



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE OBTIDA POR FUNGO ENDOFÍTICO
ISOLADO DE PLANTA AMAZÔNICA PARA PRODUÇÃO DE
BIODIESEL

JULIANA GISELE CORRÊA RODRIGUES

MANAUS – AM

2024

JULIANA GISELE CORRÊA RODRIGUES

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE OBTIDA POR FUNGO ENDOFÍTICO
ISOLADO DE PLANTA AMAZÔNICA PARA PRODUÇÃO DE
BIODIESEL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque

Coorientador: Prof. Dr. Sergio Duvoisin Jr.

MANAUS – AM

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

R696i	Rodrigues, Juliana Gisele Corrêa Imobilização da lipase obtida por fungo endofítico isolado de planta amazônica para a produção de biodiesel / Juliana Gisele Corrêa Rodrigues . Manaus : [s.n], 2024. 158 f.: color.; 21,0 cm. Tese - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - BIONORTE- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2024. Inclui Bibliografia. Inclui Anexo. Orientador: Patrícia Melchionna Albuquerque. Coorientador: Sergio Duvoisin Junior. 1. Enzima. 2. Transesterificação . 3. Biocatálise. 4. Resíduo. 5. Imobilização. I. Patrícia Melchionna Albuquerque (Orient.) II . Sergio Duvoisin Junior (Coorient.) III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título CDU(1997)604(043)
-------	---

JULIANA GISELE CORRÊA RODRIGUES

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE OBTIDA POR FUNGO ENDOFÍTICO
ISOLADO DE PLANTA AMAZÔNICA PARA PRODUÇÃO DE
BIODIESEL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 17/12/2024.

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **PATRICIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE**
Data: 17/02/2025 13:30:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque (Orientadora)
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)

Documento assinado digitalmente
 **JOAO VICENTE BRAGA DE SOUZA**
Data: 17/02/2025 10:10:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza (Membro Titular Interno)
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Documento assinado digitalmente
 **LIZANDRO MANZATO**
Data: 13/02/2025 14:39:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Lizandro Manzatto (Membro Titular Interno)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM)

Documento assinado digitalmente
 **NELIO TEIXEIRA MACHADO**
Data: 15/02/2025 12:46:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Nelio Texeira Machado (Membro Titular Externo)
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL LOPES E OLIVEIRA**
Data: 13/02/2025 17:05:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rafael Lopes e Oliveira (Membro Titular Externo)
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Juliana Gisele Corrêa Rodrigues, autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE OBTIDA POR FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO DE PLANTA AMAZÔNICA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Manaus, 21 de janeiro de 2025.

Juliana Gisele Corrêa Rodrigues

CPF: 009.299.892-52

**À Deus, aos meus amados pais, irmãs,
avó, tios e tias.
Obrigada por cada incentivo. Com amor
e gratidão eterna.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela força, sabedoria e perseverança que me foram concedidas ao longo desta jornada. Sua presença foi essencial nos momentos mais desafiadores, iluminando meu caminho e inspirando cada etapa deste trabalho. À Nossa Senhora, cuja intercessão maternal trouxe conforto, proteção e força, especialmente nos momentos mais difíceis, sou eternamente grata.

Aos meus pais, que desde o início foram pilares fundamentais na minha vida, oferecendo amor, cuidado e dedicação irrestritos. À minha mãe Cândida Helena, que embora não esteja mais fisicamente entre nós, vive em cada conquista minha. Sua dedicação, esforço incansável e noites em claro ao meu lado foram a base dos meus sonhos. Hoje, tenho certeza de que, junto com Deus, ela cuida de mim e me protege de onde estiver. Ao meu pai Paulo Roberto, meu maior suporte físico e emocional, que sempre acreditou no meu potencial, incentivou meus estudos e lutou para que eu nunca desistisse dos meus objetivos.

Às minhas irmãs Lêda e Paula Rodrigues, que sempre me protegeram, incentivaram e estiveram ao meu lado, compartilhando apoio e amor nos momentos mais difíceis. À minha avó, símbolo de força e superação, me dedicou tanto amor e cuidado e, agora junto com minha mãe, me guia e protege do céu.

Ao meu padrinho Carlos Humberto, por ser uma fonte constante de inspiração e apoio incondicional. Aos meus tios e primas, que sempre zelaram por mim e me apoiaram com tanto carinho.

À minha orientadora Patrícia Melchionna, cuja dedicação, zelo e confiança no meu potencial foram cruciais para que esta trajetória fosse possível. Sua paciência e atenção constante nunca serão esquecidas. Ao meu coorientador, Sergio Duvoisin Jr., que está presente na minha jornada acadêmica desde 2013, agradeço o apoio incondicional e os ensinamentos valiosos ao longo desses anos.

Ao meu namorado Gustavo Evaristo, que esteve ao meu lado, me encorajando e apoiando em cada passo, sempre acreditando nos meus sonhos.

Aos amigos, cuja companhia e palavras de incentivo tornaram essa jornada mais leve e cheia de bons momentos. Em especial, agradeço à Nelly Carmem, Nilcinara Azevedo, Natalia Esperança, Iury Monteiro, Maisson Cardelly, Fernanda Moura, Caroline Silva, Raiana Gurgel, Bárbara Nunes, Lucas Falcão, Carol Lacerda e Pedro Henrique. Vocês foram um alicerce importante em minha vida.

Ao grupo GP-QAT, agradeço não apenas pela estrutura física do laboratório, como também o suporte contínuo e a parceria ao longo do desenvolvimento do projeto. Aos professores, especialmente meus orientadores, e à técnica de laboratório Sara Loyola, pela dedicação incansável. Aos membros do grupo, que fizeram parte dessa trajetória, minha gratidão.

Às minhas alunas de iniciação científica, Fernanda Veras e Celine Santos, por sua dedicação, esforço e companheirismo. Vocês foram braços direito e esquerdo, essenciais para o sucesso do trabalho.

À Bionorte, pela estrutura e apoio fornecidos. À FAPEAM, pelo fomento da bolsa e à Universidade do Estado do Amazonas, por toda a infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste projeto.

À todos que de alguma forma, contribuíram para esta jornada, meu sincero agradecimento.

**“Quem sai andando e chorando, enquanto semeia,
voltará com júbilo, trazendo os seus feixes.”
Salmos 126:6**

RODRIGUES, Juliana Gisele Corrêa. **Imobilização de Lipase Obtida por Fungo Endofítico Isolado de Planta Amazônica Para Produção de Biodiesel**. 2024. 158 f. Projeto de Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2024.

RESUMO

A catálise alcalina é o principal processo de obtenção do biodiesel comercial. Entretanto, esse método gera um efluente alcalino, além de apresentar elevado consumo de água na etapa de purificação e dificuldade na recuperação do glicerol. Como alternativa existe a biocatálise, que ao empregar lipases, facilita a separação das fases pós reação, diminui o custo do tratamento de águas residuais e facilita a recuperação do glicerol. Contudo, do ponto de vista prático, ainda existem dificuldades técnicas quanto ao uso de lipases, principalmente devido ao elevado custo das enzimas comerciais. Uma das formas de reduzir esse custo consiste na imobilização das lipases, permitindo a sua reutilização por vários ciclos da reação de transesterificação. Além disso, a descoberta de novas fontes dessa enzima pode reduzir o custo de produção, como também facilitar sua aplicabilidade, sendo os fungos endofíticos exemplos de fontes lipolíticas promissoras. Assim, o presente estudo teve como objetivo imobilizar lipase produzida por um fungo endofítico amazônico para aplicação na produção de biodiesel. Para a produção da lipase foi utilizado o fungo endofítico *Endomelaconiopsis endophytica* QAT_7AC. Após a determinação da maior atividade enzimática em fermentação submersa, o extrato lipolítico foi preparado em maior volume e purificado, sendo posteriormente caracterizada quanto ao pH e temperatura ótimos. Foram conduzidos testes de produção de biodiesel para avaliar o rendimento, considerando o uso do óleo de fritura, em comparação com o óleo de soja; o tempo de reação; e o tipo de enzima (comercial ou extrato enzimático). Em seguida, por meio de um delineamento experimental avaliou-se a proporção álcool: óleo, o tempo de reação e o tipo de álcool de cadeia curta. As amostras de biodiesel obtidas foram purificadas, caracterizadas, submetidas à análise por CG-EM e pesadas, para identificação dos ésteres formados e determinação do rendimento. A imobilização das lipases foi realizada em alginato de cálcio e em nanopartículas magnéticas, sendo as enzimas avaliadas quanto à sua estabilidade, capacidade de reutilização, estabilidade de armazenamento e rendimento na produção de biodiesel. O fungo *E. endophytica* apresentou produção enzimática de 11262 U/mL após 120 h de cultivo. O extrato lipolítico demonstrou maior atividade catalítica a 40 °C e pH 5,5 e foi purificado em Sephadex G-100, obtendo-se atividade específica de 10942,7 U/mg. Ao avaliar o óleo de soja e o resíduo de óleo de fritura como matéria-prima para a produção de biodiesel por transesterificação biocatalítica utilizando etanol, a reação com resíduo de óleo obteve melhor rendimento (90%), com proporção etanol: óleo de 3:1 e 360 minutos de reação. A imobilização enzimática em alginato de cálcio obteve uma eficiência de 92,3%, sendo viável a utilização deste sistema biocatalítico em 4 ciclos de reação. A imobilização em nanopartículas magnéticas apresentou eficiência de 50% e pôde ser utilizada por até 3 ciclos. As amostras de biodiesel, quando produzidas por transesterificação enzimática apresentaram 4 parâmetros dentro dos valores prescritos pela ANP, com índice de acidez acima do estabelecido. Assim, os resultados experimentais obtidos demonstram a viabilidade e a sustentabilidade da aplicação de extrato enzimático fúngico como biocatalisador na produção de ésteres etílicos utilizando resíduo de óleo de fritura como matéria-prima.

Palavras-chave: Enzima; transesterificação; biocatálise; resíduos; imobilização.

RODRIGUES, Juliana Gisele Corrêa. **Immobilization of Lipase Obtained by an Endophytic Fungus Isolated from an Amazonian Plant for Biodiesel Production**. 2024. 158p. Thesis Project (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – Amazonas State University, Manaus, 2024.

ABSTRACT

Alkaline catalysis is the primary process for producing commercial biodiesel. However, this method generates alkaline effluents, requires significant water consumption during purification, and complicates glycerol recovery. As an alternative, biocatalysis employing lipases facilitates phase separation after the reaction, reduces wastewater treatment costs, and simplifies glycerol recovery. Nonetheless, practical challenges persist, primarily due to the high cost of commercial enzymes. One way to mitigate this cost is through lipase immobilization, enabling their reuse across multiple transesterification reaction cycles. Additionally, discovering new enzyme sources can lower production costs and improve applicability, with endophytic fungi representing promising lipolytic sources. This study aimed to immobilize lipase produced by an Amazonian endophytic fungus for biodiesel production. The fungus *Endomelaconiopsis endophytica* QAT_7AC was used for lipase production. After determining peak enzymatic activity during submerged fermentation, the lipolytic extract was prepared in larger volumes, purified, and subsequently characterized for optimal pH and temperature. Biodiesel production tests evaluated yield using waste frying oil compared to soybean oil, reaction time, and enzyme type (commercial or enzymatic extract). An experimental design was conducted to assess alcohol-to-oil ratios, reaction time, and types of short-chain alcohols. The biodiesel samples obtained were purified, characterized, analyzed by GC-MS, and weighed to identify the esters formed and determine yield. Lipase immobilization was performed using calcium alginate and magnetic nanoparticles, with enzymes evaluated for stability, reusability, storage stability, and biodiesel production yield. The fungus *E. endophytica* produced 11,262 U/mL of enzymes after 120 hours of cultivation. The lipolytic extract demonstrated maximum catalytic activity at 40 °C and pH 5.5, and purification using Sephadex G-100 resulted in specific activity of 10,942.7 U/mg. When comparing soybean oil and waste frying oil as feedstocks for biodiesel production via biocatalytic transesterification using ethanol, the reaction with waste oil achieved a higher yield (90%) under a 3:1 ethanol-to-oil ratio and 360 minutes of reaction. Enzyme immobilization in calcium alginate achieved 92.3% efficiency and was viable for use in four reaction cycles. Immobilization in magnetic nanoparticles achieved 50% efficiency and could be reused for up to three cycles. The biodiesel samples produced via enzymatic transesterification met four ANP specifications, with an acidity index exceeding the established limit. These experimental results indicate the feasibility of using fungal enzymatic extract as biocatalyst for producing ethyl esters, employing waste frying oil as a feedstock.

Keywords: Enzyme, transesterification, biocatalysis, waste, immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de Biodiesel entre os anos de 2018 à 2024.....	14
Figura 2 - Matérias-primas para produção de Biodiesel na União Europeia.....	15
Figura 3 - Painel de Produção de Biodiesel no Brasil por região – setembro/2024.....	16
Figura 4 - Matérias-primas utilizadas para produção de Biodiesel no Brasil.....	17
Figura 5 - Reação de esterificação de um triglicerídeo.....	21
Figura 6 - Reação de transesterificação de um triglicerídeo.....	21
Figura 7 - Reação de transesterificação enzimática do triglicerídeo.....	22
Figura 8 - Tipos de imobilização enzimática.....	25
Figura 9 - Fluxograma ilustrativo da metodologia empregada no desenvolvimento deste trabalho.....	29
Figura 10 - Ilustração do sistema utilizado para a imobilização do extrato lipolítico de <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC em esferas de alginato de cálcio.....	37
Figura 11 - Esquema ilustrativo da metodologia de imobilização do extrato lipolítico em nanopartículas magnéticas.....	38
Figura 12 - Ilustração do procedimento utilizado na reação de transesterificação enzimática para obter biodiesel.....	41
Figura 13 - Produção de lipase do fungo endofítico amazônico <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC em cultivo submerso (●) e curva polinomial (--).....	48
Figura 14 - Análise de variância ($p < 0,05$) para a atividade enzimática da lipase produzida pelo fungo <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC em diferentes temperaturas.....	50
Figura 15 - Análise de variância ($p < 0,05$) para a atividade enzimática da lipase produzida pelo fungo <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC em diferentes valores de pH.....	51
Figura 16 - Extrato lipolítico (a) e extrato lipolítico precipitado (b) de <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC imobilizados em esferas de alginato de cálcio.....	54
Figura 17 - Estabilidade térmica do extrato lipolítico de <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC (■) não imobilizado; e do extrato (●) e extrato precipitado (▲) imobilizados em alginato de cálcio.....	55
Figura 18 – Estabilidade do extrato lipolítico de <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC durante o armazenamento a 03 °C. Atividade relativa do extrato enzimático (■) e do extrato enzimático precipitado (●) imobilizados em alginato de cálcio.....	57

