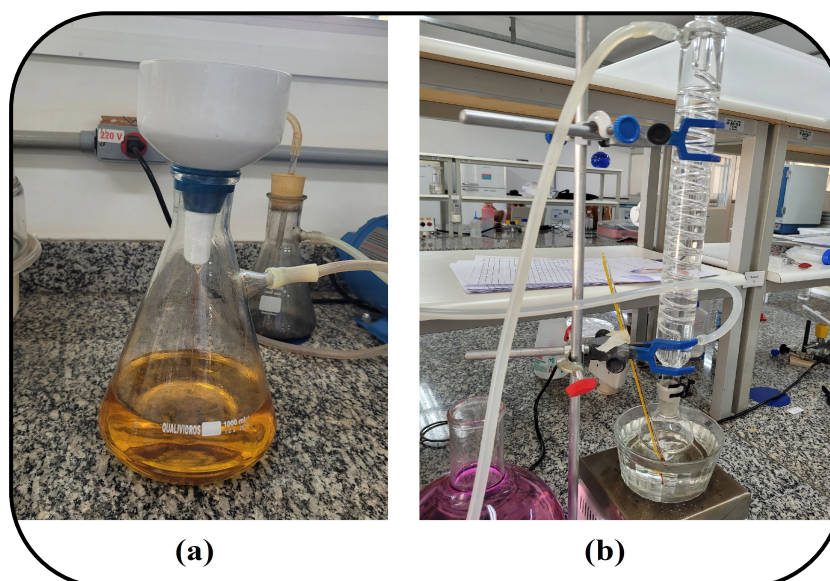
A_{PI} = Área do pico do padrão interno.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 Caracterizações do óleo residual de fritura

O óleo residual de fritura (ORF) foi filtrado, conforme ilustrado na Figura 15a e, posteriormente, caracterizado quanto aos teores de interesse para controle de qualidade, incluindo densidade, teor de umidade, índices de acidez total, iodo, peróxido, saponificação (conforme apresentado pela Figura 15b) e AGL, para verificar se esta matéria prima está dentro das condições necessárias para ser utilizada na produção de biodiesel.

Figura 15 – Filtração e determinação do índice de saponificação do óleo de fritura



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: a) Filtração.

b) Determinação do índice de saponificação.

Os dados referentes às propriedades físico-químicas do ORF, obtidas no presente trabalho, estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Propriedades físico-químicas do óleo residual de fritura

| Parâmetro | Valor obtido | Padrões observados na literatura (%) | | |
|---|-------------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | | Maddikeri et al., 2015 | Bueno-Borges et al., 2019 | Maceiras et al., 2017 |
| Densidade (g/mL) | $0,976 \pm 0,004$ | $0,93 \pm 0,00$ | $0,92 \pm 0,00$ | $1,030 \pm 0,001$ |
| Teor de umidade (%) | $0,63 \pm 0,12$ | - | $0,41 \pm 0,00$ | $0,24 \pm 0,02$ |
| Índice de acidez total (mg KOH/g óleo) | $1,28 \pm 0,02$ | $4,1 \pm 0,0$ | $1,72 \pm 0,00$ | $0,70 \pm 0,03$ |
| Índice de saponificação (mg KOH/g óleo) | $200,56 \pm 3,12$ | $206,0 \pm 0,0$ | - | $185,71 \pm 1,07$ |
| Índice de peróxidos (mEq O ₂ /Kg óleo) | $15,77 \pm 0,49$ | $25,0 \pm 0,0$ | $10,6 \pm 0,0$ | - |
| Índice de iodo (g I ₂ /100 g óleo) | $239,08 \pm 4,55$ | - | - | $181,96 \pm 1,52$ |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados obtidos permitem discutir sobre as características do ORF utilizado; os índices de acidez e peróxido indicam a deterioração do material lipídico

em termos de rancidez hidrolítica – pelo índice de acidez e pela concentração de ácidos graxos livres – e rancidez oxidativa – pelo índice de peróxidos. O índice de saponificação é útil para verificar a massa molar média e a possível adulteração por outros óleos com índices de saponificação muito diferentes (Cecchi, 2003). O índice de iodo revela o grau de insaturação das moléculas de triacilglicerol que compõem o ORF.

A comparação dos valores obtidos na caracterização do óleo residual de fritura neste estudo com os dados da literatura, conforme apresentado na Tabela 5 (Maddikeri *et al.*, 2015; Bueno-Borges *et al.*, 2019; Maceiras *et al.*, 2017), sugere que, em geral, o ORF utilizado está em conformidade com os padrões físico-químicos necessários para as propriedades do biodiesel.

Os valores obtidos para o índice de acidez total, índice de saponificação e índice de peróxidos mostraram-se compatíveis com aqueles reportados nos estudos comparados na Tabela 5, confirmando a adequação do ORF utilizado como matéria-prima viável para a síntese de biodiesel.

Com relação ao teor de umidade, o ORF se mostrou um pouco mais elevada (0,63% m/v) do que aqueles observados em outros trabalhos (Maceiras *et al.*, 2017; Bueno-Borges *et al.*, 2019), cujos valores variaram entre 0,24 e 0,41% (m/v). Esse fato pode estar atribuído ao leve aumento observado na densidade do ORF (0,976 g/mL) em relação aos valores encontrados na maioria dos trabalhos (Maddikeri *et al.*, 2015; Bueno-Borges *et al.*, 2019), variando entre 0,92 e 0,93 g/mL.

Vale ressaltar, que o excesso de água presente nos substratos oleaginosos (acima de 0,06%) pode potencializar a ocorrência de reações de saponificação quando se utiliza a rota convencional de transesterificação alcalina para a produção de biodiesel (Jayakumar *et al.*, 2021). Todavia, como o presente trabalho emprega o uso da rota de hidroesterificação enzimática, este leve aumento no teor de umidade não afeta significativamente a condução dos experimentos (Wancura *et al.*, 2020).

No entanto, o índice de iodo observado nas amostras de ORF (239,08 g I₂/100 g óleo) é duas vezes superior ao limite aceito para a síntese de biodiesel (120,00 g I₂/100 g óleo) (Mahmudul *et al.*, 2017). Um alto índice de iodo também foi observado no ORF caracterizado por Maceiras e outros colaboradores (2017), sendo este igual a 181,96 g I₂/100 g óleo. As divergências entre os índices de iodo obtidos neste trabalho e aqueles obtidos por Maceiras *et al.* (2017) podem ser atribuídas a diferentes variáveis, como a composição do ORF, além do tempo e da temperatura a

que foram submetidos durante o processo de fritura.

Um índice de iodo elevado indica a presença de uma grande quantidade de insaturações presentes nas moléculas de TAG e AGL. Essas insaturações podem levar ao acúmulo de gomas nos motores (Moretto; Fett, 1998) e podem indicar uma menor estabilidade oxidativa dos óleos, prejudicando sua aplicação industrial (Knothe, 2002). Por este motivo, testes práticos devem ser realizados com o produto obtido em motores de veículos para verificar a ocorrência desses potenciais inconvenientes.

2.3.2 Propriedades dos biocatalisadores

Os resultados da caracterização da LCR e da ET 2.0 em relação ao seu teor proteico e à sua atividade enzimática estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Caracterização da lipase de *Candida rugosa* e da Eversa® Transform 2.0 em relação ao teor de proteína e à atividade enzimática

| Enzima | Concentração (mg/mL) | Atividade Lipolítica (U/mL) | Atividade Específica (U/mg) |
|--------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| LCR | 0,074 ± 0,006 | 66,47 ± 2,99 | 898,24 ± 40,40 |
| ET 2.0 | 32,32 ± 1,23 | 15630,80 ± 377,80 | 483,63 ± 11,67 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

A determinação da atividade específica da LCR foi uma etapa preliminar necessária, tendo em vista que os valores de atividade fornecidos pelos fabricantes (Sigma-Aldrich®) são determinados na maioria dos casos por métodos diversos. Desta forma, na Tabela 6 é apresentado o valor de atividade lipolítica dessa lipase empregando a hidrólise do azeite de oliva (pH 7,0 e 37°C).

A atividade específica da lipase de *Candida rugosa* (Sigma-Aldrich®) identificada no rótulo é de 819 U/mg, similares às obtidas nesse experimento – 898,24 U/mg de proteína, indicando que não houve diferenças analíticas na dosagem de atividade como também uma preparação com alto teor de pureza entre as proteínas presentes. Uma alta atividade lipolítica, como a obtida nesse experimento (66,47 U/mL – 898,24 U/mg) demonstra uma grande afinidade da lipase a substratos oleaginosos, bem como, uma alta eficiência de seu emprego na catálise de hidrólise de óleos.

Sousa *et al.* (2024) obtiveram a atividade específica da ET 2.0 imobilizada em

um suporte de quitosana, agarose e glutaraldeído como igual a 74,39 U/g, utilizando p-NPB como substrato. Neste trabalho, a atividade lipolítica obtida para a ET 2.0, em sua forma livre, utilizando o método da hidrólise do azeite de oliva (Soares *et al.*, 1999) foi de 15630 U/mL, equivalente a 483,63 U/mg, indicando uma alta seletividade da enzima pelo substrato e alta eficiência.

2.3.3 Determinação das melhores condições de hidrólise

As reações químicas catalisadas por enzimas dependem de alguns parâmetros para ocorrer, como temperatura, agitação, concentração de substratos e enzima no meio, entre outros. Assim, é importante determinar as condições necessárias para que um processo enzimático atinja sua eficiência máxima, ou seja, uma maior taxa de conversão de reagentes em produtos no menor intervalo de tempo possível (Faillace *et al.*, 2023).

O efeito da temperatura é de suma importância para a ocorrência da reação, uma vez que cada enzima atua com maior eficiência em diferentes taxas de temperatura. Estudos realizados por Rashid *et al.* (2014) verificaram que a LCR apresenta uma melhor atividade a 40°C, quando aplicada em reações de hidrólise. Portanto, neste trabalho, a etapa de hidrólise foi realizada a uma temperatura constante de 40°C.

Outras variáveis cujos efeitos podem influenciar no rendimento final de uma reação incluem as concentrações de substrato e de catalisador presentes no meio. Logo, um delineamento composto central rotacional (DCCR 2²) foi utilizado para se determinar o efeito de duas variáveis independentes na reação: a concentração de ORF (% m/v) e a concentração de LCR (% m/v). Dentre as vantagens da utilização de um DCCR pode-se citar a análise de duas variáveis ao mesmo tempo, permitindo verificar se elas podem exercer efeitos sinérgicos ou antagônicos na variável resposta, além de reduzir consideravelmente o número de experimentos (Rodrigues; lemma, 2014).

Na Tabela 7, estão apresentadas as porcentagens de hidrólise obtidas para cada ensaio do DCCR 2². Essa porcentagem foi calculada pela quantificação dos AGL obtidos ao final da etapa de hidrólise (Equação 9). Os ensaios 9, 10 e 11, representados na Tabela 7, constituem os pontos centrais do experimento. O ponto central foi realizado em triplicata para se verificar a reprodutibilidade do experimento

e estimar o erro experimental.