Figura 19 - Estabilidade térmica do extrato lipolítico de <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC (■) não imobilizado; e do extrato (●) e extrato precipitado (▲) imobilizados em nanopartículas magnéticas.....	59
Figura 20 - Estabilidade do extrato lipolítico precipitado imobilizado em partículas magnéticas durante o armazenamento a 3 °C.....	60
Figura 21 - Cromatogramas de amostras de biodiesel produzido por transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura (Ensaio 4, em vermelho) e do óleo de soja (Ensaio 8, em preto), a partir do uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> . A proporção metanol:resíduo foi de 2:1 e de metanol:óleo foi de 3:1. As reações foram realizadas a 40 °C durante 360 min.....	63
Figura 22 - Gráfico de Pareto obtido a partir da transesterificação enzimática do óleo de soja e do resíduo de óleo de fritura, em diferentes proporções metanol:matéria-prima, comparando-se o uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>E. endophytica</i> e o da enzima comercial (lipase de <i>Candida rugosa</i>).....	64
Figura 23 - Cromatogramas de amostras de biodiesel produzido por transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura, a partir do uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>E. endophytica</i> (Ensaio 3, em azul e ensaio 4, em verde) e da transesterificação do óleo de soja, a partir do uso da enzima comercial – lipase de <i>Candida rugosa</i> (Ensaio 5, em preto). A proporção etanol: matéria prima foi de 2:1 (Ensaio 3) e de 3:1 (Ensaio 4 e 5). As reações foram realizadas a 40 °C durante 360 min.....	67
Figura 24 - Gráfico de Pareto obtido a partir da transesterificação enzimática do óleo de soja e do resíduo de óleo de fritura, em diferentes proporções etanol: matéria-prima, comparando-se o uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>E. endophytica</i> e o da enzima comercial (lipase de <i>Candida rugosa</i>).....	68
Figura 25 – Superfícies de resposta para o rendimento de biodiesel em função da matéria-prima – óleo de soja (-1) e resíduo de óleo (-1); do tipo de enzima – enzima comercial (-1) e extrato enzimático fúngico (+1); e da proporção etanol: matéria prima – 2:1 (-1) e 3:1 (+1). Em (a): matéria-prima versus tipo de enzima; em (b) proporção etanol: óleo versus a matéria-prima; e em (c) o tipo de enzima versus a proporção etanol: óleo.....	69
Figura 26 - Gráfico de Pareto obtido a partir da transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura catalisada pelo extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC.....	72
Figura 27 - Superfície de resposta para o rendimento de biodiesel em função do tempo de reação – 120 min (-1) e 360 min (-1); da proporção álcool: resíduo de óleo – 3:1 (-1) e 4:1(+1); e do tipo de álcool – metanol (-1) e etanol (+1). Em (a) a proporção álcool: resíduo	

de óleo versus o tipo de álcool; em (b) o tempo de reação versus o tipo de álcool; e em (c) o tempo de reação versus a proporção álcool: resíduo de óleo.....	74
Figura 28 - Rendimentos de biodiesel obtidos através da reutilização do extrato enzimático de <i>Endomelanconiosis endophytica</i> QAT_7AC e do extrato enzimático precipitado imobilizados em alginato de cálcio na transesterificação do resíduo de óleo de fritura com etanol. Os rendimentos obtidos com os extratos não imobilizados referem-se à batelada 0....	76
Figura 29 - Cromatogramas de amostras de biodiesel produzido por transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura com etanol, com reutilização do extrato lipolítico de <i>Endomelanconiosis endophytica</i> imobilizado em alginato de cálcio. As reações foram realizadas a 40 °C durante 360 min, com a proporção etanol: resíduo de óleo de fritura de 3:1.	78
Figura 30 - Cromatogramas de amostras de biodiesel produzido por transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura com etanol, com reutilização do extrato lipolítico precipitado de <i>Endomelanconiosis endophytica</i> imobilizado em alginato de cálcio. As reações foram realizadas a 40 °C durante 360 min, com a proporção etanol: resíduo de óleo de fritura de 3:1.....	79
Figura 31 - Rendimentos de biodiesel obtidos através da reutilização do extrato enzimático precipitado de <i>Endomelanconiosis endophytica</i> QAT_7AC imobilizado em nanopartículas magnéticas na transesterificação do resíduo de óleo de fritura com etanol. Os rendimentos obtidos com os extratos não imobilizados referem-se à batelada 0.....	80
Figura 32 - Cromatogramas de amostras de biodiesel produzido por transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura com etanol, com reutilização do extrato lipolítico precipitado de <i>Endomelanconiosis endophytica</i> imobilizado em nanopartículas magnéticas. As reações foram realizadas a 40 °C durante 360 min, com a proporção etanol: resíduo de óleo de fritura de 3:1.....	82
Figura 33 - Gráficos de Pareto para a caracterização do biodiesel obtido a partir do planejamento experimental 2 ³ , variando-se a matéria-prima oleaginosa, a proporção metanol: matéria-prima e o tipo de biocatalisador. (a) Viscosidade cinemática; (b) Massa específica; (c) Cinzas; (d) Ponto de fulgor e (e) Índice de acidez.....	86
Figura 34 - Gráficos de Pareto para a caracterização do biodiesel obtido a partir do planejamento experimental 2 ³ , variando-se a matéria-prima oleaginosa, a proporção etanol: matéria-prima e o tipo de biocatalisador. (a) Viscosidade cinemática; (b) Massa específica; (c) Cinzas; (d) Ponto de fulgor e (e) Índice de acidez.....	89
Figura 35 - Gráficos de Pareto para a caracterização do biodiesel obtido a partir do planejamento experimental 2 ³ , variando-se o tempo de reação, a proporção álcool: resíduo e o	

tipo de álcool (a) Viscosidade cinemática; (b) Massa específica; (c) Cinzas; (d) Ponto de fulgor e (e) Índice de acidez.....92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades do diesel e do biodiesel.....	10
Tabela 2 - Diferenças entre as gerações de biodiesel.....	11
Tabela 3 - Composição de ácidos graxos em resíduos de óleo de cozinha.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4 - Planejamento experimental fatorial 2^3 realizado para avaliar os fatores que influenciam a transesterificação enzimática na produção de biodiesel.....	40
Tabela 5 - Planejamento experimental fatorial 2^3 realizado para avaliar os fatores que influenciam a transesterificação do resíduo de óleo de fritura, mediada pelo extrato enzimático fúngico.....	41
Tabela 6 - Caracterização do resíduo de óleo de fritura utilizado no presente estudo e em outros trabalhos.....	46
Tabela 7 - Efeito da temperatura sobre a atividade de lipase do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC.....	49
Tabela 8 - Efeito do pH sobre a atividade de lipase do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC.....	50
Tabela 9 - Resultados da purificação enzimática obtidos para a lipase de <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC.....	52
Tabela 10 - Eficiência da imobilização de lipase em alginato de sódio em diferentes estudos.	54
Tabela 11- Eficiência da imobilização de lipase em partículas magnéticas em diferentes estudos.....	58
Tabela 12 - Rendimentos de biodiesel obtidos a partir da transesterificação enzimática do óleo de soja (O.S) e do resíduo de óleo de fritura (R.O), comparando o uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> (E.E) com o da enzima comercial (lipase de <i>Candida rugosa</i> – E.C) em diferentes proporções de metanol: matéria-prima. As reações foram realizadas a 40 °C, durante 360 min, com 3% (m/m) de biocatalisador.....	62
Tabela 13 - Rendimentos de biodiesel obtidos por transesterificação biocatalítica em diferentes condições reacionais com a utilização de metanol.....	65
Tabela 14 - Rendimentos de biodiesel obtidos a partir da transesterificação enzimática do óleo de soja (O.S) e do resíduo de óleo de fritura (R.O), comparando o uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> (E.E) com o da enzima comercial (lipase de <i>Candida rugosa</i> – E.C) em diferentes proporções de etanol: matéria-	

prima. As reações foram realizadas a 40 °C, durante 360 min, com 3% (m/m) de biocatalisador.....	66
Tabela 15 - Rendimentos de biodiesel obtidos por transesterificação biocatalítica em diferentes condições reacionais com a utilização de etanol.....	70
Tabela 16 - Rendimentos de biodiesel obtidos a partir da transesterificação do resíduo de óleo de fritura catalisada pelo extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC em diferentes condições reacionais.....	71
Tabela 17 -Rendimentos de biodiesel e atividade enzimática retida obtidos através da reutilização do extrato enzimático de <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC e do extrato enzimático precipitado imobilizados em alginato de cálcio na transesterificação do resíduo de óleo de fritura.....	77
Tabela 18 - Rendimentos de biodiesel e atividade enzimática retida obtidos através da reutilização do extrato enzimático precipitado de <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> QAT_7AC imobilizados em nano partículas magnéticas na transesterificação do resíduo de óleo de fritura.....	81
Tabela 19 - Resultados obtidos para a caracterização de amostras de biodiesel obtidas a partir do planejamento experimental 2 ³ , variando-se a matéria-prima oleaginosa, a proporção metanol: óleo e o tipo de biocatalisador. As reações foram realizadas durante 360 min, com 3% (m/v) do biocatalisador, a 40°C.....	85
Tabela 20 - Resultados obtidos para a caracterização de amostras de biodiesel obtidas a partir do planejamento experimental 2 ³ , variando-se a matéria-prima oleaginosa, a proporção etanol: óleo e o tipo de biocatalisador. As reações foram realizadas durante 360 min, com 3% (m/v) do biocatalisador, a 40°C.....	88
Tabela 21 - Resultados obtidos para a caracterização de amostras de biodiesel obtidas a partir do planejamento experimental 2 ³ , variando-se o tempo de reação, a proporção álcool: resíduo de óleo e o tipo de álcool. As reações foram realizadas com 3% (m/v) do extrato enzimático fúngico, a 40°C.....	91
Tabela 22 - Caracterização do biodiesel obtido a partir da transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura e etanol, utilizando biocatalisadores imobilizados em diferentes suportes. As reações foram realizadas a 40 oC, durante 360 minutos, com 3% (m/v) do biocatalisador e proporção etanol: resíduo de 3:1.....	94
Tabela 23 - Caracterização do biodiesel produzido com resíduo de óleo de fritura.....	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aa	Atividade enzimática antes da purificação
Af	Atividade após a utilização da enzima imobilizada
AGL	Ácidos Graxos Livres
ANP	Agência Nacional de Petróleo e Gás
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ao	Atividade enzimática obtida antes da utilização da enzima imobilizada
AOCS	American Oil Chemists Society
Ap	Atividade enzimática obtida após a purificação
ASTM	American Society for Testing and Materials
BDA	Batata Dextrose Ágar
BSA	Albumina de Soro Bovino
CARG	Taxa de Crescimento Anual Composto
CCM	Central de Coleções Microbiológicas
CNPE	Conselho Nacional de Políticas Energéticas
CG-EM	Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectômetro de Massa
Cp	Concentração proteica antes da purificação
Cpp	Concentração proteica após a purificação
EC	Enzima Comercial
EE	Extrato Enzimático
FAME	Fatty Acid Methyl Ester (éster metílico de ácido graxo)
HCl	Ácido Clorídrico
KOH	Hidróxido de potássio
OS	Óleo de Soja
P-NPP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
RO	Resíduo de óleo
ROT	Resíduo de óleo tratado
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
Uf	Atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização
Uo	Atividade obtida no início da imobilização
Us	Atividade obtida na enzima imobilizada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
1.1	Objetivos.....	9
1.1.1	Objetivo Geral.....	9
1.1.2	Objetivos Específicos.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1	Biodiesel.....	10
2.2	Matéria-prima para a Obtenção do Biodiesel.....	11
2.3	Mercado do Biodiesel Proveniente de Resíduo de Óleo de Fritura.....	13
2.4	Produção do Biodiesel.....	18
2.5	Processos de Produção do Biodiesel.....	20
2.5.1	Pirólise.....	20
2.5.2	Esterificação.....	20
2.5.3	Transesterificação.....	21
2.5.4	Biocatálise.....	22
2.6	Lipases.....	23
2.7	Imobilização de Lipases.....	25
2.7.1	Suportes para Imobilização de Enzimas.....	26
2.7.2	O desenvolvimento do mercado de imobilização enzimática para a produção de Biodiesel.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	Microrganismo.....	29
3.2	Matéria-prima Vegetal.....	30
3.3	Caracterização Físico-química do Resíduo de Óleo de Fritura e do Óleo de Soja...30	
3.3.1	Determinação da Gravidade Específica.....	30
3.3.2	Determinação do Índice de Acidez.....	31
3.3.3	Determinação do Índice de Peróxidos.....	31
3.3.4	Determinação do índice de saponificação.....	32

3.4	Produção de Lipase.....	32
3.5	Determinação da Atividade Enzimática de Lipase.....	33
3.6	Determinação da Concentração de Proteínas.....	34
3.7	Caracterização da Enzima.....	34
3.8	Purificação do Extrato Enzimático.....	34
3.8.1	Precipitação.....	34
3.8.2	Purificação em Coluna.....	36
3.8.3	Purificação por Ultrafiltração.....	36
3.8.4	Atividade Específica, Porcentagem de Recuperação e Fator de Purificação.....	36
3.9	Imobilização Enzimática.....	37
3.9.1	Imobilização em Alginato de Cálcio.....	37
3.9.2	Imobilização em Nanopartículas Magnéticas.....	37
3.9.3	Rendimento da Imobilização.....	38
3.9.4	Atividade Recuperada.....	38
3.9.5	Estabilidade Térmica da Enzima Imobilizada.....	39
3.9.6	Avaliação da Estabilidade de Armazenamento da Enzima Imobilizada.....	39
3.9.7	Reutilização do Biocatalisador Imobilizado.....	39
3.10	Transesterificação Enzimática - Produção de Biodiesel.....	40
3.11	Purificação do Biodiesel.....	42
3.12	Rendimento do Biodiesel.....	42
3.13	Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas.....	43
3.14	Caracterização Físico-Química do Biodiesel.....	43
3.14.1	Viscosidade Cinemática.....	43
3.14.2	Massa Específica.....	43
3.14.3	Cinzas.....	44
3.14.4	Ponto de Fulgor.....	44
3.14.5	Índice de Acidez.....	45
3.15	Análises Estatísticas.....	45

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1	Caracterização do Resíduo de Óleo.....	46
4.2	Produção Enzimática.....	47
4.3	Caracterização do Extrato Enzimático.....	49
4.4	Purificação Enzimática.....	51
4.5	Imobilização Enzimática.....	53
4.5.1	Imobilização em Alginato de Cálcio.....	53
4.5.2	Imobilização em Nanopartículas Magnéticas.....	58
4.6	Produção de Biodiesel.....	61
4.6.1	Transesterificação Enzimática com Metanol.....	61
4.6.2	Transesterificação Enzimática com Etanol.....	65
4.6.3	Transesterificação Enzimática – Avaliação do Tempo de Reação e de Maiores Proporções Álcool: Resíduo de Óleo de Fritura.....	70
4.6.4	Produção de Biodiesel com o Extrato Lipolítico Imobilizado em Alginato de Cálcio	75
4.6.5	Produção de Biodiesel com o Extrato Lipolítico Imobilizado em Nanopartículas Magnéticas.....	80
4.7	Caracterização do Biodiesel.....	83
5	CONCLUSÃO.....	97
	REFERÊNCIAS.....	99
	ANEXOS.....	124
	ANEXO A – 1º produto gerado pela Tese - Artigo publicado na revista Energies em 2023.	124
	ANEXO B – 2º produto gerado pela Tese - Artigo publicado na revista Energies em 2024.	144

1 INTRODUÇÃO

O diesel de origem fóssil é uma fonte de energia não renovável que gera poluentes e está diretamente associado ao aquecimento global, às mudanças climáticas e até mesmo a algumas doenças crônicas (ARIANSOLA *et al.*, 2014). O biodiesel, por ser um combustível renovável, se tornou uma alternativa atraente para substituir o diesel ou ser misturado a ele a fim de mitigar os problemas de poluição (TIONG *et al.*, 2023).

As vantagens do biodiesel sobre o diesel incluem o fato de ser seguro, biodegradável e não tóxico, além de não conter enxofre e ser um melhor lubrificante. A demanda global por biodiesel vem aumentando consideravelmente nos últimos anos em função das políticas públicas que demandam o aumento da incorporação do biodiesel no diesel (CARPIO, 2023). Estima-se que o mercado global de biodiesel terá um valor de cerca de US\$ 54,8 bilhões em 2028, com crescimento anual composto em torno de 5,8% entre 2021 e 2028, evidenciando a necessidade de se avaliar novas matérias-primas (GRAND VIEW RESEARCH, 2022).

No Brasil, o óleo de soja é a principal matéria-prima utilizada para a obtenção do biodiesel, que representa de 70 a 80% do custo total de produção do biocombustível (NAYLOR e HIGGINS, 2018). Além disso, o óleo de soja é um produto amplamente utilizado na indústria alimentícia, o que aumenta o debate em torno da necessidade de se priorizar o seu uso para alimentos ao invés de combustíveis (SAHAR *et al.*, 2018; VAZQUEZ *et al.*, 2023). Uma solução para diminuir esse custo e o impasse sobre o uso de óleos alimentícios é a substituição do óleo de soja pelo resíduo de óleo de fritura (SAHAR *et al.*, 2018; TAMBOR *et al.*, 2019; SARNO e IULIANO, 2019; FONSECA *et al.*, 2019; THILAKARATHNE *et al.*, 2021).

Os resíduos de óleos de fritura representam uma fonte promissora de matéria-prima para a produção de biodiesel, sendo um dos principais resíduos orgânicos gerados em residências e estabelecimentos comerciais do setor alimentício (Fonseca *et al.*, 2019). Embora possuam um alto potencial poluidor, podendo contaminar o solo e a água, além de provocar entupimentos em redes de esgoto a longo prazo (Husain *et al.*, 2014), esses resíduos apresentam elevado potencial energético. Quando devidamente aproveitados, tornam-se uma solução sustentável para a produção de biodiesel eficiente e ambientalmente amigável, contribuindo para a redução de impactos ambientais e promovendo uma forma ecologicamente correta de reutilização (Tambor *et al.*, 2019; Gaur *et al.*, 2021).

O principal processo de obtenção do biodiesel comercial é a catálise alcalina, onde são gerados, por meio da transesterificação catalisada por base (NaOH ou KOH), ésteres de ácidos graxos de cadeia longa. Entretanto, esse processo apresenta desvantagens ao gerar um

efluente altamente alcalino, possuir alto consumo de água nas etapas de purificação e apresentar complicações na recuperação do subproduto, o glicerol. Além disso, necessita de tratamento preliminar quando utilizado o resíduo de óleo de fritura, elevando o custo de produção por catálise alcalina, levando a se ponderar alternativas para a otimização do processo de obtenção, como a biocatálise, com uso de lipases (RAMOS *et al.*, 2016; FERRUSCA *et al.*, 2023).

As lipases são enzimas cuja função biológica é catalisar a hidrólise de gorduras e óleos, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (RAMOS *et al.*, 2016). Dependendo das condições reacionais, estas enzimas também podem atuar como catalisadores de reações de transesterificação (acidólise, aminólise e alcoólise), esterificação e interesterificação (NORJANNAH *et al.*, 2016). Além disso, apresentam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos (MAROTTI *et al.*, 2017).

O processo de transesterificação para conversão da matéria-prima oleosa em ésteres de ácidos graxos de cadeia longa é uma reação cineticamente controlada, sendo o rendimento do biodiesel dependente do catalisador (RANA *et al.*, 2022). O desempenho da lipase, por sua vez, depende de vários fatores, incluindo características de adsorção do centro ativo da enzima, especificidade e inibidores da reação, entre outros, sendo de relevância a busca por novas fontes lipolíticas (NORJANNAH *et al.*, 2016; GRAND VIEW RESEARCH, 2022).

As lipases de origem microbiana apresentam inúmeras aplicações industriais, como na indústria farmacêutica, alimentícia e química (CHANDRA *et al.*, 2020; ZAMBARE *et al.*, 2021). Alguns estudos vêm comprovando que os fungos endofíticos são promissoras fontes dessas enzimas (MARTINEZ-KLIMOVA *et al.*, 2017; MATIAS *et al.*, 2021), sendo os microrganismos associados a hospedeiros tropicais ainda pouco explorados para essa aplicação.

Embora as lipases sejam fundamentais em diversas aplicações biotecnológicas, seu custo ainda pode ser significativo (BAJAJ *et al.*, 2010; FERRUSCA *et al.*, 2023). Nesse contexto, a imobilização enzimática oferece uma abordagem eficaz, permitindo a reutilização da lipase, o que não apenas reduz custos, mas também aumenta a estabilidade e a eficiência desses biocatalisadores (GIRALDO *et al.*, 2023; BRANDÃO JR *et al.*, 2023).

Na imobilização enzimática, a escolha do suporte desempenha um papel crucial, pois propriedades como porosidade, funcionalização e compatibilidade química influenciam diretamente a eficiência de ligação, a estabilidade térmica e a atividade catalítica da enzima imobilizada (ZHONG *et al.*, 2020; SHELDON; PELT, 2013).

Neste contexto, visando a produção de biodiesel por vias mais eficientes e sustentáveis, neste estudo foi investigado o uso da rota biocatalítica, a partir do extrato

lipolítico produzido pelo fungo endofítico amazônico *Endomelanconiopsis endophytica*, na sua forma livre e imobilizada, na produção de biodiesel, utilizando resíduo de óleo de fritura como matéria-prima.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Imobilizar lipase produzida por fungo endofítico amazônico para mediar a reação biocatalítica de produção de biodiesel utilizando resíduo de óleo de fritura.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar as características físico-químicas do resíduo de óleo de fritura e avaliar a viabilidade de uso do resíduo na reação biocatalítica para produção de biodiesel, comparando-o ao óleo de soja;
- Obter um extrato enzimático rico em lipase a partir do cultivo de um fungo endofítico amazônico pré-selecionado como bom produtor da enzima;
- Purificar e caracterizar a lipase fúngica obtida;
- Investigar os fatores que afetam o processo de produção do biodiesel pela via biocatalítica;
- Analisar a atividade catalítica da lipase quando imobilizada em diferentes suportes;
- Analisar a possibilidade de reutilização da enzima imobilizada na reação de produção do biodiesel;
- Determinar as características físico-químicas do biodiesel obtido a partir da reação catalisada pela lipase fúngica livre e imobilizada, utilizando o resíduo de óleo de fritura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

O biodiesel é um combustível renovável que tem atraído atenção nos últimos anos por ser considerado uma alternativa atraente para a substituição do diesel de origem fóssil. Caracterizado como um combustível biodegradável, sustentável, de queima limpa e não tóxico, o biodiesel é um éster alquílico (principalmente éster metílico de ácido graxo abreviado como FAME) de ácidos graxos de cadeia longa (C14 – C24) sintetizado a partir de várias matérias-primas lipídicas renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais (AGHBAHSLO *et al.*, 2016; AHANCHI *et al.*, 2018; TABATABAEI *et al.*, 2019).

A produção de biodiesel a partir de recursos renováveis é feita através da reação de transesterificação, na qual o grupo orgânico (alquil) do álcool é substituído pelo grupo orgânico de um triglicerídeo – principal componente da matéria-prima – produzindo éster alquílico de ácido graxo (biodiesel) e glicerol bruto (ELGHARBAWY *et al.*, 2022). Na Tabela 1 estão listadas as propriedades do biodiesel e do diesel.

Tabela 1- Propriedades do diesel e do biodiesel.

Propriedade	Unidade	Diesel ASTM D975	Biodiesel ASTM D6751
Composição		Hidrocarboneto (C ₁₀ - C ₂₁)	FAME (C ₁₄ - C ₂₄)
Conteúdo de oxigênio	%	0	11
Conteúdo de hidrogênio	%	13	12
Densidade a 15°C	g/cm ³	0,85	0,86 – 0,90
Viscosidade cinemática a 40 °C	C.st	2.5	1,9 – 6,0
Ponto de fulgor	°C	60 – 80	100 – 170
Concentração de enxofre	ppm	10	500
Poder calorífico	MJ/kg	45	37.3
Número de cetano	---	40 – 55	48 – 65

Fonte: ELGHARBAWY *et al.*, 2022.

2.2 Matéria-prima para a Obtenção do Biodiesel

Nas últimas duas décadas diferentes gerações de biodiesel foram desenvolvidas, diferenciando-se pela matéria-prima utilizada (ARANSIOLA *et al.*, 2014; GOH *et al.*, 2019). Na Tabela 2 é possível observar as diferenças presentes entre cada geração de biodiesel.

Tabela 2 - Diferenças entre as gerações de biodiesel.

Biodiesel	Matéria-prima	Processo tecnológico
Primeira geração	Óleos vegetais comestíveis	Esterificação e transesterificação dos óleos
Segunda geração	Óleos vegetais não-comestíveis	Esterificação e transesterificação dos óleos/sementes
	Matéria-prima lignocelulósica	Utilização de catalisadores orgânicos e aditivos
	Óleo residual de cozinha	
	Gordura animal	
Terceira geração	Microalgas	Cultivo de algas
		Extração dos óleos
		Transesterificação

Fonte: GOH *et al.*, 2019.

Os óleos vegetais comestíveis têm sido utilizados na produção de biodiesel e estudados há várias décadas, principalmente devido à sua pureza. Óleos refinados como de soja, canola, milho e girassol são mais comumente usados na obtenção de biodiesel. Porém, o uso dos óleos vegetais comestíveis induz o aumento do custo de produção do biocombustível. Além disso, o uso desses óleos é motivo de grande polêmica principalmente pelo dilema ético relacionado ao valor nutricional no mercado (ATHAR e ZAIDI, 2020; ADENUGA *et al.*, 2021).

Por outro lado, os óleos não comestíveis são matérias-primas de baixo custo que não concorrem com o mercado alimentar, cujo uso é capaz de reduzir os custos de produção do biodiesel, além de serem altamente disponíveis em diversas partes do mundo. No entanto, a principal desvantagem do uso desses óleos como matéria-prima vem de seu alto teor de ácidos graxos livres (AGL), uma vez que eles saponificariam quando em contato com um catalisador básico. Por isso, para obter um biodiesel de alta qualidade a partir desta matéria-prima, é necessário realizar a esterificação antes da reação de transesterificação (ATHAR e ZAIDI, 2020; ADENUGA *et al.*, 2021; MUNIR *et al.*, 2021; FERRUSCA *et al.*, 2023).

Outra matéria-prima utilizada na obtenção de biodiesel é a gordura animal, disponível em grandes quantidades e geralmente retirada de resíduos gerados por matadouros ou indústrias de processamento de alimentos (ANDREO-MARTINEZ *et al.*, 2022). Este resíduo é considerado uma matéria-prima economicamente viável, sendo utilizada na Europa, Estados Unidos e Brasil, onde é considerado a 2ª matéria-prima mais utilizada para produção de biodiesel (REZÂNIA *et al.*, 2019; ADEPOJU *et al.*, 2022).

Entretanto, assim como os óleos não comestíveis, a gordura animal também possui alto teor de ácidos graxos livres, sendo necessária a utilização de um catalisador capaz de lidar com os elevados teores de ácidos graxos ou um processo de duas etapas (esterificação e transesterificação) para obtenção de um biodiesel de qualidade comercial (SRINIVASAN *et al.*, 2018; REZÂNIA *et al.*, 2019; ENCINAR *et al.*, 2021; MOHIDDIN *et al.*, 2021).

A utilização de microalgas, por sua vez, apresenta algumas vantagens consideráveis em comparação às matérias-primas anteriormente citadas. Rápido crescimento, capacidade de crescer em múltiplas condições climáticas incluindo águas residuais, além de seu elevado teor de lipídios (entre 40-60%) são exemplos de vantagens (JALILIAN *et al.*, 2020; MOHIDDIN *et al.*, 2021). No entanto, algumas de suas principais desvantagens incluem a necessidade de grandes quantidades de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, além de algumas espécies de microalgas serem produtoras de toxinas (PIKULA *et al.*, 2020; MOHIDDIN *et al.*, 2021).

Por outro lado, o resíduo de óleo de cozinha ou óleo alimentício usado permite uma redução no custo de produção do biodiesel em 70-80%, além de ser uma matéria-prima com alta disponibilidade ao ser gerado por restaurantes, residências e indústrias de processamento de alimentos (SOJI-ADEKUNLE *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2020; KASIRAJAN, 2021; CHEN *et al.*, 2023). Porém, é imprescindível levar em consideração a qualidade do resíduo de óleo de fritura, pois dele depende a qualidade do biodiesel obtido.

Durante o processo de fritura, os óleos são aquecidos sob temperaturas acima de 100 °C e podem ser usados repetidamente, o que leva a uma degradação da qualidade do óleo, uma vez que durante esse processo, ocorrem reações térmicas, hidrolíticas, oxidativas, polimerização e craqueamento que modificam quimicamente o óleo original (MUCIÑO *et al.*, 2014; SUZIHAQUE *et al.*, 2022).

A Tabela 3 mostra a composição de ácidos graxos de amostras de resíduo de óleo de fritura. Como pode ser observado, a composição e as propriedades dependem do tipo de óleo e do manuseio. Portanto, para obtenção de biodiesel a partir desta matéria-prima é necessário realizar três etapas: pré-tratamento, reação de transesterificação e purificação do biodiesel (KHAN *et al.*, 2020).

Tabela 3 - Composição de ácidos graxos em resíduos de óleo de cozinha.

Ácido Graxo	Referências				
	Enguilo <i>et al.</i> , 2021 ^a	Awogbemi <i>et al.</i> , 2019 ^b	Chuah <i>et al.</i> , 2016 ^c	Foroutan <i>et al.</i> , 2019 ^d	Bargole <i>et al.</i> , 2021 ^e
Palmítico (C16:0)	12.03	0.36	39,00	31.88	11.00
Estearico (C18:0)	4.40	-	4,00	6.45	4.00
Oleico (C18:1)	23.58	0.8	24,00	41.04	24.00
Linoleico (C18:2)	52.48	0.10	54,00	17.98	54.00
Linolênico (C18:3)	6.65	-	7,00	0.43	7.00

^a Óleo residual da indústria alimentícia em Toluca, México. ^b Resíduos de óleo de girassol de restaurantes (fish and chips) em Durban, África do Sul. ^c Óleo usado de Cafeteria UTP em Seri Iskandar, Perak, Malásia. ^d Óleo usado de restaurantes em Bushehr, Irã. ^e Óleo residual da cantina do Instituto Nacional de Tecnologia Malaviya, Jaipur, Índia.

Essas alterações modificam as propriedades do resíduo, apresentando maior teor de AGL, o que pode afetar a reação de transesterificação, favorecendo a formação de sabões (saponificação) quando são utilizados catalisadores básicos. Outras propriedades que são afetadas pelo processo de fritura são viscosidade, tensão superficial, ponto de fulgor, cor e teor de umidade (AZAHAR *et al.*, 2016; SUZIHAQUE *et al.*, 2022). Por esta razão, é obrigatória a realização de uma caracterização adequada do óleo alimentar residual para garantir que o biodiesel produzido cumpra os padrões de qualidade, contribuindo para a concretização dos objetivos de desenvolvimento sustentável.

2.3 Mercado do Biodiesel Proveniente de Resíduo de Óleo de Fritura

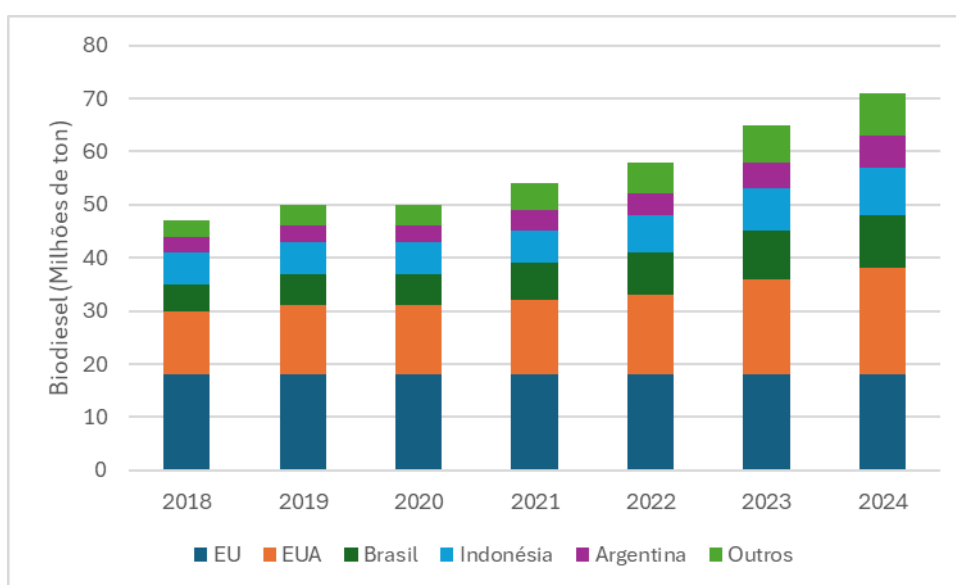
No campo das energias renováveis, o mercado global de biodiesel apresenta um relevante potencial ao experimentar um crescimento notável, impulsionado pelo aumento da demanda por energia e busca por fontes de combustíveis limpos e renováveis (KASIRAJAN, 2021; FERRUSCA *et al.*, 2023). A indústria automobilística em expansão, o aumento do foco no biodiesel devido à crescente conscientização ambiental e a demanda dos consumidores desempenham papéis cruciais nesse crescimento (RESEARCH AND MARKETS, 2023).

Os avanços tecnológicos que introduziram os biocombustíveis e as políticas governamentais favoráveis não apenas incentivam o desenvolvimento sustentável e a conservação de energia, mas também a preservação do meio ambiente. Com esses

impulsionadores, há oportunidades prontas para investidores interessados no mercado de biodiesel (HAFEEZ *et al.*, 2020; AL-MUHTASEB *et al.*, 2021).

Segundo o International Grains Council - IGC (2024), a produção global de biodiesel, incluindo HVO (diesel renovável verde), atingiu um recorde de 71,5 milhões de toneladas em 2023, um aumento de 11% em relação ao ano anterior. Esse crescimento foi impulsionado principalmente pela expansão na América do Norte, América do Sul e Ásia. A União Europeia mantém-se como a maior produtora, embora sua produção tenha se mantido relativamente estável em comparação com o ano anterior (Figura 1).

Figura 1 - Produção de Biodiesel entre os anos de 2018 à 2024



Fonte: Adaptado de International Grains Council, 2024

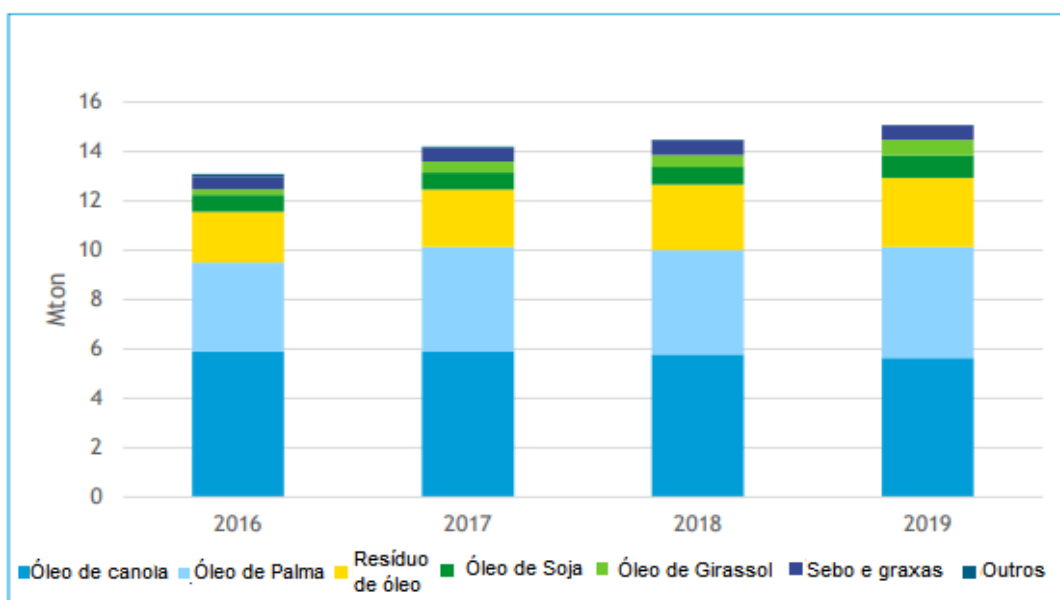
Para 2024, a produção mundial está projetada para alcançar 76,3 milhões de toneladas, representando um incremento de 7% sobre o ano anterior. Nos últimos anos, EUA, Brasil e Indonésia expandiram significativamente suas capacidades de produção, juntos respondendo por quase 60% da produção global de biodiesel, em contraste com apenas 35% há uma década (IGC, 2024; RESEARCH AND MARKETS, 2023).