Tabela 7 – Porcentagem de hidrólise catalisada por LCR, variando-se a concentração de ORF e a concentração de enzima (DCCR 2²)

| Ensaio | Concentração de ORF (% m/v) | Concentração de LCR (% m/v) | Porcentagem de hidrólise (%) |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1 | -1 (10) | -1 (10) | 77,50 |
| 2 | +1 (30) | -1 (10) | 62,02 |
| 3 | -1 (10) | +1 (20) | 69,42 |
| 4 | +1 (30) | +1 (20) | 60,32 |
| 5 | -1,41 (5,86) | 0 (15) | 83,60 |
| 6 | +1,41 (34,14) | 0 (15) | 60,36 |
| 7 | 0 (20) | -1,41 (7,93) | 68,46 |
| 8 | 0 (20) | +1,41 (22,07) | 61,93 |
| 9 | 0 (20) | 0 (15) | 63,60 |
| 10 | 0 (20) | 0 (15) | 66,06 |
| 11 | 0 (20) | 0 (15) | 66,68 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

As maiores porcentagens de hidrólise foram obtidas nos ensaios 5 e 1 (83,60% e 77,50%, respectivamente), os quais possuíam baixas porcentagens de óleo em sua composição (5,86% e 10%, respectivamente).

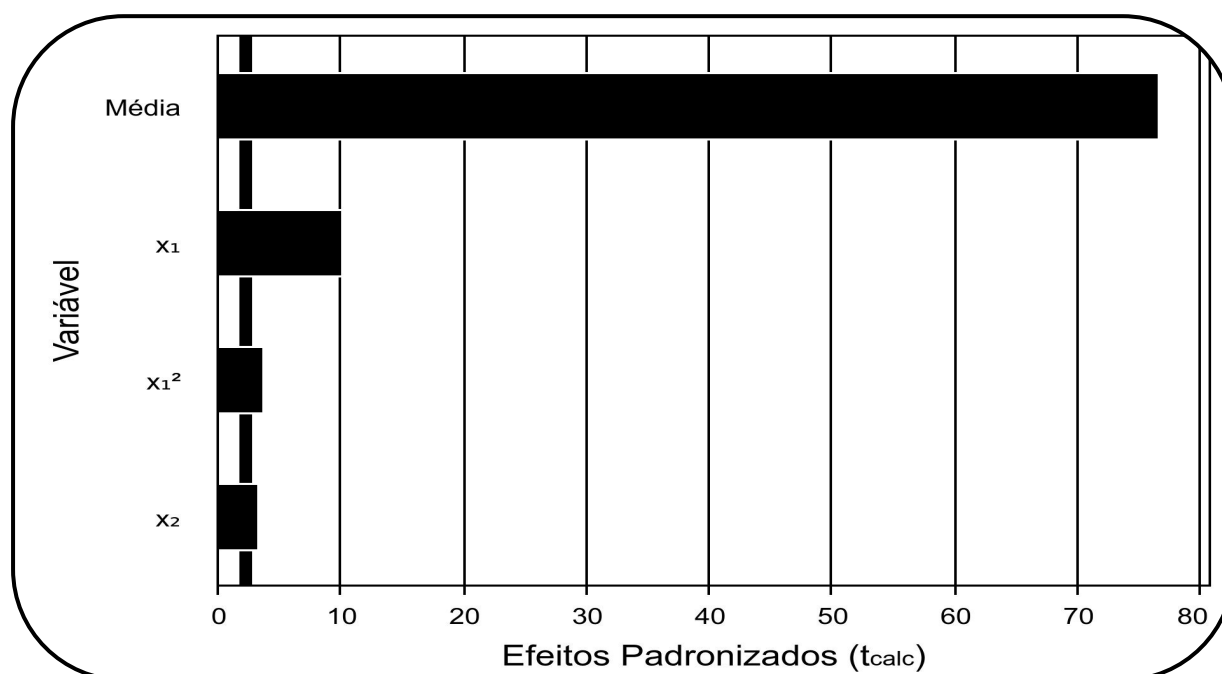
A Tabela 8 e o gráfico de Pareto, representado pela Figura 16, indicam que, ao nível de confiança de 95%, apenas os coeficientes lineares e quadráticos da variável concentração de ORF (x_1 e x_1^2 , respectivamente) e o coeficiente linear da variável concentração de LCR (x_2) são significativos. Por conseguinte, a equação 12 foi construída utilizando-se apenas os coeficientes estatisticamente significativos.

Tabela 8 – Coeficientes de regressão estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95% para a variável resposta porcentagem de hidrólise

| Fator | Coefficiente | Erro padrão | f_{calc} | p-valor |
|---------|--------------|-------------|-------------------|---------|
| Média | 65,03 | 0,85 | 76,74 | 0,0000 |
| x_1 | -7,18 | 0,71 | -10,07 | 0,0000 |
| x_1^2 | 3,08 | 0,81 | 3,79 | 0,0068 |
| x_2 | -2,38 | 0,71 | -3,33 | 0,0125 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Figura 16 – Gráfico de Pareto ao nível de 95% de confiança para a análise do efeito das variáveis concentração de ORF (x_1) e concentração de LCR (x_2) na porcentagem de hidrólise

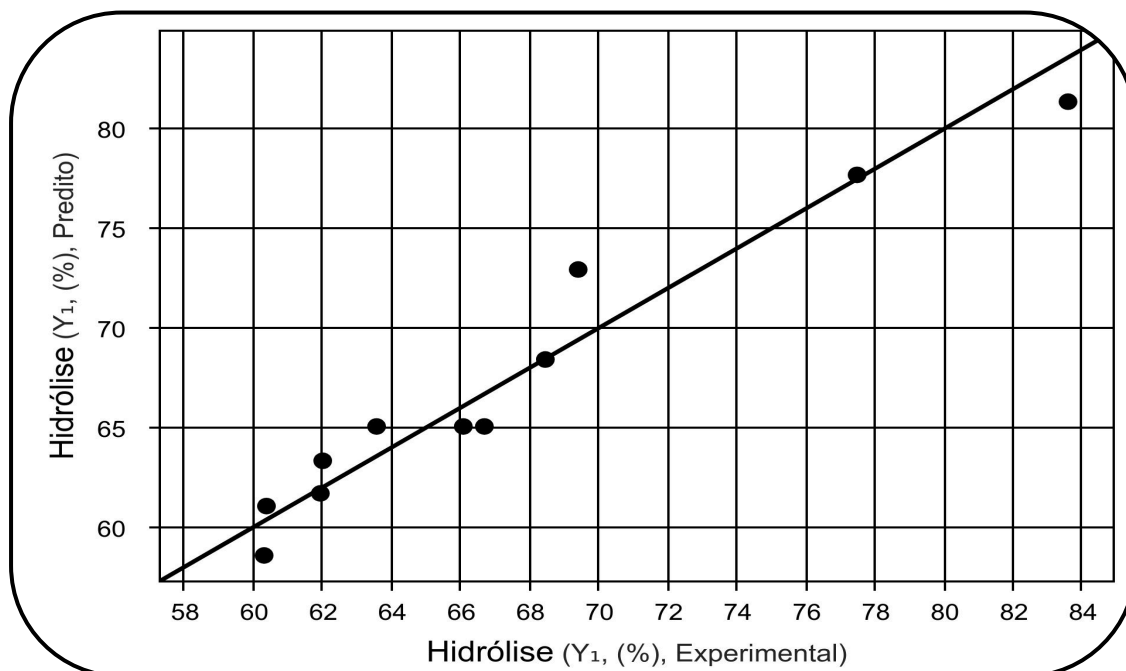


Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

$$y = 65,03 - 7,18 x_1 + 3,08 x_1^2 - 2,38 x_2 \quad (12)$$

O coeficiente de determinação deste modelo (R^2) foi de 94,77%, indicando que a equação gerada se ajustou bem aos dados experimentais. Na Figura 17, observou-se uma grande proximidade entre os dados preditos pelo modelo e aqueles obtidos experimentalmente.

Figura 17 – Comparação entre as porcentagens de hidrólise obtidas experimentalmente e as porcentagens previstas pela Equação 12



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 9) para o modelo obtido mostrou que o valor de F calculado (F_{calc}) de 42,3 foi maior que o valor de F tabelado (F_{tab}) de 4,35 a 95% de confiança. Além disso, a falta de ajuste não é estatisticamente significativa ($p\text{-valor} > 0,05$), permitindo a validação do modelo gerado para gerar as superfícies de respostas e as curvas de contorno para a análise estatística.

Outra informação fornecida pela ANOVA é o valor do erro puro (5,3). Um erro puro baixo, como o obtido neste trabalho, indica uma boa reprodutibilidade dos dados experimentais (Costa *et al.*, 2020).

Tabela 9 – Análise de variância (ANOVA) para o modelo obtido

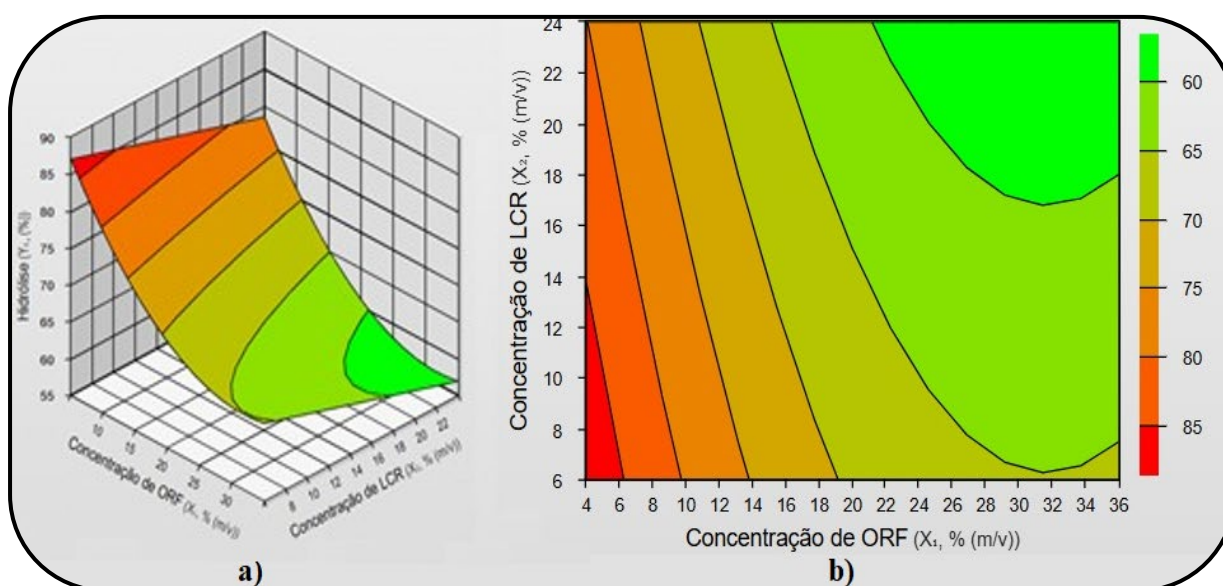
| Fonte de variação | Soma dos quadrados (SQ) | Graus de liberdade (GL) | Quadrado médio (QM) | f_{calc} | p-valor |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------|---------|
| Regressão | 516,3 | 3 | 172,1 | 42,3 | 0,00007 |
| Resíduos | 28,5 | 7 | 4,1 | | |
| Falta de ajuste | 23,2 | 5 | 4,6 | 1,7 | 0,40434 |
| Erro puro | 5,3 | 2 | 2,7 | | |
| Total | 544,8 | 10 | | | |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

De acordo nos resultados obtidos, foi construído um modelo empírico de segunda ordem. Esse modelo permitiu realizar uma análise estatística para descrever a variação na porcentagem final de hidrólise em função da concentração de ORF (x_1) e da concentração de enzima (x_2).