Com base na matéria-prima, espera-se que o resíduo de óleo ou óleo alimentício usado responda pela maior parte do mercado global de biodiesel. O rápido crescimento deste segmento é atribuído principalmente ao crescimento do setor alimentício e ao crescente emprego de óleo de cozinha usado na produção de biodiesel. Além disso, espera-se que o aumento da consciencialização sobre o bem-estar ambiental e recursos energéticos sustentáveis e a elevada utilização de óleo alimentício usado na China e na Índia estimulem a

procura desta matéria-prima na produção de biodiesel (RESEARCH AND MARKETS, 2023; MARKET RESEARCH FUTURE, 2023; GRANDVIEW RESEARCH, 2023).

Segundo Grinsven *et al.* (2020), 18,5% do biodiesel produzido na União Europeia é produzido a partir de óleo alimentício usado, o que é semelhante à quota de 19% no consumo. Desde 2014, as importações líquidas de óleo alimentício usado para a União Europeia e Reino Unido aumentaram significativamente, tendo a China, Indonésia, Malásia, Rússia, EUA e Arábia Saudita como principais países de origem. Em 2018 quase metade do óleo alimentício usado, que foi utilizado como matéria-prima para produção de biodiesel, foi importado de fora da União Europeia. Essa quantidade aumentou para mais da metade em 2019. Na Figura 2 é possível verificar as matérias-primas utilizadas para obtenção do biodiesel na União Europeia.

Figura 2 - Matérias-primas para produção de Biodiesel na União Europeia.



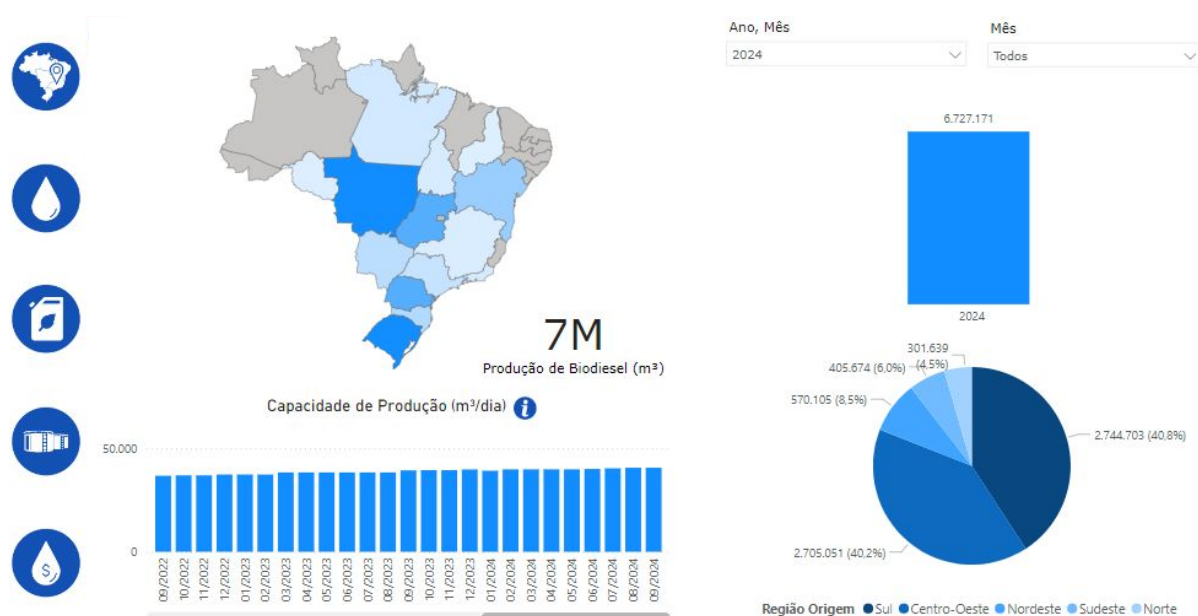
Fonte: Grinsven *et al.* (2020).

De acordo com Claeys *et al.* (2022), quase um quinto de todos os biocombustíveis europeus são produzidos a partir do resíduo de óleo, que também registou o maior crescimento em comparação com quaisquer outras matérias-primas para produção de biodiesel baseadas em biomassa na Europa e na América do Norte nos últimos anos.

Globalmente, 6,6 milhões de toneladas de biocombustível de resíduo de óleo foram consumidas em 2021, representando 5% do mercado total de biocombustíveis. O tamanho do mercado global de resíduo de óleo era de US\$ 6,1 bilhões em 2022 e está projetado para atingir US\$ 8,9 bilhões até 2028, registrando uma CAGR de 6,3% de 2023 a 2028 (GLOBAL INFORMATION, 2023).

Quanto ao mercado brasileiro, de acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás e Biocombustíveis (ANP), o Brasil atingiu em setembro de 2024 a produção de 7 milhões de m³ de biodiesel (Figura 3). Com 57 usinas autorizadas para a produção de biodiesel em 2024, cerca de 60% delas estão localizadas na região Centro-Oeste, que apresenta uma oferta excedente de soja, principal matéria-prima utilizada na produção do biocombustível. O consumo interno de biodiesel é estritamente regulamentado pelo governo brasileiro, sendo influenciado pela taxa obrigatória de mistura de biodiesel no diesel e pelo consumo global de diesel (MORDOR INTELLIGENCE, 2023).

Figura 3 - Painel de Produção de Biodiesel no Brasil por região – setembro/2024.



Fonte: ANP, 2024.

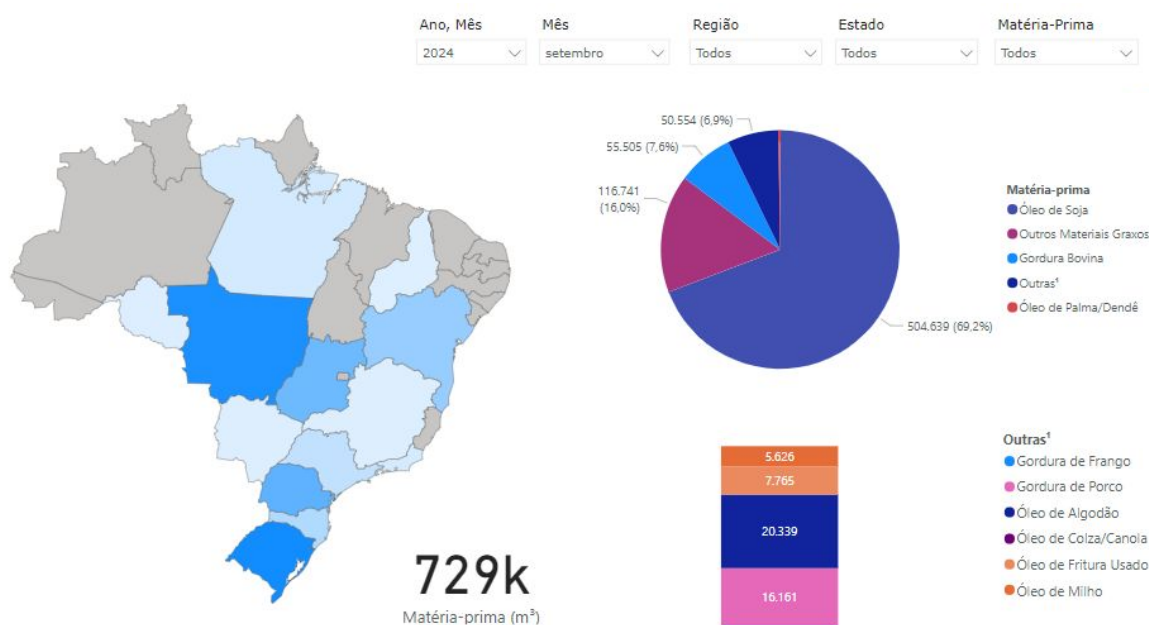
O uso de biodiesel em blendas – combustível de mistura entre o diesel fóssil e biodiesel - é obrigatório no Brasil desde 2008. Em março de 2018, a adição de 10% de biodiesel ao diesel fóssil vendido no território nacional entrou em vigor em cumprimento à Lei 13.263/2016. Assim, esperava-se a adição de 15% de biodiesel na blenda seguindo o estipulado na lei, ou seja, um aumento de 1% ao ano desde 2018.

Todavia, em abril de 2023 foi fixado pelo Conselho Nacional de Políticas Energéticas (CNPE) a taxa de 12% de biodiesel e o aumento para 15% de forma progressiva até 2026, justificado pelo alto custo da matéria-prima, uma vez que o óleo de soja corresponde por mais de 86% da fabricação do biocombustível no Brasil (AGÊNCIA BRASIL, 2023; NAYLOR e HIGGINS, 2018). Como consequência, a produção de biocombustíveis no país atingiu recorde histórico em 2023 (ANP, 2024).

O óleo vegetal tem sido a principal fonte de produção global de biodiesel desde os anos 90 (BI *et al.*, 2015; ANP, 2024). No Brasil, a principal matéria-prima é o óleo de soja, correspondendo a 70,49% do biodiesel produzido (Figura 4) (ANP, 2024). Por outro lado, a principal dificuldade em tornar o biodiesel um combustível competitivo no mercado mundial é o alto custo da matéria-prima.

Atualmente, para o biodiesel à base de óleos vegetais, a matéria-prima é responsável por 70-80% do custo total de produção (NAYLOR e HIGGINS, 2018). Além do custo, o uso de fontes comestíveis para produção de biodiesel causa um dilema devido às suas implicações na segurança alimentar e no preço das commodities (CARNEIRO *et al.*, 2018; GOH *et al.*, 2019). Dessa forma, muitos estudos têm focado no uso de oleaginosas não comestíveis e em óleos residuais para diminuir o custo de obtenção do biodiesel (HAAS *et al.*, 2006; CANAKCI; SANLI, 2008; STACHIW *et al.*, 2016).

Figura 4 - Matérias-primas utilizadas para produção de Biodiesel no Brasil.



Fonte: ANP, 2024.

Segundo a ANP (2024), apenas 1,7% do biodiesel gerado no Brasil em 2023 foi proveniente de resíduo de óleo de fritura. Abiove (2024) afirma que a produção de óleo de soja em 2023 no Brasil foi de 9,8 milhões de toneladas, o que significa que apenas aproximadamente 1,3% do óleo que foi consumido no Brasil foi utilizado para a produção de biodiesel.

Logo, o óleo de cozinha usado representa uma alternativa viável para atender a demanda por biodiesel, além de contribuir para o manejo e destinação adequada desse resíduo

no país. Este processo contribui para a política global de estabelecimento de uma economia circular; além disso, devido à utilização de resíduos como matéria-prima, as categorias de impacto ambiental são afetadas positivamente.

2.4 Produção do Biodiesel

2.4.1 Fatores que Afetam a Produção de Biodiesel

Para a obtenção de biodiesel, é necessária uma análise de diversos fatores que moldam o processo de produção. Nesse contexto, o tipo de álcool, a proporção álcool: óleo apropriada, temperatura de reação, tempo de reação e outros parâmetros são relevantes fatores a se considerar para assegurar não apenas a eficiência do processo, mas também a qualidade do biocombustível resultante.

2.4.1.1 Tipo de álcool

Dentre os álcoois empregados na transesterificação de óleos e gorduras, os mais utilizados são metanol e etanol (LÔBO *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2020; DUARTE *et al.*, 2022). O metanol é mais amplamente aplicado na produção de biodiesel em escala comercial e, por ser mais reativo, implica em menor temperatura e tempo de reação além de apresentar custo inferior quando comparado ao etanol (BASTOS *et al.*, 2020; AL-HAMAMRE & YAMIN, 2014).

O etanol, por sua vez, além de ter produção consolidada no Brasil, é consideravelmente menos tóxico, renovável e produz biodiesel com maior número de cetano e lubricidade (MATHEW *et al.*, 2021). Uma desvantagem do etanol está no fato deste promover uma maior dispersão da glicerina no biodiesel, dificultando a sua separação e demandar maiores proporções para obter um rendimento elevado (LÔBO *et al.*, 2009; MATHEW *et al.*, 2021).

2.4.1.2 Proporção álcool: óleo

O rendimento do biodiesel é significativamente influenciado pela conversão molar do álcool nos triglicerídeos, um fator importante que pode determinar tanto o custo de produção quanto o rendimento final do biodiesel (MATHEW *et al.*, 2021).

No processo de transesterificação, estequiometricamente, 1 mol de triglicerídeos requer 3 mols de álcool (REZANIA *et al.*, 2019; MATHEW *et al.*, 2021). A transesterificação catalisada por álcali, por exemplo, exige uma proporção aproximada de 6:1 M de metanol:óleo para alcançar um rendimento superior a 98% (p/p), sendo essa proporção eficiente para quebrar as ligações ácido graxo-glicerol (MUSA, 2016). Entretanto, ultrapassar essa faixa nem sempre resulta em aumento do rendimento; ao contrário, pode diminuir a atividade do catalisador, prejudicar a separação do glicerol e a conclusão da reação (ROSSET *et al.*, 2017; HIDALGO *et al.*, 2014; FERRUSCA *et al.*, 2023; MATHEW *et al.*, 2021).

Já o uso do etanol requer otimização, com relatos sugerindo uma razão molar de 9:1 (LÔBO *et al.*, 2009; MATHEW *et al.*, 2021). A utilização de etanol derivado de fontes renováveis como a cana-de-açúcar destaca-se como uma abordagem promissora para a produção de biocombustíveis totalmente sustentáveis.

Em casos específicos, como os que utilizam amostras de óleo com alto teor de ácidos graxos livres, catalisadores ácidos podem ser empregados exigindo uma proporção ainda mais elevada de álcool em relação ao catalisador (MATHEW *et al.*, 2021). Por exemplo, Leung e Guo (2006) utilizaram a proporção de 15:1 em reações catalisadas por ácido utilizando óleo de cozinha residual, enquanto Abdulla *et al.* (2022) utilizaram uma proporção de 10:1 na catálise enzimática.

2.4.1.3 Temperatura de reação

A temperatura desempenha um papel importante na eficiência da reação de obtenção do biodiesel e, conseqüentemente, no rendimento dos ésteres obtidos. Elevações na temperatura contribuem para a redução da viscosidade dos óleos, resultando na diminuição do tempo necessário para completar a reação (THANH *et al.*, 2012).

No entanto, é essencial destacar que o aumento excessivo da temperatura pode levar à diminuição do rendimento do biodiesel devido à saponificação acelerada dos triglicerídeos em decorrência das condições térmicas elevadas. Para evitar a evaporação do álcool, geralmente é recomendável manter a temperatura abaixo do ponto de ebulição do álcool (KULKARNI *et al.*, 2006; CARLUCCI *et al.*, 2022).

A faixa ótima de temperaturas situa-se entre 50 °C e 70 °C, sendo essa escolha dependente do tipo de óleo ou gordura a ser processado e do catalisador (FERRUSCA *et al.*, 2023; PAULINE *et al.*, 2021). Essa consideração criteriosa da temperatura é fundamental para alcançar uma produção eficiente e de alta qualidade de biodiesel.

2.4.1.4 Tempo de reação

O tempo de reação é um parâmetro igualmente crucial na produção de biodiesel. Assim como ocorre com a temperatura, a extensão desse período influencia diretamente na taxa de conversão, desempenhando um papel decisivo no resultado da reação (ALANIS *et al.*, 2022).

A duração apropriada do tempo é essencial para o êxito do processo. Se não for concedido tempo suficiente, uma parte do óleo pode permanecer sem reagir, resultando na diminuição do rendimento do éster (MOHIDDIN *et al.*, 2021). Por outro lado, se a duração da reação exceder o tempo ideal, isso não apenas afeta o produto, mas também propicia a formação indesejada de sabão (MATHEW *et al.*, 2021).

Diferentes intervalos de tempo são reportados para óleos e catalisadores específicos. Por exemplo, para catálise alcalina Ouanji *et al.* (2017) utilizaram resíduo de óleo e obtiveram um rendimento de 92% após 1 hora de reação; Parandi *et al.* (2022) obtiveram um rendimento de 96% após 30 horas de reação catalisada enzimaticamente. Já Abdulla *et al.* (2022) obtiveram um rendimento de 85,7% após 32 horas de reação via catálise enzimática. Utilizando a mesma via de reação, Gong *et al.* (2020), após 9 horas de reação, obtiveram um rendimento de 80%. Portanto, a gestão cuidadosa desse parâmetro é imperativa para assegurar a eficiência da produção e a qualidade do biodiesel resultante.