A Figura 18 ilustra a superfície de resposta (Figura 18a) e a curva de contorno (Figura 18b) previstas pelo modelo para a variável resposta, porcentagem de hidrólise.

Figura 18 – Superfície de resposta e curva de contorno mostrando a porcentagem de hidrólise obtida em função da concentração de ORF e da concentração de LCR utilizada no DCCR 2²



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: a) Superfície de resposta.

b) Curva de contorno.

A superfície de resposta (Figura 18a) indicou que os ensaios que continham as menores concentrações de ORF e de enzima obtiveram as maiores porcentagens de hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos livres.

Segundo Touqeer *et al.* (2020), o excesso de ORF leva ao aumento da viscosidade do meio reacional, culminando em uma queda da taxa de transferência de massa e, conseqüentemente, na redução da conversão de TAG em AGL. Esse comportamento justificaria o aumento da porcentagem de hidrólise, em ensaios contendo proporções reduzidas de óleo, observado neste e em trabalhos similares (Costa *et al.*, 2020; Cavalcanti-Oliveira *et al.*, 2011)

Embora o ensaio 5 tenha atingido a maior porcentagem de hidrólise em 100 minutos (83,60%), as condições utilizadas no ensaio 1 ($x_1 = 10\%$; $x_2 = 10\%$) foram

selecionadas como as mais favoráveis, pois essas obtiveram um rendimento de 77,50%, que foi muito próximo àquele alcançado pelo ensaio 5, no qual foi utilizada uma menor concentração de ORF e uma maior quantidade de enzimas ($x_1 = 5,86\%$; $x_2 = 15\%$). Dessa forma, as condições utilizadas no ensaio 1 foram selecionadas para a realização dos experimentos posteriores, visando-se reduzir os custos do processo.

Nguyen *et al.* (2017) obtiveram o melhor rendimento de 60% de hidrólise, utilizando uma porcentagem mássica de 16,67% de óleo virgem de coco em tampão fosfato (pH=7.0). Já Sharma *et al.* (2013) obtiveram um maior rendimento (aproximadamente 120 $\mu\text{mol/mL}$ de AGL) hidrolisando óleo de fígado de bacalhau à porcentagem mássica de 20% em iso-octano. Esses resultados estão condizentes aos observados no presente trabalho, considerando-se que porcentagens similares de hidrólise foram atingidas (60,32%-77,50%), variando-se a concentração de ORF de 10 a 30%.

Costa *et al.* (2020) e Cavalcanti-Oliveira *et al.* (2011), cujos experimentos também foram elaborados a partir de um delineamento composto central rotacional (DCCR), utilizando a fração mássica de ORF e óleo de soja, respectivamente, e a concentração de lipase como variáveis independentes, obtiveram maiores porcentagens de hidrólise (98,36% e 86,80%, respectivamente) em ensaios que continham os teores de óleo em sua composição de 20% e 55%, respectivamente.

Alguns resultados obtidos em diferentes trabalhos que abordaram o efeito da variação da concentração de lipases em reações de hidrólise (Nguyen *et al.*, 2018a; Miranda *et al.*, 2024; Cavalcanti-Oliveira *et al.*, 2011) estão sumarizados na Tabela 10, em comparação com os dados experimentais obtidos neste trabalho

Tabela 10 – Efeito da variação da concentração de lipases em reações de hidrólise

| Substrato | Lipase | Tempo | Porcentagem de hidrólise | Referência |
|---------------------------------|---------------------------------|---------|--------------------------|--|
| Óleo de coco virgem (1:5) | Eversa® Transform 2.0 | 2h | 60,00% | Nguyen <i>et al.</i> , 2018a |
| Óleo de soja degomado (1:5,5) | <i>Candida rugosa</i> | 30 min | 60,13% | Miranda <i>et al.</i> , 2024 |
| Óleo de soja refinado (50% v/v) | <i>Thermomyces lanuginosus</i> | 48h | 86,80% | Cavalcanti-Oliveira <i>et al.</i> , 2011 |
| ORF (5,86 – 34,14% m/v) | <i>Candida rugosa</i> (10% m/v) | 100 min | 77,50% | Presente trabalho |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Os trabalhos sumarizados na Tabela 10 apresentaram porcentagens elevadas de hidrólise utilizando menores concentrações de enzimas. Essas diferenças podem ser decorrentes de diferentes variáveis utilizadas em cada trabalho, como tipo e concentração de lipase utilizada, tipo e concentração de substrato e tempo de reação.

Neste trabalho, o efeito da concentração de enzimas foi significativo a um nível de confiança de 95%. Além disso, a superfície de resposta (Figura 18a) indicou que menores concentrações de lipase resultaram em maiores porcentagens de hidrólise de ORF. Esse comportamento pôde ser observado no ensaio 8 (Tabela 7), no qual foi utilizada a maior quantidade de lipase (22,07% m/v), resultando em uma porcentagem relativamente baixa de hidrólise (61,93%), quando comparada àquela obtida no ensaio 1 (77,50%), no qual apenas 10% m/v de enzima foram utilizados.

Esse comportamento também foi observado por Cavalcanti-Oliveira *et al.* (2011), levando-os à conclusão de que o excesso de lipase, em sua forma livre, no meio poderia resultar na formação de dímeros enzimáticos, que apresentam menores atividades catalíticas.

2.3.3.1 Validação do planejamento e acompanhamento do tempo de reação

As melhores condições estabelecidas para a hidrólise de TAG em AGL, para o ensaio 5, nos experimentos anteriores ($x_1 = 10\%$; $x_2 = 10\%$) foram reproduzidas em novos ensaios, variando-se o tempo de reação. Os resultados obtidos nesta etapa estão dispostos na Tabela 11.

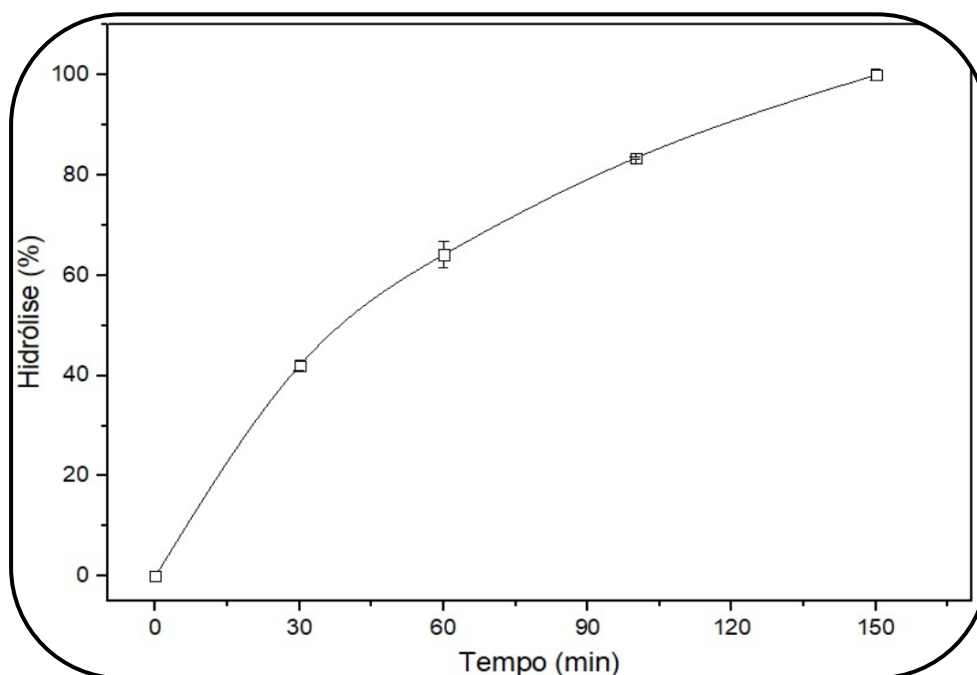
Tabela 11 – Porcentagem de hidrólise catalisada pela LCR, acompanhando o tempo de reação

| Ensaio | t ₀ | t ₃₀ | t ₆₀ | t ₁₀₀ | t ₁₅₀ |
|--------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| 1 | 0% | 44,00% | 67,43% | 82,91% | 100% |
| 2 | 0% | 42,33% | 57,81% | 83,79% | 100% |
| 3 | 0% | 39,72% | 67,08% | 83,53% | 100% |
| Total | 0% | 42,02 ± 1,02% | 64,11 ± 2,57% | 83,41 ± 0,21% | 100% |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

O gráfico ilustrado na Figura 19 mostra a porcentagem de hidrólise obtida ao longo do tempo de reação observado (150 min).

Figura 19 – Influência do tempo de reação na porcentagem de hidrólise do ORF



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Os resultados indicaram a hidrólise total das moléculas de triacilglicerol presentes na amostra em AGL em 150 minutos de reação. Um trabalho desenvolvido por Da Rós *et al.* (2020), atuando a um tempo de reação similar (2 horas) atingiram 86,78% de hidrólise do óleo de microalgas *Nannochloropsis gaditana* catalisada por LCR. Já Hasan *et al.* (2015) atingiram 60% de hidrólise de ORF, catalisada por LCR, em 90 minutos de reação, enquanto que, no presente trabalho, 83,41% de hidrólise de ORF foram observados no tempo de 100 minutos.

Vescovi *et al.* (2016) hidrolisaram 100% de ORF, utilizando a LTL como

biocatalisador, enquanto que Miranda *et al.* (2024) obtiveram 98% de hidrólise de óleo de soja degomado, catalisada pela enzima ET 2.0. Entretanto, em ambos os trabalhos, foi necessário um tempo de reação consideravelmente alto para que esses valores fossem atingidos (24h e 6h, respectivamente), enquanto que, no presente trabalho, o ORF foi completamente hidrolisado em apenas 150 minutos.

Um dos principais desafios na utilização de lipases para a catálise de reações de hidrólise é o longo tempo necessário para alcançar uma conversão eficiente dos reagentes em produtos. Nesse contexto, a metodologia proposta neste trabalho para a produção de biodiesel via rota de hidroesterificação mostra-se altamente relevante para a indústria de biocombustíveis, pois aumenta o rendimento do processo e reduz o tempo de reação.

Além disso, a síntese de glicerol em meio isento de álcoois tóxicos, como o metanol, viabiliza a obtenção de um coproduto com maior grau de pureza, potencializando sua reutilização como matéria-prima em aplicações de maior valor agregado, como nas indústrias farmacêutica e cosmética (Cavalcanti-Oliveira *et al.*, 2011).

2.3.4 Esterificação enzimática dos ácidos graxos livres

2.3.4.1 Influência da razão molar entre AGL e etanol na esterificação enzimática

A razão molar entre os reagentes AGL e etanol é um fator determinante no rendimento da reação de esterificação, sendo essencial para aumentar a eficiência da reação e maximizar a conversão em ésteres. O aumento da concentração de etanol no meio reacional favorece o deslocamento do equilíbrio químico em direção à formação de produtos, promovendo um maior rendimento (Guo *et al.*, 2021).

No entanto, na esterificação enzimática, o excesso de etanol pode inibir a atividade catalítica das lipases, reduzindo a eficiência do processo. Dessa forma, é fundamental estabelecer uma razão molar adequada entre AGL e etanol, garantindo um equilíbrio entre a conversão desejada e a manutenção da atividade enzimática (Jiang *et al.*, 2014).

A Tabela 12 apresenta um resumo dos resultados obtidos quanto à influência da razão molar dos reagentes na etapa de esterificação.