2.5 Processos de Produção do Biodiesel

Existem basicamente quatro processos para a produção de biodiesel: craqueamento térmico (pirólise), esterificação, transesterificação e biocatálise (SALUM *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2017), descritos nos tópicos a seguir.

2.5.1 Pirólise

O craqueamento térmico, também conhecido como pirólise, consiste no processo de quebra das cadeias carbônicas do óleo de origem animal ou vegetal pelo aumento da temperatura do sistema, resultando em uma mistura de compostos constituída, em sua maioria, por hidrocarbonetos lineares (FANSLAU *et al.*, 2020).

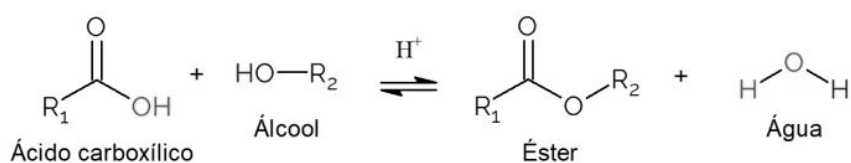
Embora o produto do processo de pirólise possua propriedades muito semelhantes às do diesel de petróleo, esse processo ainda possui custo elevado. Além disso, geram-se

moléculas oxigenadas de elevada acidez, exigindo novas reações para especificar o produto (ABBASZAADEH *et al.*, 2012; BACHAPATTANASAKDA *et al.*, 2023).

2.5.2 Esterificação

O processo de esterificação de ácidos graxos é considerado uma rota tecnológica para matérias-primas de alta acidez. A obtenção do biodiesel pelo processo de esterificação consiste na reação entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador ácido como o ácido clorídrico (Figura 5). Porém, esta reação é lenta e requer diversos dias para alcançar o equilíbrio em condições típicas da reação e por isso ela é geralmente usada como pré-tratamento de matérias-primas lipídicas com alto teor de AGL (ácidos graxos livres) como o resíduo de óleo de cozinha (AL-MUHTASEB *et al.*, 2021).

Figura 5 - Reação de esterificação de um triglicerídeo.

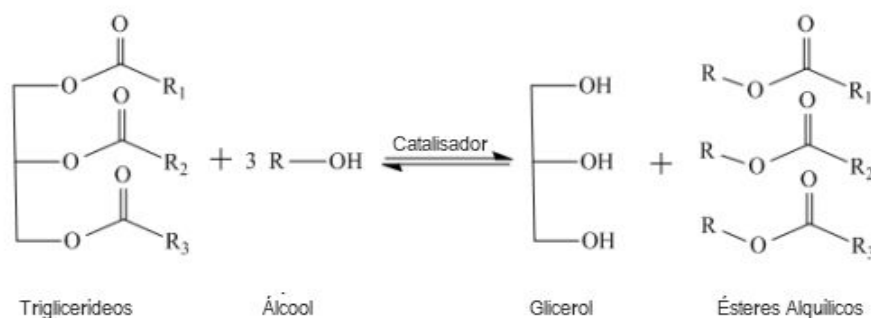


Fonte: Própria

2.5.3 Transesterificação

O principal método de produção do biodiesel é a transesterificação, também conhecido como catálise alcalina. Neste processo, o triacilglicerol reage com o álcool, usualmente o metanol ou o etanol, na presença de um catalisador básico como o hidróxido de sódio ou o hidróxido de potássio (Figura 6) (REZANIA *et al.*, 2019).

Figura 6 - Reação de transesterificação de um triglicerídeo.



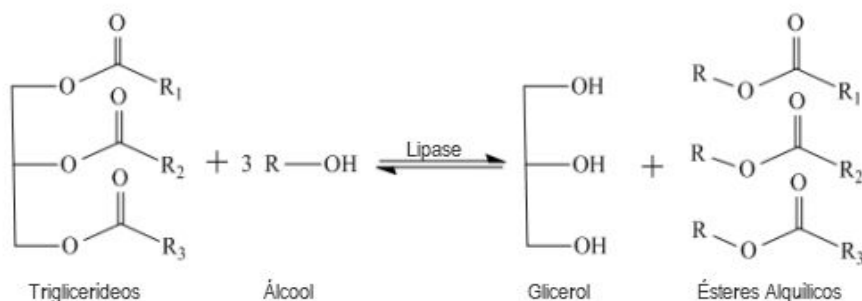
Fonte: Própria

O processo de transesterificação, apesar de proporcionar elevados índices de conversão, apresenta uma série de desvantagens, como a geração de grande quantidade de efluentes alcalinos, a necessidade da utilização de óleos com baixa acidez, um alto consumo energético e a produção de um glicerol de baixa qualidade e de difícil recuperação (SALUM *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2017).

2.5.4 Biocatálise

A biocatálise, por sua vez, consiste na utilização de um biocatalisador para a produção de biodiesel. Nesse caso, os biocatalisadores empregados em processos enzimáticos são as lipases, enzimas cuja função biológica é a de catalisar a hidrólise de gorduras e óleos, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (AVHAD *et al.*, 2019). Na Figura 7 é possível observar a reação de transesterificação catalisada por lipase.

Figura 7 - Reação de transesterificação enzimática do triglicerídeo.



Fonte: Própria

As lipases apresentam vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos, como a especificidade, a regioseletividade e a enantioseletividade, que permitem a catálise de

reações com um número reduzido de subprodutos, com baixo custo no tratamento de resíduos, atuação em condições brandas de temperatura e pressão (ZANOTTO *et al.*, 2009; MOHIDDIN *et al.*, 2021). Além disso, a habilidade da lipase em manter sua atividade catalítica em meio não aquoso torna possível seu uso na produção de biodiesel (RAMOS *et al.*, 2017).

A utilização da lipase no processo de biocatálise para produção de biodiesel tem um potencial significativo quando comparado aos métodos de catálise química pois não exige operações complexas para recuperação do glicerol. Além disso, há a eliminação do catalisador químico, possibilidade de utilizar óleo de elevados teores de ácidos graxos sem prévio tratamento, além de permitir que se evitem etapas de purificação (MANDARI *et al.*, 2021).

Comparando o processo enzimático com o químico é possível observar que processo biocatalítico requer menor gasto energético com temperaturas elevadas, os produtos são mais facilmente recuperados, e a glicerina, subproduto do processo, é separada mais eficientemente.

Porém, o custo para a obtenção de lipases ainda é consideravelmente maior que o valor dos catalisadores químicos, sendo a obtenção de lipases a partir de fungos uma alternativa para redução do custo de produção, pois além desses microrganismos apresentarem potencial metabólico para a produção extracelular dessa enzima, são capazes de utilizar resíduos como substrato para sua produção (MARDER *et al.*, 2008; BAJAJ *et al.*, 2010).

2.6 Lipases

As lipases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases (triacilglicerolacil hidrolases, E.C.3.1.1.3), sendo a principal função catalisar a hidrólise de longas cadeias de triacilglicerídeos. As lipases possuem também a capacidade de catalisar reações de síntese, como de esterificação e interesterificação (CARVALHO *et al.*, 2014; VAZ; CHOUPINA, 2012), além de demonstrarem níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, favorecendo a catálise de reações como esterificação e transesterificação (PASTORE *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2008; MAROTTI *et al.*, 2017).

Para se ter uma ideia da importância das lipases, O mercado destas enzimas foi estimado em US\$ 448,78 milhões para 2024, devendo atingir US\$ 645,18 milhões até 2029, com uma taxa anual de crescimento de 7,53% (MORDOR INTELLIGENCE, 2023). Este crescimento é relacionado à ampla aplicabilidade industrial, atuando em setores como alimentício (fermentação de queijo e iogurte, panificação), detergentes e biocombustíveis, sendo de importância o estudo de novas fontes para acompanhar esta demanda (GRANDVIEW RESEARCH, 2020).

As lipases podem ser de origem vegetal, animal (pancreática, hepática e gástrica) e microbiana (bactérias e fungos), sendo a microbiana a fonte preferida para a produção de enzimas industriais, tendo em vista o tempo de crescimento curto, relativa simplicidade na manipulação genética e nas condições de cultivo, além de apresentarem uma versatilidade com relação às condições ambientais (RIBEIRO *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Segundo Marotti (2017), dentre os microrganismos produtores de lipase, os fungos filamentosos pertencentes às várias espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Trichoderma* são descritos como produtores de lipases ligadas ao micélio. Além disso, as leveduras do gênero *Candida*, bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* também se destacam como bons produtores desta enzima (SILVA *et al.*, 2016).

De acordo com Salihu *et al.* (2012) e Chandra *et al.* (2020), as lipases fúngicas possuem vantagens sobre as lipases bacterianas, pois apresentam baixo custo de extração, estabilidade térmica e atuam em uma ampla faixa de pH. Dentre os fungos produtores de lipase, estão os fungos endofíticos.

Os fungos endofíticos são microrganismos que habitam os tecidos internos de plantas, sendo encontrados em folhas, ramos e raízes sem causar efeito negativo aparente ao hospedeiro. Estes microrganismos possuem um papel importante no crescimento e saúde do hospedeiro, principalmente através da produção de metabólitos bioativos com inúmeras atividades biológicas já relatadas (NISA *et al.*, 2015; SUDHA *et al.*, 2016; MARTINEZ-KLIMOVA *et al.*, 2017; MATIAS *et al.*, 2022).

Além de induzir a produção no hospedeiro, os fungos endofíticos destacam-se como fontes promissoras de substâncias naturais e são capazes de produzir uma variedade de importantes metabólitos secundários bioativos, incluindo enzimas (CHAPLA *et al.*, 2013; SOARES; PIMENTA, 2015; SILVA *et al.*, 2020; MATIAS *et al.*, 2021; BATISTA *et al.*, 2022). Dentre os fungos endofíticos já estudados, destaca-se o *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC como um excelente produtor de lipase (MATIAS *et al.*, 2022). Este fungo, pertencente à família Botryosphaeriaceae é taxonomicamente próximo da espécie *Endomelanconiopsis microsporum* (ROJAS *et al.*, 2008; CARVALHO NETO, 2013).

Pesquisas anteriores identificaram o potencial metabólico de *E. endophytica*, incluindo a produção de metabólitos secundários, como os xilocetais (SUN *et al.*, 2016). Carvalho Neto (2013) destacou a capacidade lipolítica de um isolado de *E. endophytica* proveniente de *Aniba rosaeodora*, atingindo uma atividade enzimática de 1.821 U/mL.

Matias *et al.* (2022) reforçaram o potencial biotecnológico do *E. endophytica* ao isolá-lo da *Aniba canelilla* e demonstrar alta produção de lipase. O isolamento foi realizado em meios seletivos contendo substratos lipídicos, com a atividade lipolítica avaliada

qualitativamente pela formação de halos de hidrólise em placas com tributirina, confirmando a capacidade enzimática. Para garantir a preservação e continuidade de estudos futuros, o isolado foi depositado na Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CCM-UEA), destacando-se como um recurso valioso para aplicações industriais e científicas.

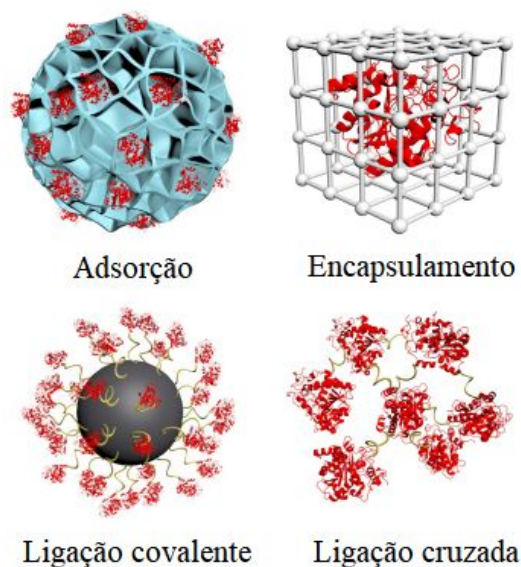
Apesar do potencial de aplicação de lipases fúngicas na produção de biodiesel, do ponto de vista prático há algumas dificuldades técnicas, além do elevado custo das enzimas comerciais, como a contaminação do produto com atividade enzimática residual indesejável (BAJAJ *et al.*, 2010; MATIAS *et al.*, 2022; FERRUSCA *et al.*, 2023). A imobilização das enzimas pode solucionar estes problemas ao permitir a retirada da enzima do produto sem contaminá-lo, além de possibilitar a reutilização dos biocatalisadores por vários ciclos de reação, diminuindo o custo (AL-SUHAIR, 2007; GIRALDO *et al.*, 2023; BRANDÃO JR. *et al.*, 2023).

2.7 Imobilização de Lipases

Tem-se com a imobilização enzimática uma alternativa que permite a reutilização das enzimas em processos industriais. Porém, permitir a reutilização da enzima não é o único objetivo da imobilização, uma ferramenta poderosa para melhorar muitas propriedades enzimáticas, como a estabilidade, seletividade, estabilidade da atividade específica e a resistência a inibidores (CIPOLATTI *et al.*, 2016).

Os materiais convencionais utilizados como suportes para a imobilização de enzimas são tipicamente no tamanho micro. Nos últimos anos, os materiais nanoestruturados receberam extensa atenção para aplicação em biossensores, biocatálise, mitigação de poluição, medicamentos, entre outros (ZHONG *et al.*, 2020). A imobilização pode ocorrer de diversas maneiras, como por exemplo, por adsorção, ligação covalente, encapsulamento e ligação cruzada (Figura 8).

Figura 8 - Tipos de imobilização enzimática.



Fonte: ZHONG *et al.*, 2020.

A adsorção é o método mais simples e comum de imobilização. A enzima é imobilizada no suporte por interações como forças da van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Devido às interações fracas, o método de adsorção geralmente exibe problemas de vazamento da enzima. Os processos de adsorção são comumente aplicados a suportes porosos, devido à sua grande área de superfície específica (ARUMUGAN *et al.*, 2018; ZHONG *et al.*, 2020). A presença de estruturas porosas pode capturar enzimas de maneira eficiente e minimizar o vazamento, bem como proteger as moléculas de enzima de condições desnaturantes externas. Estudos como de Manoel *et al.* (2015) e Hernandez e Fernandez-Lafuente (2011) têm demonstrado que a imobilização da lipase por adsorção, devido à hidrofobicidade, é uma técnica rápida e eficaz.

Na imobilização covalente, a enzima é ligada covalentemente ao suporte por grupos funcionais presentes na superfície. A imobilização covalente é uma forte ligação química que garante alta adesão das lipases aos suportes, sem vazamento ou vazamento insignificante. A ligação covalente geralmente não ocorre espontaneamente e requer processamento adicional das enzimas ou suportes para obter um grupo funcional. Reagentes bifuncionais como o glutaraldeído são comumente usados para a imobilização covalente de enzimas. O glutaraldeído pode ser covalentemente ligado ao grupo amino no suporte e na enzima sob condições moderadas (GARCIA-GALÁN *et al.*, 2011) e pode aumentar a hidrofobicidade dos suportes utilizados na imobilização (MENDES *et al.*, 2011).

A imobilização por encapsulamento normalmente incorpora a enzima em um suporte poroso por um método de co-precipitação. Este método raramente tem o problema de

vazamento de enzimas. O encapsulamento tem boa compatibilidade com as enzimas, e este método é geralmente mais simples e rápido (ADNAN *et al.*, 2018). Portanto, este método pode ser considerado altamente adequado para imobilização em diferentes suportes. No entanto, a alta resistência à transferência de massa é um problema inevitável na imobilização por encapsulamento (GKANIATSOU *et al.*, 2017).

Já na imobilização por ligações cruzadas, as enzimas são interconectadas por agentes de reticulação como o glutaraldeído. A principal vantagem da ligação cruzada é a formação de múltiplas ligações covalentes dentro ou entre as moléculas de enzima. Geralmente, o uso simultâneo da ligação cruzada e outros métodos de imobilização pode melhorar significativamente o desempenho catalítico das enzimas (MEHDE *et al.*, 2018).

2.7.1 Suportes para Imobilização de Enzimas

Para a seleção dos suportes, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo. Eles podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel (FREITAS *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2011).

Dentre os suportes estudados, os nanomateriais têm ganhado destaque na imobilização de enzimas. Comparado com os materiais tradicionais, os nanomateriais surgiram como suportes novos e promissores para imobilização enzimática devido à grande área de superfície específica, baixa resistência à transferência de massa, capacidade de carga superior e muitas outras vantagens. Dentro dos nanomateriais estão as nanopartículas magnéticas, polímeros, quitosana e sílica (CIPOLATTI *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2020).

Existem muitos estudos sobre a imobilização de lipases, como por exemplo o de Nouredini *et al.* (1998), onde foi investigada a ação da lipase livre e imobilizada em processos de transesterificação de óleo de soja com metanol e etanol. A lipase imobilizada, além de apresentar melhores resultados, foi constantemente mais ativa do que a livre e mais estável, apresentando maiores condições de reutilização no processo e perdendo pouca atividade quando submetida a usos repetitivos.

Marder *et al.* (2008) imobilizaram lipase em hidrogel e obtiveram resultados satisfatórios, principalmente após 24 horas de reação. Menoncin *et al.* (2009) imobilizaram a

enzima utilizando o princípio de adsorção em dois suportes: resina polimérica (Accurel EP 100) e carvão ativo ANF® (Carvorite – Irati/PR). Os autores verificaram que a lipase imobilizada em carvão ativo apresentou valores de atividade específica superiores aos obtidos com a utilização de Accurel EP 1000 como suporte.

Xie e Ma (2009) utilizaram nanopartículas magnéticas com adição de glutaraldeído e amino silano para imobilizar lipase de *Thermomyces lanuginosa*. Os resultados obtidos mostraram que com a lipase imobilizada recuperou-se 70% da atividade, com 84% de eficiência de imobilização, podendo ser aplicada para produção de biodiesel a partir do óleo de soja.

Mais recentemente, Arumugam *et al.* (2018) imobilizaram a lipase de *Havea brasiliensis* em nanoaerogéis esféricos para produzir biodiesel. O biocatalisador imobilizado mostrou uma alta taxa de conversão de biodiesel (93%) e conseguiu preservar 90% de sua atividade inicial após 10 ciclos consecutivos.

Rhomdane *et al.* (2013) avaliaram o uso de lipase de *Talaromyces thermophilus* imobilizada em quitosana para produção de biodiesel a partir de resíduo de óleo de fritura. Eles obtiveram uma enzima estável e com uma conversão de 98% em biodiesel em 5 horas de reação. Brandão Jr *et al.* (2023) imobilizaram a lipase comercial Eversa® em nanopartículas magnéticas e obtiveram um rendimento de 86% quando utilizado óleo de tucumã com reaproveitamento de 3 ciclos. No estudo de Guzmán-Martinez *et al.* (2022) a lipase comercial de *Candida antartica* foi imobilizada em alginato de cálcio para realizar a transesterificação enzimática do óleo de *Jatropha curcas*, obtendo uma conversão de 95% em ésteres etílicos.

Portanto, verifica-se que o uso da imobilização de lipases é uma estratégia interessante para aumentar a eficiência do processo catalítico na obtenção de biodiesel, o que auxilia também na redução dos custos de produção. Assim, no presente trabalho, optou-se por investigar a aplicação de dois tipos de suporte (alginato de cálcio e nanopartículas magnéticas) na imobilização de lipase produzida pelo fungo endofítico *E. endophytica*, visando a obtenção de biodiesel a partir do resíduo de óleo de fritura e etanol.

2.7.2 Imobilização Enzimática para a Produção de Biodiesel

Informações específicas sobre empresas que utilizam lipases imobilizadas na produção de biodiesel são escassas. Contudo, estudos conduzidos por instituições acadêmicas na China evidenciam avanços significativos nesse campo. Um exemplo notável é a pesquisa realizada pela Escola de Química e Engenharia Química da Henan, que investigou o uso de lipase imobilizada em compósitos estruturados com $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIL-100}(\text{Fe})$ para a produção de

biodiesel. O estudo alcançou uma taxa de conversão de 92,3%, demonstrando a viabilidade técnica do processo enzimático para essa aplicação (XIE; HUANG, 2019).

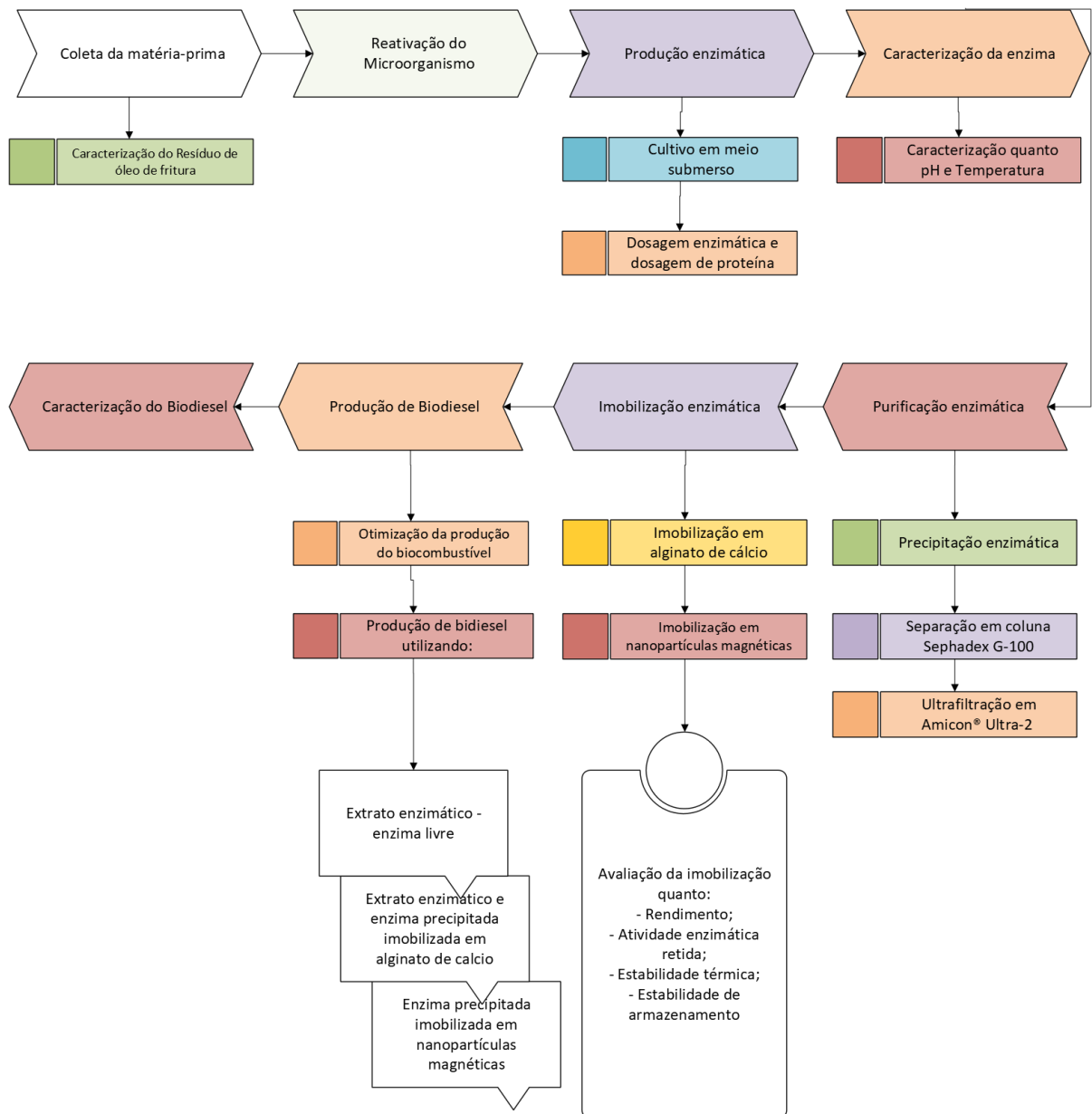
Adicionalmente, uma revisão conduzida pela Universidade de Nottingham Ningbo na China destacou patentes e tecnologias recentes envolvendo a transesterificação catalisada por lipase para a produção de biodiesel (XIA *et al.* 2024). Verifica-se, portanto, o papel ativo da pesquisa chinesa no avanço de tecnologias baseadas em biocatálise para a obtenção de combustíveis renováveis.

Embora as aplicações comerciais diretas de lipases imobilizadas ainda não estejam amplamente documentadas, a China está investindo significativamente no desenvolvimento de métodos enzimáticos para a produção de biodiesel. Esses esforços têm o potencial de impulsionar a adoção industrial dessa tecnologia no futuro, contribuindo para uma matriz energética mais sustentável em todo o mundo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 9 apresenta um fluxograma ilustrativo que detalha a metodologia empregada no desenvolvimento deste trabalho.

Figura 9 - Fluxograma ilustrativo da metodologia empregada no desenvolvimento deste trabalho.



3.1 Microrganismo

O fungo endofítico utilizado neste trabalho, identificado como *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC foi isolado de folhas da espécie *Aniba canelilla* (Lauraceae) por Matias (2022) e está depositado na Central de Coleções Microbiológicas (CCM) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). O microrganismo está mantido em Ágar Batata Dextrose (BDA) e sua reativação foi realizada no mesmo meio, em placas de Petri, sob incubação em BOD a 30 °C durante 11 dias.

3.2 Matéria-prima Vegetal

O resíduo de óleo de fritura utilizado neste trabalho foi cedido por um restaurante localizado na cidade de Manaus. O resíduo foi coletado em volume suficiente para realização de todos os experimentos, filtrado em peneira simples para retirada de sólidos e armazenado em bombonas.

O óleo de soja, utilizado para fins de comparação, foi adquirido comercialmente com o mesmo número de lote de produção e em quantidade suficiente para realização de todos os experimentos.

3.2.1 Pré-tratamento do Resíduo de Óleo de Fritura

O resíduo de óleo de fritura, previamente filtrado em peneira, foi submetido a pré-tratamento. O resíduo foi filtrado a vácuo e em seguida, 80 g do óleo filtrado foram aquecidos a 55 °C em chapa aquecedora. Gradualmente, foram adicionados 8 g de NaOH 1,5M sob constante agitação. Após 30 minutos de reação, uma amostra foi retirada e centrifugada por 5 min a 4000 rpm, resultando em três fases distintas. A fase oleosa foi cuidadosamente separada e armazenada para a determinação do índice de acidez (ROVERE, 2020; PRADO *et al.*, 2014). O resíduo de óleo de fritura pré-tratado foi utilizado na produção de biodiesel para fins de comparação com o resíduo de óleo não tratado.

3.3 Caracterização Físico-química do Resíduo de Óleo de Fritura e do Óleo de Soja

3.3.1 Determinação da Gravidade Específica

A gravidade específica foi determinada utilizando um picnômetro de vidro, cujo peso é obtido quando vazio (m_1), e contendo a amostra até completar todo o volume da tampa do capilar (m_2). Em seguida, o picnômetro foi pesado contendo água destilada (m_3), uma vez que a água é utilizada como líquido padrão de referência na determinação de densidade relativa de líquidos. A gravidade específica foi então determinada utilizando a Equação 1 (AOCS Cc 10a-25, 1990), sendo $m_{amostra} = m_2 - m_1$ e a $m_{água} = m_3 - m_1$.

$$\rho = \frac{m_{amostra}}{m_{água}} (1)$$

3.3.2 Determinação do Índice de Acidez

A determinação do índice de acidez consistiu na pesagem de 5 g de cada amostra, seguida da homogeneização em solução de éter: álcool (2:1 v/v) e titulação utilizando solução de hidróxido de potássio 0,1 M, previamente padronizada (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

$$\text{Índice de acidez} \left(\text{mg} \frac{\text{KOH}}{\text{g}} \right) = \frac{(A - B) \times M_{\text{KOH}} \times P_{\text{KOH}} \times f_{\text{KOH}}}{m_{\text{amostra}}}$$

(2)

Onde:

A – Volume de KOH usado na titulação da amostra em mL;

B – Volume de KOH usado na titulação do branco em mL;

M – Molaridade da solução de KOH (0,1 M)

P – Peso molecular do KOH (56,1 g/mol)

f – fator de correção do KOH

m – Massa da amostra em g

3.3.3 Determinação do Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos é definido como a medida do conteúdo de oxigênio reativo em termos de miliequivalentes de peróxidos por 1000 g de gordura. O método determina todas as substâncias com capacidade de oxidar o iodeto de potássio.

Aproximadamente 5 g da amostra foram dissolvidas em 30 mL da solução ácido acético-clorofórmio 3:2 seguido da adição de solução de KI e armazenamento por 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, foi acrescentado 30 mL de água e a mistura titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N ou 0,01 N com constante agitação. A titulação segue até o quase desaparecimento da coloração amarela e foram adicionados 0,5 mL de solução indicadora de amido até o completo desaparecimento da coloração azul (AOCS Cd 8-53, 1990).

$$\text{Índice de peróxido} (\text{meq}/1000 \text{ g}) = \frac{(A - B) \times M \times f \times 1000}{P}$$

(3)

Onde:

A – Volume de tiosulfato de sódio a 0,1 M usado na titulação da amostra em mL;

B – Volume de tiosulfato de sódio a 0,1 M usado na titulação do branco em mL;

M – Molaridade da solução de tiosulfato de sódio (0,1 M)

f – fator de correção do KOH

P – Massa da amostra em g

3.3.4 Determinação do Índice de Saponificação

O índice de saponificação é a massa em miligramas de KOH que neutraliza os ácidos graxos livres obtidos por hidrólise de 1 g de óleo (AOCS Cd 3-25, 1990). Em aproximadamente 5 g de amostra foram adicionados 50 mL da solução alcoólica de KOH. A solução foi fervida suavemente para que houvesse a completa saponificação da amostra. Após o resfriamento do frasco, adicionou-se 1 mL do indicador e titulou-se com a solução de ácido clorídrico 0,5 M até o desaparecimento da cor rósea.

$$\text{Índice de saponificação} \left(\text{mg} \frac{\text{KOH}}{\text{g}} \right) = \frac{(B-A) \times M_{\text{HCl}} \times P_{\text{HCl}} \times f_{\text{HCl}}}{m_{\text{amostra}}}$$

(4)

Onde:

A – Volume de HCl usado na titulação da amostra em mL;

B – Volume de HCl usado na titulação do branco em mL;

M – Molaridade da solução de HCl (0,1 M)

P – Peso molecular do HCl (56,1 g/mol)

f – fator de correção do HCl

m – Massa da amostra em g

3.4 Produção de Lipase

O fungo foi cultivado em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido composto por NH_2NO_3 (1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,6 g/L), KH_2PO_4 (1,0 g/L), peptona (20 g/L) e óleo de oliva (1,0%), pH 6,0 (GURGEL *et al.*, 2020). A partir da placa contendo o fungo *E. endophytica* reativado em BDA foram retirados três discos miceliais (5 mm de diâmetro) e transferidos para os erlenmeyers contendo o meio líquido. Os frascos foram incubados em

shaker (Tecnal, TE-4200) por 7 dias a 28 °C sob agitação de 160 rpm, sendo conduzidos em triplicata. A cada 24 horas, alíquotas de 1 mL foram retiradas e filtradas para posterior medição da atividade enzimática.

A partir da determinação da atividade enzimática ao longo do tempo de cultivo, foi definido o tempo de produção de lipase, ou seja, o tempo de cultivo para que o fungo produzisse a maior atividade enzimática. De posse desses resultados, o cultivo foi realizado em maior volume (5 L de meio), mantendo-se as condições reacionais a fim de se ter extrato enzimático suficiente para a etapa de purificação enzimática, imobilização e produção de biodiesel.

3.5 Determinação da Atividade Enzimática de Lipase

A atividade lipolítica foi quantificada de acordo com a metodologia de Winkler e Stuckmann (1979), onde uma emulsão do substrato palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP) foi preparada pela adição, gota a gota, de 1 mL da solução A (30 mg de pNPP dissolvidos em 10 mL de isopropanol) em 9 mL da solução B (0,4 g de Triton X-100; 0,1 g de goma arábica e 90 mL de Tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,0) sob intensa agitação.

A emulsão obtida e as amostras foram estabilizadas durante 5 min a 37 °C. 0,2 mL do sobrenadante foram transferidos a 1,8 mL da emulsão de substrato e a mistura foi incubada por 15 min a 40 °C. A absorbância das misturas foi mensurada em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu) a 410 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1,0 µmol de *p*-nitrofenol por minuto sob essas condições (PEREIRA *et al.*, 2015; TOMBINI, 2015).

O cálculo da atividade enzimática foi realizado segundo a Equação 5:

$$\text{Atividade enzimática} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{|x| 10 \times 10^6 \times 4}{12276} (5)$$

Onde:

Abs: Absorbância após 15 min de reação, obtida à 410 nm

10: fator de diluição da enzima no meio reacional

10⁶: unidades do substrato produzidas no tempo de ensaio (µmol)

4: fator para converter a atividade lipolítica por hora

12276: coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol (ε)

3.6 Determinação da Concentração de Proteínas

A concentração de proteínas presente no extrato enzimático foi determinada conforme o método de Bradford (1976), onde 100 µL de extrato enzimático foi misturado com 1000 µL de reativo de Bradford, seguido da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. Foi utilizada a albumina serina bovina (BSA) como padrão.

3.7 Caracterização da Enzima

A caracterização da lipase fúngica foi realizada conforme metodologia de Dantas (2017), com modificações. Para a determinação do pH ótimo da reação lipolítica, a atividade enzimática foi dosada em diferentes faixas de pH, a partir do uso de diferentes soluções tampão: tampão citrato 50 mM (pH 5,0; 6,0); tampão fosfato de sódio (pH 7,0, 7,8 e 8,5); e tampão carbonato de sódio 50 mM (pH 9,0, 10,0 e 10,7) conforme descrito anteriormente (item 3.5).

A determinação da temperatura ótima foi avaliada após a reação enzimática ser submetida à incubação sob diferentes temperaturas (37, 40, 45, 50, 60, 65, 75 e 80°C). Após o tempo de incubação, a atividade enzimática foi avaliada.