Tabela 12 – Influência da razão molar AGL:etanol na etapa de esterificação

| Razão molar dos reagentes (AGL:etanol) | Porcentagem de esterificação (%) |
|--|----------------------------------|
| 1:1 | 89,60 ± 0,18 |
| 1:2 | 91,58 ± 0,36 |
| 1:3 | 86,46 ± 0,63 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

A análise dos resultados apresentados na Tabela 12 demonstra que as maiores porcentagens de esterificação foram obtidas nos ensaios com razão molar AGL:etanol de 1:2, alcançando 91,58% de conversão. Observa-se, contudo, uma redução no rendimento para 86,46% quando a proporção de etanol foi aumentada para 1:3. Essa queda pode estar atribuída à inibição enzimática provocada pelo excesso de etanol no meio reacional (Jiang *et al.*, 2014).

Resultados semelhantes foram reportados por Aguiéiras *et al.* (2014), que alcançaram uma conversão máxima de 91% de AGL provenientes do óleo de polpa de macaúba após 8 horas de reação, utilizando uma razão molar AGL:etanol de 1:2 e a lipase de *Rhizopus miehei* como catalisador. Já Brandão Jr. *et al.* (2023), obtiveram 93,4% de esterificação enzimática de AGL de óleo de babaçu em apenas 2 horas de reação, empregando a enzima Eversa Transform 2.0 (ET 2.0) e uma razão molar AGL:etanol de 1:1.

Em contrapartida, estudos que adotaram a rota da esterificação química alcançaram maiores porcentagens de conversão ao utilizarem razões molares mais elevadas de AGL:etanol. Esse resultado pode ser atribuído à ausência de limitação da atividade catalítica dos catalisadores químicos pelo excesso de etanol no meio reacional. Nesse contexto, Kumar & Purayil (2019) obtiveram 95,49% de conversão de AGL de óleo de amendoim em biodiesel em apenas 90 minutos de reação, empregando NaOH como catalisador básico e uma razão molar AGL:etanol de 1:9.

Entretanto, a catálise enzimática ainda apresenta vantagens significativas, devido à sua alta especificidade ao substrato, à capacidade de atuar em condições mais brandas de temperatura e pressão, além de seu caráter biodegradável, tornando-a uma alternativa mais sustentável em comparação aos catalisadores químicos convencionais (Santos *et al.*, 2020).

2.3.4.2 Influência da concentração da lipase ET 2.0 na esterificação enzimática

A cinética enzimática prevê que o aumento da concentração de enzimas em um meio reacional tende a elevar a velocidade de reação (Alexandre *et al.*, 2022). No entanto, existe um limite de saturação enzimática, a partir do qual o acréscimo de enzima não resulta em um aumento significativo na conversão, tornando o rendimento constante. Assim, para otimizar custos e eficiência, é recomendável determinar e utilizar a menor concentração enzimática capaz de atingir a máxima conversão (Cruz *et al.*, 2018).

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados referentes à variação da concentração de lipases ET 2.0 na etapa de esterificação enzimática.

Tabela 13 – Influência da concentração de Eversa® Transform 2.0 na etapa de esterificação

| Concentração enzimática (% v/v) | Porcentagem de esterificação (%) |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1,5% | 90,23 ± 0,27 |
| 2,5% | 89,78 ± 0,17 |
| 5,0% | 91,94 ± 0,36 |
| 7,5% | 88,80 ± 0,27 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Analisando a Tabela 13, observou-se que o aumento da concentração de enzima de 1,5% para 5,0% resultou em um leve incremento na porcentagem de esterificação, atingindo um valor máximo de $91,92 \pm 0,36\%$ na concentração de 5,0%. Este comportamento indica que, até esse ponto, o aumento da quantidade de biocatalisador (ET 2.0) favoreceu a maior porcentagem de conversão, possivelmente devido à maior possibilidade de sítios ativos para a reação.

No entanto, ao se elevar a concentração para 7,5% v/v, observou-se uma redução na eficiência do processo, com a conversão caindo para $88,80 \pm 0,27\%$. Resultados semelhantes foram reportados na literatura, indicando que concentrações excessivas de enzimas nem sempre resultam em maiores rendimentos reacionais e podem, inclusive, comprometer a atividade catalítica efetiva devido a fatores estruturais e dinâmicos do sistema reacional (Moreira *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2018b).

Esse declínio de desempenho pode ser atribuído à formação de agregados

enzimáticos em meios com altas concentrações de biocatalisador. Tais agregados promovem a redução da atividade catalítica ao provocar o bloqueio parcial ou total dos sítios ativo e ao dificultar a difusão dos substratos até essas regiões, comprometendo a eficiência do processo. (Nguyen *et al.*, 2018b; Guedes Jr. *et al.*, 2022; Sousa *et al.*, 2021).

Dessa forma, a concentração enzimática de 2,5% v/v foi selecionada para os experimentos posteriores, considerando que essa concentração foi capaz de promover elevada conversão dos AGL sem exceder a quantidade necessária de biocatalisador, evitando desperdícios e mantendo a eficiência do processo. Além disso, essa escolha apresenta vantagens do ponto de vista econômico, uma vez que o uso racional de enzimas pode reduzir significativamente os custos operacionais associados à produção de biodiesel.

Estudos recentes que utilizaram a Eversa® Transform 2.0 (ET 2.0) como biocatalisador na esterificação de AGL relataram resultados semelhantes aos obtidos nesse trabalho. Alexandre *et al.* (2022) alcançaram uma conversão de 95,76% de AGL provenientes de óleo de babaçu (razão molar AGL:metanol de 1:5) em biodiesel após 5 horas de reação, utilizando 0,9% v/v de ET 2.0, na ausência de solventes orgânicos.

De modo semelhante, Wancura *et al.* (2021) obtiveram 96,2% de conversão dos AGL derivados de óleo residual de fritura, utilizando uma razão molar de 1:6,3 (AGL:metanol) após 8 horas de reação e com 0,7% v/v de ET 2.0. Já Amelia *et al.* (2023) registraram 92,03% de conversão de AGL provenientes de óleo de palma, em 4 horas de reação, empregando uma solução de ET 2.0 na concentração de 2% v/v e razão molar de 1:3 (AGL:metanol). Todos os estudos foram conduzidos na ausência de solventes orgânicos.

A comparação dos resultados obtidos neste estudo com os dados reportados acima (Alexandre *et al.*, 2022; Wancura *et al.*, 2021; Amelia *et al.*, 2023) demonstrou uma elevada eficiência catalítica (entre 89,78% e 96,2%) da ET 2.0 nas reações de esterificação de ácidos graxos livres, mesmo quando utilizada em concentrações relativamente baixas, variando entre 0,7% e 2,5% (v/v). Esse comportamento confirma a viabilidade do uso dessa enzima como biocatalisador em processos de síntese de biodiesel, destacando seu potencial catalítico e econômico.

2.3.4.3 Influência do tempo na esterificação enzimática

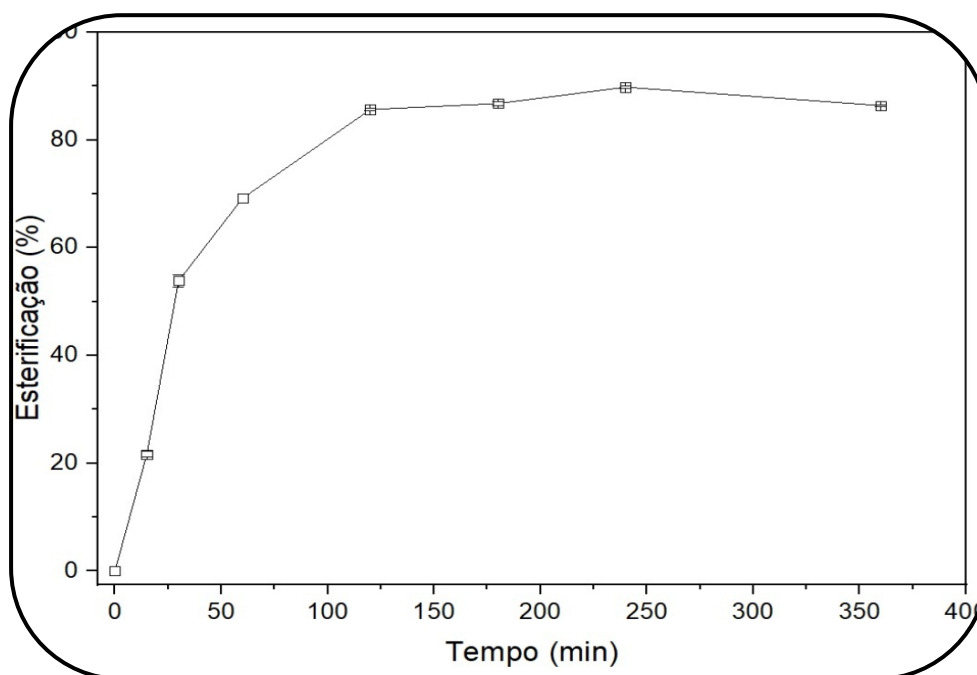
A partir da análise dos resultados, foram determinadas as condições ideais para a maior conversão de AGL em biodiesel: a razão molar AGL:etanol de 1:2 e uma concentração de 2,5% de ET 2.0. Assim, novos experimentos foram realizados sob essas condições, monitorando-se o tempo de reação para validar os dados obtidos na etapa de esterificação. Os resultados em função do tempo de reação estão apresentados na Tabela 14 e ilustrados na Figura 20.

Tabela 14 – Influência do tempo na etapa de esterificação

| Tempo de reação (min) | Porcentagem de esterificação (%) |
|-----------------------|----------------------------------|
| 15 | 21,68 ± 0,53 |
| 30 | 53,86 ± 1,17 |
| 60 | 69,18 ± 0,00 |
| 120 | 85,84 ± 0,18 |
| 180 | 86,74 ± 0,36 |
| 240 | 89,78 ± 0,17 |
| 360 | 86,38 ± 0,15 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Figura 20 – Influência do tempo de reação na etapa de esterificação



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

De acordo com a Tabela 14 e a Figura 20, verificou-se que, embora a maior conversão de AGL em biodiesel observada nesse experimento (89,78%) tenha sido alcançada após 4 horas de reação, o equilíbrio da esterificação enzimática foi atingido em 120 minutos. A partir desse ponto, a conversão manteve-se praticamente constante, variando entre 85,84% e 89,78%.

Dessa forma, a ampliação do tempo reacional além de 2 horas não se mostra vantajosa, uma vez que não resulta em incrementos significativos na conversão, implicando apenas em maior consumo de tempo e energia, o que compromete a eficiência operacional do processo.

Estudos recentes sobre a esterificação enzimática catalisada pela lipase ET 2.0 têm demonstrado resultados promissores em diferentes matrizes lipídicas. Amelia *et al.* (2023) alcançaram uma conversão de 92,03% de AGL provenientes de óleo de palma em biodiesel após 4 horas de reação, utilizando uma razão molar AGL:metanol de 1:3 e concentração de 2% v/v da lipase líquida ET 2.0, em sistema livre de solventes orgânicos.

Da mesma forma, Santos *et al.* (2024) registraram uma conversão de 88,10% de ácido oleico em oleato de etila após 16 horas de reação, empregando uma razão molar ácido oleico:etanol de 1:1, com adição de 0,01 g de ET 2.0 imobilizada em nanopartículas magnéticas, também na ausência de solventes orgânicos.