3.8 Purificação do Extrato Enzimático

3.8.1 Precipitação

Foram avaliadas três metodologias para a precipitação do extrato enzimático: com sulfato de amônio (SAINI *et al.*, 2016), etanol (COSTA *et al.*, 2018) e acetona (YAMASAKI *et al.*, 1977 com modificações).

3.8.1.1 Precipitação com Sulfato de Amônio

No ensaio com sulfato de amônio foram avaliadas diferentes concentrações de saturação do sal (0-20%, 0-40% e 40-70%) para a obtenção de um precipitado e um sobrenadante, do qual foram realizadas as quantificações de proteína e de atividade enzimática.

No ensaio de 0-20% de saturação, foram misturados 6,78 g de sulfato de amônio triturado a 60 mL de extrato enzimático filtrado. Após a dissolução, o material foi centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos, sendo o sobrenadante coletado e o precipitado

ressuspenso em 10 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 6,0. A solução contendo o precipitado foi submetida à diálise para remoção dos vestígios de sulfato, utilizando o mesmo tampão. A cada 4 horas foram feitas trocas do tampão, sendo 3 trocas ao total.

Para a faixa de saturação de 0-40% e de 40-70% foram adicionados 24,2 g de sulfato de amônio triturado a 100 mL de extrato enzimático para se obter a saturação de 40%. Em seguida o material foi centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspenso com 10 mL de tampão acetato de sódio, 0,05 M, pH 6,0.

Após a quantificação da concentração de proteína e atividades enzimáticas das frações obtidas (extrato filtrado, sobrenadante e precipitado), foi realizada uma segunda precipitação (saturação 40-70%) com a fração que apresentou atividade enzimática. Nesta etapa foram adicionados 20,2 g de sulfato de amônio triturado a 100 mL da fração. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspenso em 10 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 6,0. O sobrenadante e o precipitado foram submetidos à avaliação da atividade enzimática e à quantificação da concentração de proteínas. A fração detentora da atividade lipolítica foi dialisada com o mesmo tampão e nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.8.1.2 Precipitação com Etanol

No ensaio de precipitação utilizando etanol, com auxílio de bureta, foram adicionados 90 mL de etanol 99% a 2 mL/min em 10 mL de extrato enzimático em banho de gelo. Após adição do etanol, a mistura foi transferida para tubos Falcon e deixada em freezer a -18 °C por duas horas. Após o período, centrifugou-se a mistura a 4000 rpm durante 15 minutos, seguido da dissolução do precipitado com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 6,0. Na sequência, foram realizadas as quantificações da concentração de proteínas e atividade enzimática.

3.8.1.3 Precipitação com Acetona

Na precipitação com acetona foram adicionados, com auxílio de bureta, 80 mL de acetona a 2 mL/min em 20 mL de extrato enzimático em banho de gelo. Após adição de acetona, a mistura foi transferida para tubos Falcon e deixada em freezer a -18 °C durante duas horas. Após este período, centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 minutos, seguido da dissolução do precipitado com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 6,0. Na sequência, foram realizadas as quantificações de concentração de proteínas e atividade enzimática.

3.8.2 Purificação em Coluna

O extrato enzimático precipitado foi purificado com o uso da resina Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich). O extrato enzimático foi injetado na coluna empacotada com a resina, pré-equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 7,0. A amostra foi eluída com o mesmo tampão sob fluxo de 1 mL/min. Frações de 1,0 mL foram coletadas e submetidas a dosagem da atividade enzimática e da concentração de proteínas (MANERA *et al.*, 2011; SHETTY, 2016).

3.8.3 Purificação por Ultrafiltração

O extrato enzimático precipitado também foi submetido à purificação utilizando sistema de ultrafiltração Amicon® Ultra-2 (Millipore, 3-100kDa) combinado a filtro para seringa Chromafil Xtra PES 25mm 0,45 µm (Macherey-Nagel (NM)).

Amostras de 2 mL do extrato precipitado foram transferidas ao cartucho do sistema de ultrafiltração e o cartucho foi devidamente fechado para centrifugação a 4000 rpm durante 30 minutos. A primeira fração obtida após esta etapa, denominada “fração filtrada” foi coletada e o cartucho novamente fechado para ser novamente filtrado. Antes da centrifugação (2 min a 1000 rpm) é necessário inverter o sistema de ultrafiltração a fim de coletar a “fração purificada”, sendo o rendimento final de 70 µL do precipitado conforme descrito pelo fabricante. Ambas as frações obtidas (“filtrada” e “purificada”) foram submetidas aos ensaios de quantificação da concentração de proteínas e atividade lipolítica.

3.8.4 Atividade Específica, Porcentagem de Recuperação e Fator de Purificação

As frações obtidas ao longo das etapas de purificação foram avaliadas quanto à Atividade Específica (AE), que relaciona a atividade lipolítica e a concentração de proteínas presentes na fração. Calculou-se ainda a Porcentagem de Recuperação (R), referente à porcentagem da enzima recuperada em relação à atividade detectada antes da purificação e o Fator de Purificação (FP), que relaciona as atividades específicas antes e após a purificação, conforme as equações abaixo 6, 7 e 8, respectivamente (BATISTA, 2022):

$$AE = \frac{Ap}{Cpp} (6) \quad R(\%) = \frac{Ap}{Aa} \times 100 (7) \quad FP = \frac{\frac{Ap}{Cpp}}{\frac{Aa}{Cp}} (8)$$

Onde:

Ap - Atividade enzimática obtida após a purificação (U/mL)

C_{pp} – Concentração proteica após a purificação (mg)

Aa – Atividade enzimática antes da purificação (U/mL)

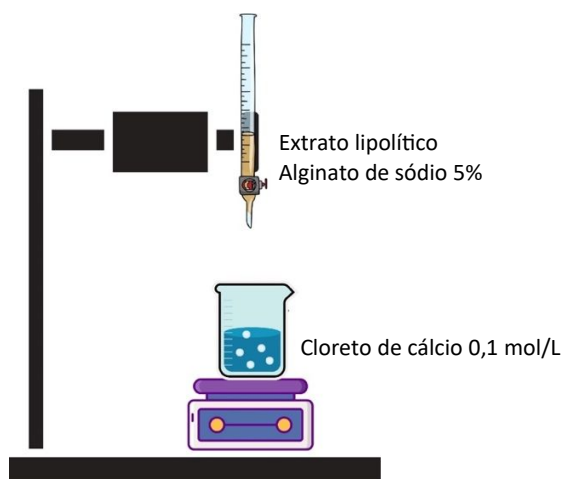
C_p – Concentração proteica antes da purificação (mg)

3.9 Imobilização Enzimática

3.9.1 Imobilização em Alginato de Cálcio

Para imobilização em alginato de cálcio, o extrato lipolítico (7673 U/mL) foi adicionado em 50 mL de solução de alginato de sódio 5%. Após homogeneização manual com bastão de polietileno, as partículas foram produzidas por gotejamento da solução aquosa de alginato de sódio em solução gelificante de cloreto de cálcio 0,1 M, com vazão de 3,0 mL/min, altura de queda de 24 cm e tempo de imersão das partículas de 1 hora (Figura 10) (TEXEIRA, 2011).

Figura 10 - Ilustração do sistema utilizado para a imobilização do extrato lipolítico de *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC em esferas de alginato de cálcio.



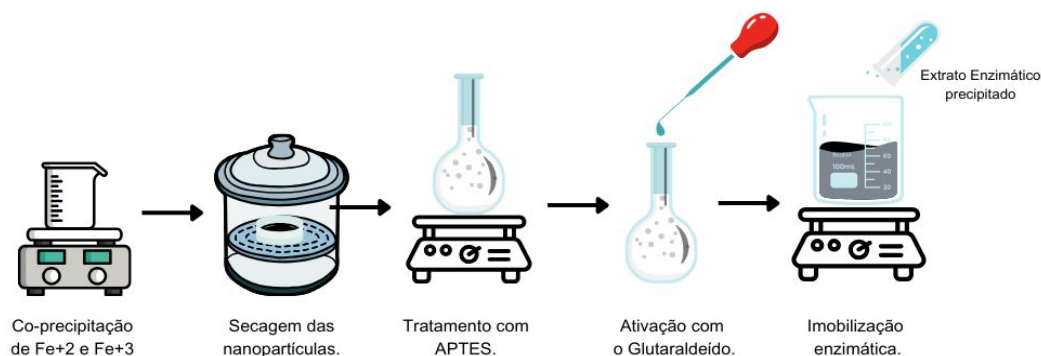
3.9.2 Imobilização em Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas magnéticas foram inicialmente produzidas a partir do processo de co-precipitação, onde uma solução de sais metálicos contendo Fe^{+2} e Fe^{+3} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) na proporção 1:2 (Fe^{+2} : Fe^{+3}) foi diluída em água ultrapura para formar a estrutura de espinélio inverso (Fe_3O_4).

A mistura aquosa foi aquecida a 70 °C sob agitação contínua. O precipitado passou por sucessivas lavagens com água ultrapura e as nanopartículas magnéticas foram secas em dessecador. A magnetita foi tratada utilizando 3-aminopropiltietoxissilano (APTES) na proporção de 1:2 em um balão de fundo redondo, com agitação contínua durante 24 h até mudança de cor para sólido castanho. O precipitado obtido foi lavado com etanol até a completa retirada de resíduos seguido de secagem em dessecador. Após o tratamento com APTES, a ativação dos suportes foi realizada com solução de glutaraldeído 0,6% (v/v) por 5 h a 25 °C.

Depois que o suporte foi ativado, as nanopartículas foram novamente lavadas com tampão bicarbonato-carbonato de sódio 0,1 M, pH 7,0 para remoção do agente ativador em excesso. Por fim, as nanopartículas magnéticas foram incubadas junto com o extrato enzimático na presença do tampão bicarbonato 100 mM, pH 7,0 a 25 °C durante 1 h, sob agitação controlada (Figura 11) (CAN *et al.*, 2009; BARRETO *et al.*, 2011; FARIAS, 2017).

Figura 11 - Esquema ilustrativo da metodologia de imobilização do extrato lipolítico em nanopartículas magnéticas.



3.9.3 Rendimento da Imobilização

O rendimento de imobilização (η) foi calculado com base na atividade enzimática obtida e a atividade enzimática residual presente no meio reacional após o processo de imobilização. O rendimento de imobilização foi calculado a partir da Equação 9 (GAIO *et al.*, 2016).

$$\eta(\%) = \frac{U_0 - U_f}{U_0} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

U_0 : atividade enzimática específica obtida no início da imobilização (U/mg)

U_f : atividade enzimática específica residual no sobrenadante, após a imobilização (U/mg)

3.9.4 Atividade Recuperada

O cálculo da atividade recuperada foi determinado pela relação entre a atividade contida nos biocatalisadores e as atividades inicial e final presentes no sobrenadante, conforme mostrado na Equação 10 (TEXEIRA, 2011).

$$A.R(\%) = \frac{U_s}{U_0 - U_f} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

U_s : atividade enzimática específica obtida para a enzima imobilizada (U/mg)

U_0 : atividade enzimática específica obtida no início da imobilização (U/mg)

U_f : atividade enzimática específica residual no sobrenadante, após a imobilização (U/mg)

3.9.5 Estabilidade Térmica da Enzima Imobilizada

A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se a lipase imobilizada em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Avaliou-se a enzima imobilizada quando incubada em diferentes temperaturas, entre 20 e 70 °C. Para isso, 5 mL do tampão foram adicionados em tubos contendo 0,1 g da lipase imobilizada. Os tubos foram mantidos sob agitação constante (200 rpm) em agitador orbital nas temperaturas de estudo durante 24 h. Decorrido o tempo de contato, os tubos foram centrifugados, sendo o sobrenadante filtrado. Foi realizada a dosagem da atividade enzimática e a quantificação das proteínas no sobrenadante (BRITO, 2008).

3.9.6 Avaliação da Estabilidade de Armazenamento da Enzima Imobilizada

Para avaliar a estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada no suporte, foi dosada a atividade enzimática no meio de armazenamento ao longo do tempo, seguindo a metodologia descrita no item 3.5. Essa análise é fundamental para determinar a eficácia da imobilização e a capacidade de retenção da enzima no suporte durante o período de estocagem. A ausência ou a baixa atividade enzimática detectada no meio indica que a enzima permaneceu fixada ao suporte. Este comportamento reflete a eficiência do processo de imobilização e a compatibilidade entre a enzima e o suporte utilizado (SHELDON; PELT, 2013).

3.9.7 Reutilização do Biocatalisador Imobilizado

A reutilização do biocatalisador foi avaliada através de reações consecutivas da síntese do biodiesel, reutilizando a lipase imobilizada nos diferentes suportes e calculando a atividade enzimática ao fim de cada ciclo, de acordo com a metodologia previamente citada. A atividade enzimática retida foi calculada conforme a Equação 11 (FARIAS, 2017).

$$Reutilização(\%) = \frac{A_o}{A_f} \times 100$$

(11)

Onde:

A_o : atividade enzimática obtida antes da utilização da enzima imobilizada (U/mL)

A_f : atividade enzimática após a utilização da enzima imobilizada (U/mL).

3.10 Transesterificação Enzimática - Produção de Biodiesel

A obtenção de biodiesel foi investigada por transesterificação biocatalítica avaliando-se a matéria-prima oleaginosa, o álcool de cadeia curta, a fonte de enzima, proporção álcool: óleo e o tempo de reação. As melhores condições reacionais foram utilizadas para a reação catalisada pela enzima imobilizada.

Inicialmente, os estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar os impactos da proporção álcool: óleo e do tipo de matéria-prima (óleo de soja e resíduo de óleo de fritura), comparando a eficácia do extrato enzimático fúngico com a enzima comercial (lipase de *Candida rugosa*, Sigma-Aldrich). Para isso, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2^3 , para a reação biocatalítica com metanol e com etanol (Tabela 4).

Tabela 4 - Planejamento experimental fatorial 2^3 realizado para avaliar os fatores que influenciam a transesterificação enzimática na produção de biodiesel.

Experimentos	Parâmetros		
	Matéria-prima	Biocatalisador	Proporção álcool*: óleo
1	OS (-1)	EC (-1)	2:1 (-1)
2	RO (+1)	EC (-1)	2:1 (-1)
3	RO (+1)	EE (+1)	2:1 (-1)
4	RO (+1)	EE (+1)	3:1 (+1)
5	OS (-1)	EC (-1)	3:1 (+1)

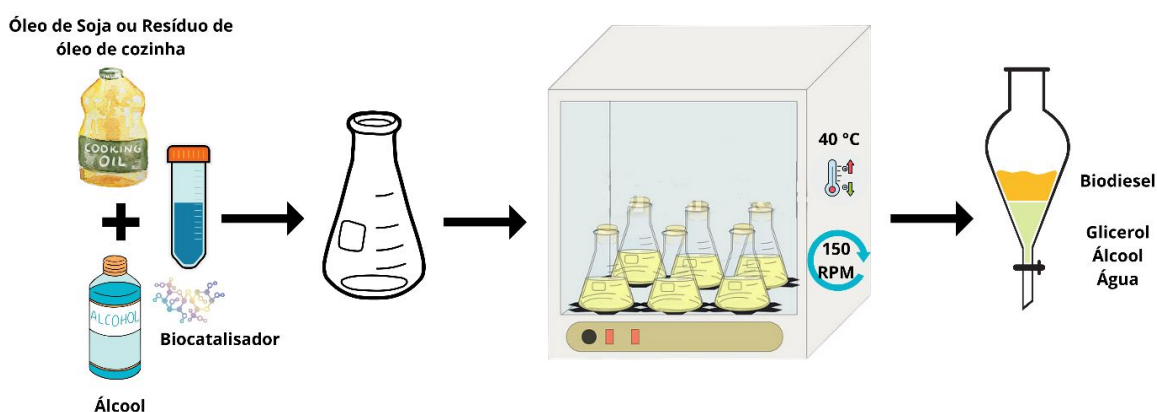
6	OS (-1)	EE (+1)	3:1 (+1)
7	RO (+1)	EC (-1)	3:1 (+1)
8	OS (-1)	EE (+1)	2:1 (-1)

OS = Óleo de soja. RO = Resíduo de óleo de fritura. EC = Enzima comercial (lipase de *Candida rugosa*). EE = Extrato Enzimático produzido pelo fungo endofítico *Endomelanconiopsis endophytica*.

*As reações biocatalíticas foram realizadas com metanol e com etanol.

As reações foram realizadas em reator de bancada, com aquecimento e agitação constante, a 40 °C, em triplicata e 3% (m/m) do biocatalisador como demonstrado na Figura 12. O tempo de reação avaliado foi de 360 min (CRUZ JUNIOR, 2007; MARDER *et al.*, 2008). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 12 - Ilustração do procedimento utilizado na reação de transesterificação enzimática para obter biodiesel.



Na sequência, avaliou-se a reação de transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura utilizando o extrato enzimático fúngico a partir de um novo planejamento experimental fatorial completo 2^3 (Tabela 5), onde foram variados tempo de reação, álcool de cadeia curta e proporção álcool: resíduo. As reações foram realizadas em reator de bancada, com agitação constante, a 40 °C e 3% em peso do extrato enzimático (CRUZ JUNIOR, 2007; MARDER *et al.*, 2008). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 5 - Planejamento experimental fatorial 2^3 realizado para avaliar os fatores que influenciam a transesterificação do resíduo de óleo de fritura, mediada pelo extrato enzimático.