Guo *et al.* (2024), por sua vez, relataram conversão quase total dos AGL presentes no óleo extraído de *Periplaneta americana*, atingindo 98,63% em 8 horas de reação, com razão molar AGL:metanol de 1:6,5 e concentração enzimática de 8,5% v/v de ET 2.0, igualmente sem o uso de solventes orgânicos.

Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo evidenciaram a elevada eficiência da metodologia empregada, que permitiu alcançar conversões superiores a 85% em apenas 2 horas de reação – um desempenho consideravelmente superior ao de diversos estudos reportados na literatura (Amelia *et al.*, 2023; Guo *et al.*, 2024; Santos *et al.*, 2024), nos quais foram utilizados tempos reacionais significativamente mais longos para atingir conversões semelhantes. Esse curto tempo de processo, aliado à elevada eficiência catalítica, representa uma vantagem estratégica em termos de economia de energia e viabilidade industrial.

Entretanto, de acordo com a definição normativa, apenas compostos com teor superior a 96,5% de ésteres etílicos podem ser classificados como biodiesel. Assim, uma estratégia viável para o aumento de pureza e conformidade do produto seria a

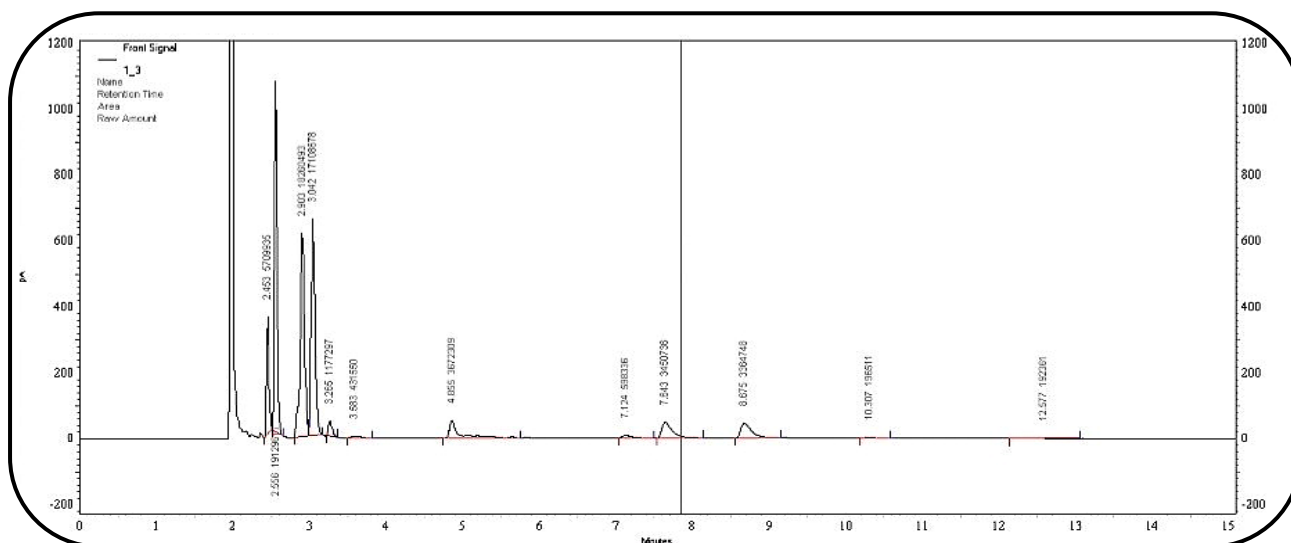
aplicação de um polimento alcalino, com o objetivo de elevar o rendimento final do processo (Alves *et al.*, 2022).

2.3.4.4 Composição dos ésteres etílicos

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica essencial para avaliar a qualidade do biodiesel, permitindo a identificação e quantificação de seus componentes principais, como os ésteres de ácidos graxos. Essa análise assegura que o produto final esteja em conformidade com as especificações estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), conforme a resolução ANP nº 920/2023. Dessa forma, a CG contribui para a confiabilidade do processo de produção e a segurança no uso do biodiesel como combustível renovável.

A Figura 21 apresenta o cromatograma obtido após a separação dos ésteres etílicos, destacando os tempos de retenção e as áreas relativas de cada pico identificado. O pico 2, com tempo de retenção de 2,556 minutos, refere-se ao heptadecanoato de metila (C17:0), utilizado como padrão interno (PI). Para facilitar a interpretação dos resultados, os dados cromatográficos foram organizados na Tabela 15. A partir desses dados obtidos, foi possível identificar e quantificar os ésteres etílicos (saturados – EES – e insaturados – EEI) presentes nas amostras analisadas, cujas concentrações também estão detalhadas na Tabela 15.

Figura 21 – Separação dos ésteres etílicos por cromatografia gasosa



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Tabela 15 – Determinação e quantificação dos ésteres etílicos por cromatografia gasosa

| Pico | Tempo de retenção (min) | Éster etílico | Saturação | Concentração (%) |
|------|-------------------------|----------------------------------|-----------|------------------|
| 1 | 2,454 ± 0,001 | Palmitato de etila (C16:0) | EES | 10,74 ± 0,16 |
| 2 | 2,556 ± 0,001 | Heptadecanoato de metila (C17:0) | EES | PI |
| 3 | 2,905 ± 0,002 | Oleato de etila (C18:1) | EEI | 34,68 ± 0,85 |
| 4 | 3,043 ± 0,001 | Linoleato de etila (C18:2) | EEI | 32,99 ± 1,29 |
| 5 | 3,266 ± 0,001 | Estearato de etila (C18:0) | EES | 2,30 ± 0,12 |
| 6 | 3,586 ± 0,003 | Linolênico de etila (C18:3) | EEI | 0,83 ± 0,03 |
| 7 | 4,858 ± 0,003 | Araquídico de etila (C20:0) | EES | 7,08 ± 0,28 |
| 8 | 7,130 ± 0,006 | Gadoleico de etila (C20:1) | EEI | 1,04 ± 0,05 |
| 9 | 7,650 ± 0,007 | Behenato de etila (C22:0) | EES | 5,01 ± 1,38 |
| 10 | 8,683 ± 0,008 | Erucato de etila (C22:1) | EEI | 5,03 ± 1,20 |
| 11 | 10,312 ± 0,005 | Lignocérico de etila (C24:0) | EES | 0,30 ± 0,06 |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

A análise cromatográfica permitiu quantificar o perfil dos ésteres etílicos (Figura 21 e Tabela 15), indicando que a composição de ambas as amostras analisadas é semelhante, conforme evidenciado pelo baixo desvio padrão nas porcentagens de cada éster etílico identificado.

Na Tabela 15, verificou-se que os principais ésteres etílicos formados foram o oleato de etila (34,68 ± 0,85%), o linoleato de etila (32,99 ± 1,29%) e o palmitato de etila (10,74 ± 0,16%). Quando comparados aos dados da Tabela 1, observou-se que os teores obtidos neste estudo estão próximos às concentrações de ácido oleico (23,33 ± 0,03%) e ácido palmítico (10,99 ± 0,04%) reportadas para o óleo de soja refinado (Ayyildiz *et al.*, 2015).

Entretanto, o ácido linoleico, majoritário no óleo de soja refinado (53,86 ±

0,03%), apresentou proporção inferior nas amostras analisadas, além da presença de traços de erucato de etila (C22:1), ausente na composição do óleo de soja puro. Essas discrepâncias sugerem que o óleo residual de fritura utilizado era composto por uma mistura de diferentes fontes oleaginosas, possivelmente incluindo óleo de canola, amplamente utilizado no Brasil e caracterizado pela presença de ácido erúxico em sua composição e por menores concentrações de ácido linoleico ($24,90 \pm 0,12\%$) em comparação ao óleo de soja (Ayyildiz *et al.*, 2015).

Além disso, observou-se uma predominância significativa de ésteres etílicos insaturados – oleato, linoleato, linolênico, gadoleico e erucato de etila – que totalizaram $74,57 \pm 0,84\%$ da composição total do biodiesel. Em contraste, a soma das concentrações dos ésteres etílicos saturados – palmitato, estearato, araquídico, behenato e lignocérico de etila – correspondeu a $25,43 \pm 0,84\%$.

Perfis semelhantes foram descritos por Karimian *et al.* (2023) em amostras de biodiesel derivadas de óleo de Salicornia, com 87,67% de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos (EMAG) insaturados, majoritariamente com 18 carbonos em suas cadeias (estearato, oleato e linoleato de etila). De forma análoga, Azad (2017) relatou predominância de EMAG insaturados (67,53%) no biodiesel produzido a partir do óleo de sementes de tangerina, com destaque para os ésteres de cadeia C18 (estearato, oleato e linoleato de metila) e C16 (palmitato de metila).

A elevada proporção de ésteres insaturados observada nas amostras deste trabalho está em consonância com o alto índice de iodo determinado para o ORF utilizado (239,08 g I₂/100 g óleo), reforçando a correlação entre elevados índices de iodo e a presença significativa de ácidos graxos insaturados nas moléculas de triacilglicerol (Guo *et al.*, 2017).

Embora uma elevada quantidade de ésteres insaturados possa comprometer a estabilidade oxidativa do biodiesel, reduzindo seu tempo de meia-vida, essa característica também contribui para a diminuição do ponto de fusão, o que impede a formação de cristais sólidos em baixas temperaturas, minimizando problemas de entupimento em motores, especialmente comuns em biodieseis com altos teores de ésteres saturados (Karimian *et al.*, 2023; Bär *et al.*, 2021).

Além disso, segundo Wong *et al.* (2022), a elevada presença de ésteres com cadeias C16:0 (palmitato de etila) e C18:1 (oleato de etila) está associada ao aumento da viscosidade cinemática do biodiesel. Já a elevada concentração de C18:2 (linoleato de etila) contribui positivamente para as propriedades de combustão

do biocombustível, sendo um indicativo favorável à sua aplicação em motores de ignição por compressão.

Os resultados obtidos ao longo deste estudo evidenciam a eficácia do processo desenvolvido para a produção de ésteres etílicos a partir de óleo residual de fritura, alcançando conversões superiores a 89% em apenas 120 minutos de reação, sob condições brandas ($T = 35^{\circ}\text{C}$) e sem o uso de solventes orgânicos.

A aplicação de uma metodologia limpa, eficiente e baseada em resíduos, associada à produção de um combustível com propriedades adequadas para uso energético, reforça o potencial técnico, econômico e ambiental da abordagem adotada.

Comparando-se com metodologias convencionais, o trabalho proposto apresentou vantagens significativas em termos de custos operacionais e redução de impactos ambientais, consolidando o uso de óleos residuais como uma alternativa sustentável na produção de biodiesel.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação da LCR na etapa de hidrólise possibilitou a completa conversão dos triacilgliceróis em ácidos graxos livres em apenas 150 minutos, evidenciando uma notável redução do tempo de reação quando comparado aos tempos usualmente reportados. A utilização de um DCCR para essa etapa permitiu a otimização da reação de hidrólise, sendo que as melhores condições observadas para as variáveis concentração de substrato e concentração enzimática foram de 10% m/v para ambas, sendo que elas influenciaram de forma significativa o desempenho do processo.

Na etapa subsequente de esterificação, a maior conversão foi obtida para as condições de razão molar AGL:etanol 1:2 e concentração de ET 2.0 de 2,5% (v/v), alcançando um rendimento de 89,78% em 4 horas, com o equilíbrio reacional sendo atingido nos primeiros 120 minutos. A predominância de ésteres etílicos insaturados, como o oleato de etila ($34,68 \pm 0,85\%$) e o linoleato de etila ($32,99 \pm 1,29\%$), nas amostras de biodiesel obtidas é compatível com o perfil lipídico da matéria-prima utilizada e confere ao combustível características desejáveis para a sua aplicação em veículos, como boa fluidez em baixas temperaturas e propriedades adequadas de combustão.

A eliminação do uso de solventes orgânicos e de tratamentos prévios, aliadas à utilização de resíduos como insumo e à aplicação de biocatalisadores, reafirma o caráter limpo e sustentável da metodologia proposta. Assim, os resultados obtidos não apenas comprovam a viabilidade técnica do processo, mas também reforçam seu alinhamento com os princípios da economia circular e da química verde, consolidando-o como uma solução promissora para a produção de biocombustíveis.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (BRASIL). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis 2024**. Brasília: ANP, 2024.

AGHAEI, H. *et al.* Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on epoxy-activated cloisite 30B as a new heterofunctional carrier and its application in the synthesis of banana flavor and production of biodiesel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 178, p. 569-579, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.146>. Acesso em: 29 jul. 2024.

AGHAEI, H. *et al.* Utilization of two modified layered doubled hydroxides as supports for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 74-83, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.145>. Acesso em: 3 jul. 2024.

AGUIEIRAS, E. C. G. *et al.* Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acil oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalyst. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.06.069>. Acesso em: 15 mai. 2024.

ALEXANDRE, J. Y. N. H. *et al.* A theoretical and experimental study for enzymatic biodiesel production from babassu oil (*Orbignya sp.*) using Eversa lipase. **Catalysts**, v. 12, n. 11, p. 1322-1341, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal12111322>. Acesso em: 29 jul. 2024.

ALVES, E. S. *et al.* Techno-economic-environmental analysis of biodiesel production by magnetic nanoparticles CLEAs of Eversa® Transform. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 51, p. 553-558, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95879-0.50093-X>. Acesso em: 20 jul. 2025.

AMELIA. *et al.* Retention of high-value tocols during enzymatic esterification of palm fatty acid distillate using liquid lipase for improving the economics and sustainability of biodiesel production. **Industrial Crops & Products**, v. 194, p. 116271, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116271>. Acesso em: 27 mar. 2025.

AOAC INTERNATIONAL **Official method of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Arlington: AOAC International, 1990.

AOCS INTERNATIONAL. **Ca 5a-40**. 5. ed. Champaign: AOCS International, 1998.

AOCS INTERNATIONAL. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: AOCS International, 2004.

ASTM INTERNATIONAL. **ASTM D891-00 – Standart test methods for specific gravity, apparent, of liquid industrial chemicals**. West Conshohocken: ASTM International, 2000.

AWOGBEMI, O; KALLON, D. V. V. Conversion of hazardous waste cooking oil into non-fuel value added products. **International Journal of Ambient Energy**, v. 95, n. 1, p. 2345253, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01430750.2024.2345253>. Acesso em: 18 jul. 2025.

AYYILDIZ, H. F. *et al.* Evaluation of fatty acid composition, tocopherol profile, and oxidative stability of some fully refined edible oils. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 9, p. 2064-2076, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.962657>. Acesso em: 18 abr. 2025.

AZAD, A. K. Biodiesel from mandarin seed oil: A surprising source of alternative fuel. **Energies**, v. 10, n. 11, p. 1689, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en10111689>. Acesso em: 28 mar. 2025.

BÄR, F. *et al.* Rancimat vs. rapid small scale oxidation test (RSSOT) correlation analysis, based on a comprehensive study of literature. **Fuel**, v. 291, p. 120160, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120160>. Acesso em: 28 mar. 2025.

BHATT, C. *et al.* Combining technology with liquid-formulated lipases for in-spec biodiesel production. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 7-19, 2022. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/bab.2074>. Acesso em: 18 abr. 2025.

BILAL, M. *et al.* Immobilized lipases-based nano-biocatalytic systems – A versatile platform with incredible biotechnological potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 175, p. 108-122, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.010>. Acesso em: 3 jul. 2024.

BOUTESTEIJN, C. *et al.* The interaction between EU biofuel policy and first- and second-generation biodiesel production. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 124-129, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.067>. Acesso em: 21 out. 2024.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO JR., J. *et al.* Performance of Eversa Transform 2.0 lipase in ester production using babassu oil (*Orbignya sp.*) and tucuman oil (*Astrocaryum vulgare*): A comparative study between liquid and immobilized forms in Fe₃O₄ nanoparticles. **Catalysts**, v. 13, n. 3, p. 571, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal13030571>. Acesso em: 27 mar. 2025.

BUENO-BORGES, L. B. *et al.* Improving waste cooking oil quality for biodiesel production with the ethanolic by-product of soybean oil extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 96, n. 12, p. 1379-1388, 2019. Disponível em: <https://doi.org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/aocs.12295>. Acesso em: 14 mai. 2024.

CAVALCANTE, F. T. T. *et al.* Opportunities for improving biodiesel production via lipase Catalysis. **Fuel**, v. 288, p. 119577-119596, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119577>. Acesso em: 15 mai. 2024.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. A. *et al.* Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 618692-618699, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4061/2011/618692>. Acesso em: 15 mai. 2024.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

CHRISTOPHER, L. P. *et al.* Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.01.017>. Acesso em: 13 mai. 2024.

CONGRESSO NACIONAL (BRASIL). Lei nº 13.033 de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 8.723, de 28 de outubro de 1993; revoga dispositivos da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 set. 2014.

CONGRESSO NACIONAL (BRASIL). Lei nº 14.993, de 8 de outubro de 2024. Dispõe sobre a promoção da mobilidade sustentável de baixo carbono e a captura e a estocagem geológica de dióxido de carbono; institui o Programa Nacional de Combustível Sustentável de Aviação (ProBioQAV), o Programa Nacional de Diesel Verde (PNDV) e o Programa Nacional de Descarbonização do Produtor e Importador de Gás Natural e de Incentivo ao Biometano; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999, 8.723, de 28 de outubro de 1993, e 13.033, de 24 de setembro de 2014; e revoga dispositivo da Lei nº 10.438, de 26 de abril de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 out. 2024.

COSTA, M. J. *et al.* Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. **Chemical Engineering and Processing – Process Intensification**, v. 157, p. 108131-108139, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.108131>. Acesso em: 13 mai. 2024.

CRUZ, M. *et al.* Enzymatic esterification of acid oil from soapstocks obtained in vegetable oil refining: Effect of enzyme concentration. **Renewable Energy**, v. 124, p. 165-171, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.053>. Acesso em: 27 mar. 2025.

- DANANE, F. *et al.* Regeneration of waste frying oil for biodiesel production. **Energy for A Better Environment and Improved Sustainability 2: Applications**, p. 383-389, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-62575-1_27. Acesso em: 27 mar. 2025.
- DA RÓS, P. C. M. *et al.* Microalgae as a feedstock for sustainable fatty acids: Factorial design study. **Chemical Engineering Technology**, v. 43, n. 1, p. 119-125, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ceat.201800643>. Acesso em: 3 jul. 2024.
- DELORME, V, *et al.* Effects of surfactants on lipase structure, activity and inhibition. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 1831-1842, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0362-9>. Acesso em: 3 jul. 2024.
- DOMINGUES, O. *et al.* Evaluation of *Candida rugosa* lipase immobilized on magnetic nanoparticles in enzymatic/chemical hydroesterification for biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 11, p. 5419-5442, 2022. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12010-022-04046-9>. Acesso em: 17 mai. 2024.
- DOMÍNGUEZ de MARIA, P. *et al.* Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 180-196, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.003>. Acesso em: 3 jul. 2024.
- DU, W. *et al.* Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 125-129, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.04.004>. Acesso em: 29 jul. 2024.
- DUBEY, A. *et al.* An analytical and economical assessment of the waste cooking oil based biodiesel using optimized conditions on the process variables. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 47, n. 1, p. 1997-2012, 2020. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1080/15567036.2020.1839600>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- DUVEKOT, C. **Determination of total FAME and linolenic acid methyl esters in biodiesel according to EN-14103**. Santa Clara: Agilent Technologies, 2020.
- FACIN, B. R. *et al.* Strategies for the immobilization of Eversa® Transform 2.0 lipase and application for phospholipid synthesis. **Catalysts**, v. 11, n. 10, p. 1236, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal11101236>. Acesso em: 9 mai. 2025.
- FAILLACE, E. *et al.* Optimizing the first step of the biocatalytic process for green leaf volatiles production: Lipase-catalyzed hydrolysis of three vegetable oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12274-12290, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms241512274>. Acesso em: 3 jul. 2024.

FAIZÃO, F. F. *et al.* Scientific prospecting of lignocellulosic and inorganic supports used to immobilize *Candida rugosa* lipase in the biodiesel production process. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 7, n. 3, p. 1-19, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.34188/bjaerv7n3-024>. Acesso em: 19 jul. 2025.

FERREIRA, I. M. *et al.* Ethylic biodiesel production using lipase immobilized in silk fibroin-alginate spheres by encapsulation. **Catalysis Letters**, v. 147, n. 1, p. 269-280, 2017. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10562-016-1917-0>. Acesso em: 11 mai. 2024.

GAUR, V. K. *et al.* Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview. **Bioresource Technology**, v. 343, p. 126059-126071, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126059>. Acesso em: 10 mai. 2024.

GROCHULSKI, P. *et al.* Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. **Protein Science**, v. 3, n. 1, p. 82-91, 1994. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1TRH>. Acesso em: 17 mai. 2024.

GUEDES JR., J. G. E. *et al.* Design of a sustainable process for enzymatic production of ethylene glycol diesters via hydroesterification of used soybean cooking oil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 1, p. 107062-107072, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.107062>. Acesso em: 10 mai. 2024.

GUO, J. *et al.* Biodiesel production via simultaneous esterification and transesterification of *Periplaneta americana* oil with liquid lipase Eversa® Transform 2.0. **Renewable Energy**, v. 229, p. 120756, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.120756>. Acesso em: 25 mar. 2025.

GUO, J. *et al.* Conversion of waste frying palm oil into biodiesel using free lipase A from *Candida antarctica* as a novel catalyst. **Fuel**, v. 267, p. 117323-117330, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117323>. Acesso em: 29 jul. 2024.

GUO, M. *et al.* Process optimization of biodiesel production from waste cooking oil by esterification of free fatty acids using La³⁺/ZnO-TiO₂ photocatalyst. **Energy Conversion and Management**, v. 229, p. 113745, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113745>. Acesso em: 25 mar. 2025.

GUO, W. *et al.* Separation mechanism of fatty acids from waste cooking oil and its flotation performance in iron ore desiliconization. **Minerals**, v. 7, n. 12, p. 244, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/min7120244>. Acesso em: 28 mar. 2025.

GURBUZ, I. B.; OZKAN, G. Consumers' knowledge, attitude and behavioural patterns towards the liquid wastes (cooking oil) in Istanbul, Turkey. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 16, p. 16529-16536, 2019. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11356-019-05078-1>. Acesso em: 10 mai. 2024.

HAMA, S. *et al.* How lipase technology contributes to evolution of biodiesel production using multiples feedstocks. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 57-64, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.001>. Acesso em: 16 mai. 2024.

HARTINI, S. *et al.* Optimal treatment combination for dishwashing liquid soap based on waste cooking oil according to the requirement of Indonesian quality standards. **Joint Journal of Novel Carbon Resource Sciences & Green Asia Strategy**, v. 8, n. 2, p. 492-498, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5109/4480734>. Acesso em: 10 mai. 2024.

HASAN, N. B. *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase in PVA-alginate-sulfate beds for waste cooking oil treatment. **Jurnal Teknologi**, v. 74, n. 1, p. 215-222, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.11113/jt.v74.2183>. Acesso em: 3 jul. 2024.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

ISO, M. *et al.* Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(01\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(01)00045-5). Acesso em: 29 jul. 2024.

JAHROMI, H. *et al.* Synthesis of novel biolubricants from waste cooking oil and cyclic oxygenates through Na integrated catalytic process. **Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 40, p. 13424-13437, 2021. Disponível em: <https://doi.org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1021/acssuschemeng.1c03523>. Acesso em: 10 mai. 2024.

JAYAKUMAR, M. *et al.* Heterogeneous base catalysts: Synthesis and application for biodiesel production – A review. **Bioresource Technology**, v. 331, p. 125054-125065, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125054>. Acesso em: 29 jul. 2024.

JIANG, Y. *et al.* Pickering emulsion stabilized by lipase-containing periodic mesoporous organosilica particles: A robust biocatalyst system for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 278-283, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.001>. Acesso em: 27 mar. 2025.

KANJAIKAEW, U. *et al.* Two-step esterification of palm fatty acid distillate in ethyl ester production: Optimization and sensitivity analysis. **Renewable Energy**, v. 119, p. 336-344, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.12.002>. Acesso em: 27 mar. 2025.

KANNAN, S. *et al.* Optimization of enzyme hydrolysis of seafood waste for microwave hydrothermal carbonization. **Energy & Fuels**, v. 29, n. 12, p. 8006-8016, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b01671>. Acesso em: 20 jul. 2025.

- KARIMIAN, A. *et al.* *Persica Akhani* Salicornia as novel biodiesel feedstock production for economic prosperity in salty and water scarcity areas: Optimized oil extraction process and transesterification reaction using new magnetic heterogenous nanocatalysts. **Renewable Energy**, v. 211, p. 361-369, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.04.119>. Acesso em: 27 mar. 2025.
- KARMEE, S. K. *et al.* Techno-economic evaluation of biodiesel production from waste cooking oil – A case study of Hong Kong. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 4362-4371, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms16034362>. Acesso em: 11 mai. 2024.
- KETZER, F. *et al.* Kinetic and thermodynamic study of enzymatic hydroesterification mechanism to fatty acid methyl esters synthesis. **Bioresource Technology**, v. 356, p. 127335-127343, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127335>. Acesso em: 17 mai. 2024.
- KNOTHE, G. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 847-854, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0569-4>. Acesso em: 3 jul. 2024.
- KUMAR, R. S.; PURAYIL, S. T. P. Optimization of ethyl ester production from *Arachis hypogaea* oil. **Energy Reports**, v. 5, p. 658-665, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.06.001>. Acesso em: 27 mar. 2025.
- LEE, J. H. *et al.* Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbono. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100248-100255, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100248>. Acesso em: 17 mai. 2024.
- LEMA, M. W. Assessment of the degree of rancidity on reused oils in university cafeterias, and public awareness. **Environmental Quality Management**, v. 32, n. 4, p. 247-253, 2023. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/tqem.21985>. Acesso em 21 jun. 2024.
- LERIN, L. A. enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in organic solvents: Process optimization and kinetic evaluation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1068-1076, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0398-1>. Acesso em: 3 jul. 2024.
- LI, J. *et al.* Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycolides* BS6 utilizing soybean oil waste. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 112, p. 72-79, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.002>. Acesso em: 10 mai. 2024.
- LI, X. *et al.* Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 764-771, 2007. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/bit.21489>. Acesso em: 29 jul. 2024.

LIEW, C. S. *et al.* Low-temperature thermal pre-treated sewage sludge for feeding of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae: Protein, lipid and biodiesel profile and characterization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 178, p. 113241, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113241>. Acesso em: 27 mar. 2025.

MACEIRAS, R. *et al.* Biodiesel production from waste frying oil by ultrasound-assisted transesterification. **Chemical Engineering Technology**, v. 40, n. 9, p. 1713-1719, 2017. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ceat.201600112>. Acesso em: 14 mai. 2024.

MACHADO, S. A. *et al.* Hydrolysis of vegetable and microbial oils catalyzed by a solid preparation of castor bean lipase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, p. 102188-102195, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102188>. Acesso em: 29 jul. 2024.

MADDIKERI, G. L. *et al.* Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. **Chemical Engineering Journal**, v. 263, p. 479-487, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.11.010>. Acesso em: 14 mai. 2024.

MAHMUDUL, H. M. *et al.* Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 497-509, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.001>. Acesso em: 24 out. 2024.

MANIKANDAN, G. *et al.* Review of waste cooking oil (WCO) as a feedstock for biofuel – Indian perspective. **Energies**, v. 16, n. 4, p. 1739-1755, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en16041739>. Acesso em: 10 mai. 2024.

MARCHETTI, R. *et al.* Conversion of waste cooking oil into biogas: perspectives and limits. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 7, p. 2833-2856, 2020. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00253-020-10431-3>. Acesso em: 9 mai. 2024.

MATINJA, A. I. *et al.* Optimization of biodiesel production from palm oil mill effluent using lipase immobilized in PVA-alginate-sulfate beads. **Renewable Energy**, v. 135, p. 1178-1185, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.12.079>. Acesso em: 17 mai. 2024.

MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, n. 2, p. 213-234, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2011v32n2p213>. Acesso em: 3 jul. 2024.

MIRANDA, F. C. *et al.* Enzymatic production of xylose esters using degummed soybean oil fatty acids following a hydroesterification strategy. **Process Biochemistry**, v. 142, p. 104-112, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.04.020>. Acesso em: 29 jul. 2024.

- 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, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.071>. Acesso em: 17 mai. 2024.
- 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, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal10040414>. Acesso em: 9 mai. 2025.
- MORETTO, E; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1998.
- MUKHTAR, H. *et al.* Optimization of lipase biosynthesis from *Rhizopus oryzae* for biodiesel production using multiple oils. **Chemical Engineering Technology**, v. 39, n. 9, p. 1707-1715, 2016. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ceat.201500584>. Acesso em: 11 mai. 2024.
- MULALEE, S. *et al.* Enzymatic esterification of oleic acid and propanol by Novozym 435. **Applied Mechanics and Materials**, v. 705, p. 29-33, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.705.29>. Acesso em: 27 mar. 2025.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NELSON, L. A. *et al.* Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 9, p. 1191-1195, 1996. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/BF02523383>. Acesso em: 29 jul. 2024.
- NGUYEN, H. C. *et al.* Liquid lipase-catalyzed esterification of oleic acid with methanol for biodiesel production in the presence of superabsorbent polymer: Optimization by using response surface methodology. **Energies**, v. 11, n. 5, p. 1085, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en11051085>. Acesso em: 9 mai. 2025.
- NGUYEN, V. T. A. *et al.* Antibacterial activity of free fatty acids from hydrolyzed virgin coconut oil using lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Lipids**, v. 2017, p. 1-7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/7170162>. Acesso em: 3 jul. 2024.
- NGUYEN, V. T. A. *et al.* Isolating free fatty-acids from virgin coconut oil using lipases from different sources. **Jurnal Teknologi**, v. 80, n. 3, p. 55-59, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.11113/jt.v80.11582>. Acesso em: 3 jul. 2024.
- NOUREDDINI, H. *et al.* Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.029>. Acesso em: 29 jul. 2024.

OKPARANTA, S. *et al.* Assessment of rancidity and other physicochemical properties of edible oils (mustard and corn oils) stores at room temperature. **Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 6, n. 3, p. 70-75, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11648/j.jfns.20180603.11>. Acesso em: 21 out. 2024.

PARANDI, E. *et al.* Biodiesel production from waste cooking oil using a novel biocatalyst of lipase enzyme immobilized magnetic nanocomposite. **Fuel**, v. 313, p. 123057-123067, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.123057>. Acesso em: 29 jul. 2024.

PFALLER, M. A. *et al.* *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3578-3582, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.00863-06>. Acesso em: 3 jul. 2024.

POURZOLFAGHAR, H. *et al.* A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245-257, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.03.048>. Acesso em: 11 mai. 2024.

RASHID, R. *et al.* Enzymatic hydrolysis of used-frying oil using *Candida rugosa* lipase. **Jurnal Teknologi**, v. 67, n. 3, p. 101-107, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.11113/jt.v67.2740>. Acesso em: 3 jul. 2024.

REIS, W. M. S. *et al.* Immobilization of commercial lipase onto different supports: characterization and application in esterification reaction. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 6, n. 1, p. 15-24, 2020.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 3ª ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

ROSSET, D. V. *et al.* Enzyme-catalyzed production of FAME by hydroesterification of soybean oil using the novel soluble lipase NS 40116. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 4, p. 914-926, 2019. Disponível em: [https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12010-019-02966-7](https://doi.org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12010-019-02966-7). Acesso em: 13 mai. 2024.

ROY, M. M. *et al.* Biodiesel from crude tall oil and its NO_x and aldehydes emissions in a diesel engine fueled by biodiesel-diesel blends with water emulsions. **Processes**, v. 9, n. 1, p. 126, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr9010126>. Acesso em: 27 mar. 2025.

ROZENALL, A. Interesterification of oils and fats. **Inform**, Champaign, v.3, n.11, p.1232-1237,1992.

SALEH, A. H. *et al.* Production of first and second-generation biodiesel for diesel engine operation: A review. **NTU Journal of Renewable Energy**, v. 5, n. 1, p. 8-23, 2023. Disponível em: : <https://doi.org/10.56286/ntujre.v5i1>. Acesso em: 21 out. 2024.

SALIHU, A; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86-96, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019>. Acesso em: 3 jul. 2024.

SANTOS, K. M. *et al.* Enhanced biodiesel production with Eversa Transform 2.0 lipase on magnetic nanoparticles. **Langmuir**, v. 40, n. 51, p. 26835-26851, 2024. Disponível em: <https://doi.org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1021/acs.langmuir.4c02542>. Acesso em: 27 mar. 2025.

SANTOS, L. K. *et al.* Experimental factorial design on hydroesterification of waste cooking oil by subcritical conditions for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 114, p. 574-580, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.066>. Acesso em: 15 mai. 2024.

SANTOS, S. *et al.* A review on bio-based catalysts (immobilized enzymes) used for biodiesel production. **Energies**, v. 13, n. 11, p. 3013-3031, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en13113013>. Acesso em: 13 mai. 2024.

SCHAECHTER, M. **Encyclopedia of microbiology**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2009.

SHARMA, A. *et al.* Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93-100, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2012.05.006>. Acesso em: 3 jul. 2024.

SHEN, X. *et al.* Real-world exhaust emissions and fuel consumption for diesel vehicles fueled by waste cooking oil biodiesel blends. **Atmospheric Environment**, v. 191, p. 249-257, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.08.004>. Acesso em: 11 mai. 2024.

SIMÃO, L. E. *et al.* Decarbonizing freight transportation in Brazil: Methodologies, results and practical implications. **International Journal of Professional Business Review**, v. 9, n. 10, p. 1-20, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.26668/businessreview/2024.v9i10.4667>. Acesso em: 27 mar. 2025.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 166, p. 486-520, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9444-3>. Acesso em: 3 jul. 2024.

SINGH, N. *et al.* Progress and facts on biodiesel generations, production methods, influencing factors, and reactors: A comprehensive review from 2000 to 2023. **Energy Conversion and Management**, v. 302, p. 118157, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2024.118157>. Acesso em: 27 mar. 2025.

SOARES, C. M. F. *et al.* Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 745-757, 1999. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1604-9_68. Acesso em: 29 jul. 2024.

SOARES, D. *et al.* Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15-23, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.09.017>. Acesso em: 29 jul. 2024.

SOUSA, I. G. *et al.* A novel hybrid biocatalyst from immobilized Eversa® Transform 2.0 lipase and its application in biolubricant synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 42, n. 2, p. 151-172, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2144263>. Acesso em: 24 out. 2024.

SOUSA, J. S. *et al.* Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas L.*) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1-4, p. 133-137, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.003>. Acesso em: 29 jul. 2024.

SOUSA JR., P. G. S. *et al.* Optimization and theoretical analysis of lipase-catalyzed enzymatic esterification of glycerol for efficient glycerides synthesis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 198, p. 109033-109046, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109033>. Acesso em: 17 mai. 2024.

SOUSA, R. R. *et al.* Simplified method to optimize enzymatic esters syntheses in solvent-free systems: Validation using literature and experimental data. **Catalysts**, v. 11, n. 11, p. 1357, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal11111357>. Acesso em: 18 abr. 2025.

SREEHARSHA, R. V. *et al.* Orienting biodiesel production towards sustainability and circularity by tailoring the feedstock and processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 414, p. 137526, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137526>. Acesso em: 27 mar. 2025.

SUN, S. *et al.* Biodiesel preparation from semen abutili (*Abutilon theophrasti Medic.*) seed oil using low-cost liquid lipase Eversa® transform 2.0 as a catalyst. **Industrial Crops & Products**, v. 169, p. 113643-113652, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113643>. Acesso em: 2 jul. 2024.

TALEBIAN-KIAKALAIEH, A. *et al.* A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Energy**, v. 104, p. 683-710, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.061>. Acesso em: 10 mai. 2024.

TALUKDER, M. M. R. *et al.* Conversion of waste cooking oil to biodiesel via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Energy Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2016-2019, 2010. <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1385/ABAB:132:1:911>. Acesso em: 17 mai. 2024.

TEIXEIRA, M. R. *et al.* Quantitative assessment of the valorisation of used cooking oils in 23 countries. **Waste management**, v. 78, p. 611-620, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.06.039>. Acesso em: 9 mai. 2024.

TOUQEER, T. *et al.* Fe₃O₄-PDA-lipase as surface functionalized nano biocatalyst for the production of biodiesel using waste cooking oil as feedstock: Characterization and process optimization. **Energies**, v. 13, n. 1, p. 177-195, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en13010177>. Acesso em: 29 jul. 2024.

TUBINO, M; ARICETTI, J. A. A green potentiometric method for the determination of the iodine number of biodiesel. **Fuel**, v. 103, p. 1158-1163, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.10.011>. Acesso em: 03 jul. 2024.

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, 2016. Disponível em: [https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11746-016-2901-y](https://doi.org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11746-016-2901-y). Acesso em: 13 mai. 2024.

VICENTINI-POLETTE, C. M. *et al.* Determination of free fatty acids in crude vegetable oil samples obtained by high-pressure processes. **Food Chemistry: X**, v. 12, p. 100166, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100166>. Acesso em: 18 abr. 2025.

VIEIRA, A. C. *et al.* Performance of liquid Eversa on fatty acid ethyl esters production by simultaneous esterification/transesterification of low-to-high acidity feedstocks. **Catalysts**, v. 11, n.12, p. 1486-1502, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal11121486>. Acesso em: 17 mai. 2024.

WANCURA, J. H. C. *et al.* Demystifying the enzymatic biodiesel: How lipases are contributing to its technological advances. **Renewable Energy**, v. 216, p. 119085-119115, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.119085>. Acesso em: 16 mai. 2024.

WANCURA, J. H. C. *et al.* Improving the soluble lipase-catalyzed biodiesel production through a two-step hydroesterification reaction system. **Bioenergy and Biofuels**, v. 103, n. 18, p. 7805-7817, 2019. Disponível em <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00253-019-10075-y>. Acesso em: 13 mai. 2024.

WANCURA, J. H. C. *et al.* Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 648-667, 2020. Disponível em: <https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1002/bab.1835>. Acesso em: 11 mai. 2024.

WANCURA, J. H. C. *et al.* Semi-continuous production of biodiesel on pilot scale via enzymatic hydroesterification of waste material: Process and economics considerations. **Journal of Cleaner Production**, v. 285, p. 124838-124847, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124838>. Acesso em: 17 mai. 2024.

WONG, Y. Y. *et al.* Attached microalgae converting spent coffee ground into lipid for biodiesel production and sequestering atmospheric CO₂ simultaneously. **Algal Research**, v. 66, p. 102780, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102780>. Acesso em: 28 mar. 2025.

WULANDARI, R. *et al.* Betel leaf extract as an anti-bacterial agent in solid soap formulation and characterisation. **Jurnal Pijar Mipa**, v. 18, n. 3, p. 436-441, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.29303/jpm.v18i3.4940>. Acesso em: 10 mai. 2024.

XIE, W; HUANG, M. Fabrication of immobilized *Candida rugosa* lipase on magnetic Fe₃O₄-poly (glycidyl methacrylate-co-methacrylic acid) composite as an efficient and recyclable biocatalyst for enzymatic production of biodiesel. **Renewable Energy**, v. 158, p. 474-486, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.172>. Acesso em: 29 jul. 2024.

ZANDIE, M. *et al.* The viability of using gasoline-integrated biodiesel–diesel mixtures in engines as a solution to greenhouse gas emissions: a review. **Clean Energy**, v. 6, n. 6, p. 848-868, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ce/zkac056>. Acesso em: 27 mar. 2025.

ZENEVICZ, M. C. P. *et al.* A two-step enzymatic strategy to produce ethyl esters using frying oil as substrate. **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 52-55, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.018>. Acesso em: 13 mai. 2024.

ZOU, T. *et al.* Preparation of immobilized lipase on silica clay as a potential biocatalyst on synthesis of biodiesel. **Catalysts**, v. 11, n. 10, p. 1266, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal10111266>. Acesso em: 19 jul. 2020.

APÊNDICE A – REAGENTES DE GRAU ANALÍTICO UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DESTE TRABALHO

Na Tabela 16 estão descritos os demais reagentes de grau analítico utilizados no desenvolvimento deste trabalho, assim como seus respectivos fornecedores.

Tabela 16 – Reagentes utilizados na confecção deste trabalho

| Reagente | Origem |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| Acetona P.A. | Anidrol® |
| Ácido acético glacial P.A. | Vetec® |
| Ácido clorídrico P.A. | Vetec® |
| Ácido fosfórico-orto | Ohemis® |
| Água destilada | Laboratório de Bioprocessos UNIFAL-MG |
| Amido solúvel P.A. | Vetec® |
| Clorofórmio P.A. | Perfyl Tech® |
| Comassie Brilliant Blue G-250 | Sigma-Aldrich® |
| Etanol 70% | Archote |
| Etanol 95% | ACS Científica® |
| Etanol P.A. | Êxodo Científica® |
| Éter etílico P.A. | Synth® |
| Fenolftaleína P.A. | Cinectix® |
| Fosfato de sódio bibásico P.A. | Dinâmica® |
| Fosfato de sódio monobásico P.A. | Dinâmica® |
| Goma arábica | Proquímios® |
| Iodeto de potássio P.A. | IsoFar® |
| Iodo resublimado | Vetec® |
| KOH em lentilhas P.A. | Proquímios® |
| NaOH em micropérolas P.A. | Vetec® |
| Sulfato de sódio anidro | Neon® |
| Tiosulfato de sódio P.A. | Dinâmica® |

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

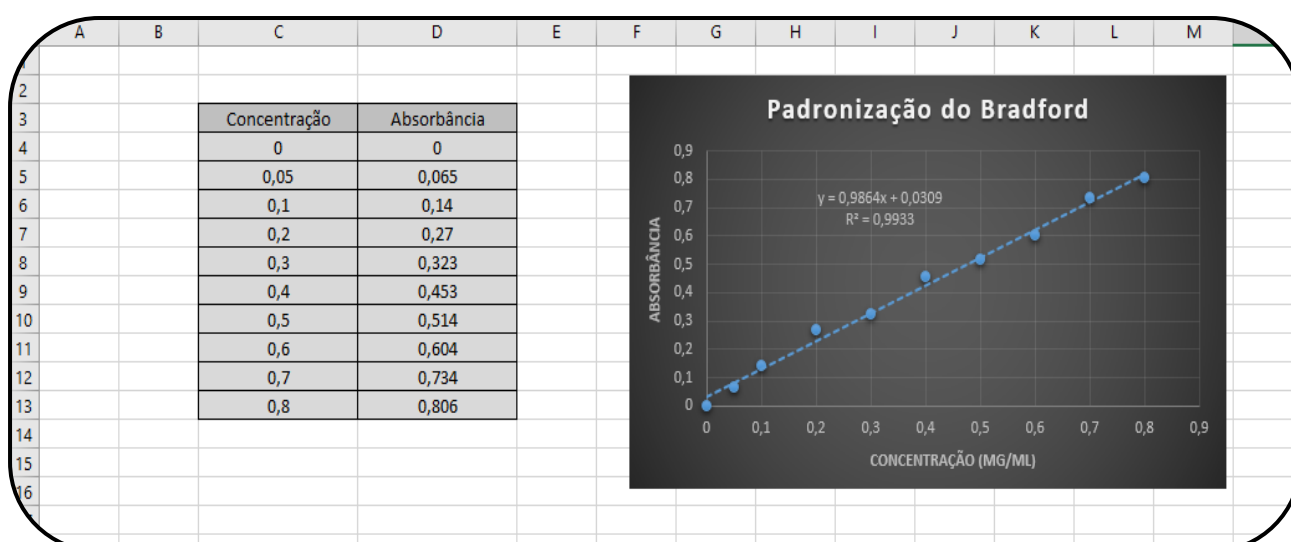
APÊNDICE B – PADRONIZAÇÃO DO REAGENTE DE BRADFORD A PARTIR DA CONSTRUÇÃO DE UMA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE BSA

Uma solução-mãe aquosa de albumina sérica bovina (BSA) 1 mg/mL foi preparada e, a partir dela, foram preparadas novas soluções com diferentes concentrações de BSA (0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL e 0,8 mg/mL).

Foram preparadas soluções em triplicata contendo 5 mL de reagente de Bradford e 0,1 mL de cada solução padrão de BSA. Após a adição da proteína ao reagente de Bradford, as amostras foram mantidas em repouso por 5 minutos, verificando-se o aparecimento de uma coloração azul cuja intensidade variou proporcionalmente à concentração de BSA no meio.

Essa intensidade foi quantificada a partir da leitura da absorbância de cada amostra em um espectrofotômetro a 595 nm. O aparelho foi zerado utilizando uma solução contendo 5 mL de reagente de Bradford e 0,1 mL de água destilada. As absorbâncias foram anotadas para cada concentração e, a partir desses valores, foi traçado um gráfico no Excel, conforme demonstrado na Figura 22. Esse gráfico forneceu uma equação que relaciona a absorbância lida (y) com suas respectivas concentrações (x). O valor de R^2 varia de 0 a 1 e indica a precisão desta equação.

Figura 22 – Determinação da equação para a padronização do reagente de Bradford



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).