Experimentos	Parâmetros		
	Tempo de reação (min)	Proporção álcool: resíduo	Álcool de cadeia curta
1	120 (-1)	3:1 (-1)	Metanol (-1)

2	360 (+1)	3:1 (-1)	Metanol (-1)
3	120 (-1)	4:1 (+1)	Metanol (-1)
4	360 (+1)	4:1 (+1)	Metanol (-1)
5	120 (-1)	3:1 (-1)	Etanol (+1)
6	360 (+1)	3:1 (-1)	Etanol (+1)
7	120 (-1)	4:1 (+1)	Etanol (+1)
8	360 (+1)	4:1 (+1)	Etanol (+1)

Com base nos planejamentos experimentais, foram determinadas as melhores condições para a obtenção biocatalítica do biodiesel utilizando resíduo de óleo e extrato enzimático fúngico. Estas condições reacionais foram utilizadas para as reações de transesterificação com as enzimas imobilizadas em alginato de cálcio e nanopartículas magnéticas. As reações foram conduzidas com aproximadamente 3% (m/m) de enzima imobilizada.

Para avaliar a capacidade de reutilização dos biocatalisadores imobilizados, foram conduzidas reações consecutivas de transesterificação para síntese de biodiesel. O desempenho do biocatalisador imobilizado foi monitorado reutilizando o biocatalisador imobilizado e calculando sua atividade enzimática ao final de cada ciclo. Após cada ciclo de reação, as esferas de alginato de cálcio contendo o biocatalisador foram recuperadas por filtração e lavadas cuidadosamente com solução tampão Tris-HCL e água ultrapura para remoção de quaisquer resíduos de reagentes.

O biocatalisador foi então submetido a novos ciclos sob as mesmas condições reacionais, com seu desempenho avaliado pelo registro do rendimento e da eficiência do biodiesel produzido. Além disso, para fins de comparação, o resíduo de óleo de fritura pré-tratado foi submetido ao processo de produção de biodiesel sob as melhores condições reacionais.

3.11 Purificação do Biodiesel

Ao final da reação de transesterificação, a mistura obtida foi transferida para funil de separação e deixada em repouso por 24 horas. Após a separação das fases, o biodiesel foi lavado com 50 mL de água (1 mL de água para 2 mL de biodiesel, aproximadamente) e levado novamente ao funil de separação (AQUINO, 2012). Após a retirada do glicerol remanescente, a amostra coletada foi utilizada na determinação do rendimento do biodiesel, análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e caracterização do biocombustível.

3.12 Rendimento do Biodiesel

O rendimento do biodiesel foi calculado a partir da massa de biodiesel obtida após o término da reação biocatalítica em função da massa de óleo ou de resíduo de óleo empregada na transesterificação (Equação 12) (PARANDI *et al.*, 2022; JAMIL *et al.*, 2018).

$$Rendimento(\%) = \frac{M_{biodiesel}}{M_{\text{óleo}}} * 100 \quad (12)$$

3.13 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

Para a confirmação da produção de biodiesel, foi utilizada a metodologia descrita por Naser *et al.* (2021), com adaptações. Foram misturados 1,0 mL de acetona a 100 µL da amostra de biodiesel obtida após o processo de purificação e em seguida analisadas em cromatógrafo (modelo CG-7890B, Agilent Technologies, USA) acoplado a espectrômetro de massas (modelo MS-5977A, Agilent Technologies, USA).

Além disso, foi utilizada na análise a coluna Carboxen 1010 (30 m x 0,53 mm) e nas condições constaram H₂ como gás de arraste e fluxo de 1,2 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 100 °C, permanecendo por 1 min, com taxa de aquecimento de 5 °C/min até 290 °C, permanecendo a 290°C durante 21 minutos. As temperaturas do injetor e do detector permaneceram em 300 °C. A quantidade de amostra injetada foi de 3 µL. Os espectros de massa resultantes foram comparados com os da biblioteca NIST Standard Reference Database 1A.

As amostras de biodiesel obtidas a partir da reação com as enzimas imobilizadas foram analisadas em cromatógrafo em fase gasosa (GCMS-TQ8050 NX, Shimadzu) acoplado a espectrômetro de massa (GCMS-TQ8050 NX, Shimadzu). A coluna utilizada foi a SH-I-5Sil MS (30 m x 0,25 mm). O gás de arraste foi H₂ com um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 80 °C, mantida por 3 minutos, com taxa de aquecimento de 5 °C/min até 290 °C, permanecendo a 290°C por 20 minutos. A temperatura do injetor e do detector foi mantida em 300 °C. O volume de amostra injetado foi de 3 µL. Os espectros de massa resultantes foram comparados com os da Smart Database Series, permitindo a identificação dos ésteres etílicos produzidos.

3.14 Caracterização Físico-Química do Biodiesel

3.14.1 Viscosidade Cinemática

A viscosidade cinemática é uma característica importante a ser analisada pois está associada à potência e ao rendimento do combustível no motor. A viscosidade foi determinada utilizando um viscosímetro (QUIMIS 0860R24) à 40 °C, com resultados expressos em mm²/s (BATTISTI *et al.*, 2017).

3.14.2 Massa Específica

A massa específica, assim como a viscosidade, é uma característica que está associada à potência e ao rendimento do combustível no motor. Na determinação da densidade utilizou-se um balão volumétrico de 10 mL. O balão foi pesado e em seguida adicionou-se a amostra até o menisco do balão, que foi então pesado novamente. Para o cálculo da massa específica utilizou-se a Equação 13 (BATTISTI *et al.*, 2017).

$$\text{Massa específica} = \frac{m}{v} \quad (13)$$

Onde:

m = massa da amostra (kg)

v = volume da amostra (m³)

3.14.3 Cinzas

A quantidade de cinzas é uma característica associada à qualidade do biodiesel. Quando esse teor é elevado, pode causar entupimento nos motores. Para a determinação das cinzas foram utilizados cadinhos previamente aquecidos em mufla por um período de 2 h a 800 °C ± 30 °C, resfriados em dessecador e pesados em balança analítica.

No cadinho tarado, foram adicionados aproximadamente 15 g de biodiesel, que foi aquecido até a temperatura de combustão. Após a queima do biodiesel, o cadinho foi levado à mufla a 800 °C ± 30 °C durante 2 h. Após este período, as amostras foram resfriadas e adicionadas de ácido sulfúrico (1:1) em água, para consumir toda a matéria orgânica remanescente. Em seguida, o cadinho foi aquecido a 800 °C ± 30 °C durante 2 h, resfriado em

dessecador e pesado em balança analítica. O processo foi repetido até peso constante. O cálculo do percentual de cinzas foi realizado a partir da Equação 14 (ARAÚJO *et al.*, 2008).

$$\%CS = \frac{M_R}{M_A} \times 100 \quad (14)$$

Onde:

%CS: Percentual de cinzas sulfatadas.

M_R: massa do resíduo (g)

M_A: massa da amostra (g)

3.14.4 Ponto de Fulgor

O ponto de fulgor está associado à temperatura mínima em que o biocombustível entra em combustão. O ponto de fulgor é obtido com base no método da ASTM D92, onde as amostras de biodiesel foram colocadas em um cadinho de porcelana posicionado sobre uma tela de amianto aquecida por um bico de Bunsen. O aumento da temperatura do biodiesel foi acompanhado com o auxílio de um termômetro de mercúrio.

3.14.5 Índice de Acidez

A determinação do índice de acidez consistiu na pesagem de 5 g de amostra, seguida da homogeneização em solução de éter: álcool (2:1) v/v e da titulação, utilizando solução de hidróxido de potássio a 0,1 M, previamente padronizada. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.15 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos às análises de normalidade e homogeneidade de dados, teste de Tukey e análise da variância (ANOVA) com o auxílio dos softwares SPSS e Statistica v. 10 (p<0,05).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do Resíduo de Óleo de Fritura

O resíduo de óleo de fritura foi caracterizado quanto à densidade, índice de acidez, índice de peróxido e índice de saponificação. Os resultados obtidos no presente estudo e os obtidos por outros pesquisadores, para fins de comparação, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Caracterização do resíduo de óleo de fritura utilizado no presente estudo e em outros trabalhos.

Densidade a 25°C (g/cm ³)	Índice de acidez (mg KOH/g)	Índice de peróxido (meq/kg)	Índice de saponificação (mg KOH/g)	Referência
0,922	1,45	25,98	172,77	Castro <i>et al.</i> , 2018
0,908	28,50	-	175,87	Aworanti <i>et al.</i> , 2019
0,916	35,40	-	234,71	Al-Saadi <i>et al.</i> , 2020
-	1,86	-	181,25	Farooq <i>et al.</i> , 2015
0,917	1,78	18,36	-	Siqueira <i>et al.</i> , 2019
0,917	5,75	19,38	175,70	Este estudo

Observam-se valores significativamente elevados para os índices de acidez e peróxidos quando comparados aos valores típicos do óleo refinado (<0,6 mg KOH/g e 20 meq/kg respectivamente), que é a principal matéria-prima utilizada na produção de biodiesel no Brasil (ANVISA, 2005).

É relevante notar que os valores estão em conformidade com os resultados obtidos em outros estudos que investigaram o resíduo de óleo, como evidenciado na Tabela 6. Conforme indicado por Castro *et al.* (2018) e Plata *et al.* (2022), os índices elevados de acidez e peróxidos refletem a degradação térmica e oxidativa do óleo, resultante das altas temperaturas do processo de fritura em contato com o oxigênio atmosférico.

Quanto ao índice de saponificação, seu valor relativamente baixo pode estar associado à ocorrência de hidrólise durante o processo de fritura, o que libera impurezas não saponificáveis (CASTRO *et al.*, 2018). Além disso, é importante notar que o resíduo de óleo analisado apresentou uma densidade próxima à do óleo de soja comercial (0,9205 g/cm³) (MORAIS *et al.*, 2013). De acordo com as observações de Castro *et al.* (2018), isso sugere a ausência de quantidades significativas de água ou impurezas no resíduo.

Os parâmetros analisados neste estudo demonstram valores semelhantes aos encontrados em outras pesquisas que empregaram resíduo de óleo na produção de biodiesel

(FAROOQ *et al.*, 2015; CASTRO *et al.*, 2018; AWORANTI *et al.*, 2019; SIQUEIRA *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2019; AL-SAADY *et al.*, 2020; BINHAYEEDUNG *et al.*, 2020). Essa concordância sugere que o resíduo utilizado nesta investigação apresenta características adequadas para reação de transesterificação.

No entanto, é importante ressaltar que, ao contrário das pesquisas desenvolvidas por Farooq *et al.* (2015), Castro *et al.* (2018) e Rovere *et al.* (2020), o resíduo de óleo utilizado neste estudo não foi submetido a nenhum tipo de tratamento prévio, sendo apenas filtrado e empregado diretamente na reação de transesterificação enzimática.

O resíduo de óleo de fritura pré-tratado também foi avaliado em relação ao índice de acidez. Após o processo de neutralização com NaOH, o índice de acidez do resíduo de óleo diminuiu consideravelmente, de 5,75 mg KOH/g para 0,42 mg KOH/g, uma redução de 92,7%.

Esses resultados estão alinhados com os estudos de Bizerra *et al.* (2016), que relataram uma redução de 92% no índice de acidez do óleo de fritura por meio do método de neutralização. Igualmente, Hochscheidt *et al.* (2020) obtiveram uma redução de 91% utilizando a mesma metodologia. Ambos os estudos corroboram que a técnica de neutralização é altamente eficaz para reduzir o índice de acidez do resíduo de óleo de fritura, permitindo a utilização na produção de biodiesel.

4.2 Produção Enzimática

A atividade enzimática de lipase foi avaliada diariamente durante o cultivo submerso do fungo endofítico *E. endophytica* QAT_7AC (Figura 13). Observa-se que a maior produção de lipase, de 11262 U/mL, ocorreu após 120 h de cultivo fúngico. O extrato enzimático apresentou concentração de proteínas de 1,72 mg/mL, o que significa que o extrato produzido possui uma alta atividade enzimática específica, de 6434 U/mg.

O resultado de produção enzimática pode ser considerado promissor. Quando comparado ao resultado obtido por Carvalho Neto (2013), que utilizou a mesma espécie fúngica, nota-se que o *E. endophytica* isolado de *A. canelilla* apresenta maior atividade enzimática. Além disso, quando comparado a outros fungos endofíticos (SOPALUM *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2021) e até mesmo a bactérias (RANA *et al.*, 2019), o fungo *E. endophytica* QAT_7AC demonstra excelente potencial como fonte de lipase extracelular.

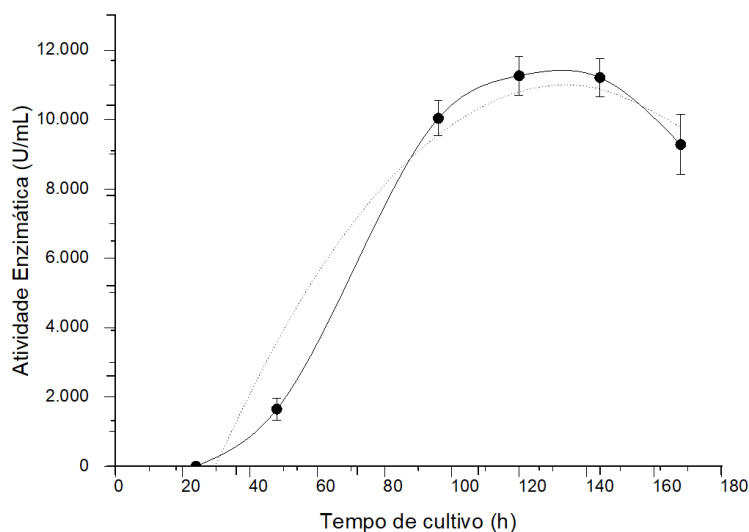
Contudo, ao se avaliar o tempo de obtenção da maior atividade lipolítica, nota-se que o fungo inicia a produção enzimática somente após 24 h de cultivo, com pico em 120 h. No

estudo de Sopalun *et al.* (2021), o extrato enzimático com a maior atividade (82,22 U/mL) foi obtido em 72 h para o fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* XmL-02.

Oliveira *et al.* (2021) obtiveram o extrato enzimático rico em lipase (28 U/mL) produzido pelo fungo *Preussia africana* em apenas 48 h. Rocha *et al.* (2020) obtiveram a maior atividade lipolítica em 96 h para os fungos endofíticos *Stemphylium lycopersici* (397 U/mL) e *Sordaria sp.* (286 U/mL). Por outro lado, Sena *et al.* (2022) obtiveram o extrato com maior atividade de lipase em 144 h para o fungo endofítico *Aspergillus sp.*, tempo mais próximo do obtido pelo *E. endophytica*, embora com atividade enzimática mais baixa.

Assim, verifica-se a necessidade de otimizar a produção da enzima fúngica a fim de reduzir o tempo de cultivo. Fatores como temperatura de cultivo e pH do meio são cruciais para a produção lipolítica (SENA *et al.*, 2022) e foram previamente avaliados por Matias (2022). Entretanto, outros fatores devem ser estudados, como agitação, componentes do meio e concentração de inóculo, visando diminuir o tempo de bioprocesso (SZYMCZAK *et al.*, 2021).

Figura 13 - Produção de lipase do fungo endofítico amazônico *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC em cultivo submerso (●) e curva polinomial (--).



A partir do ajuste dos dados experimentais, foi possível traçar uma curva polinomial e, a partir desta gerar uma equação para descrever matematicamente a produção enzimática do fungo *E. endophytica*, apresentada na Equação 15 ($R^2 = 0,9538$).

$$y = -1,0135x^2 + 270,47x - 7069,70 \quad (15)$$

Onde:

y = Atividade enzimática de lipase (U/mL)

x = Tempo de cultivo em horas

Abu *et al.* (2017), assim como Behera *et al.* (2019) e Dutta *et al.* (2022), também recorreram a modelos matemáticos para descrever a produção de lipase microbiana. A equação derivada da curva polinomial proporciona uma abordagem quantitativa e modelada para compreender o desempenho da produção enzimática ao longo do tempo. Essa abordagem não apenas ajuda a identificar o ponto de máximo rendimento enzimático, mas também oferece uma ferramenta para otimizar o tempo de obtenção da enzima. Por meio da equação, é possível antecipar e prever a produção enzimática no decorrer do tempo (ABU *et al.*, 2017; BEHERA *et al.*, 2019; DUTTA *et al.*, 2022).

4.3 Caracterização do Extrato Enzimático

O extrato enzimático obtido a partir do 6º dia de cultivo do fungo endofítico *E. endophytica* QA7_7AC foi filtrado e utilizado para sua caracterização quanto às faixas ótimas de temperatura e pH. Foram avaliadas cinco temperaturas (35 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C) e cinco valores de pH (5,5; 6,0; 7,0; 8,0; 8,5). Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos referente ao efeito da temperatura.

Tabela 7 - Efeito da temperatura sobre a atividade de lipase do extrato enzimático produzido pelo fungo *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC.

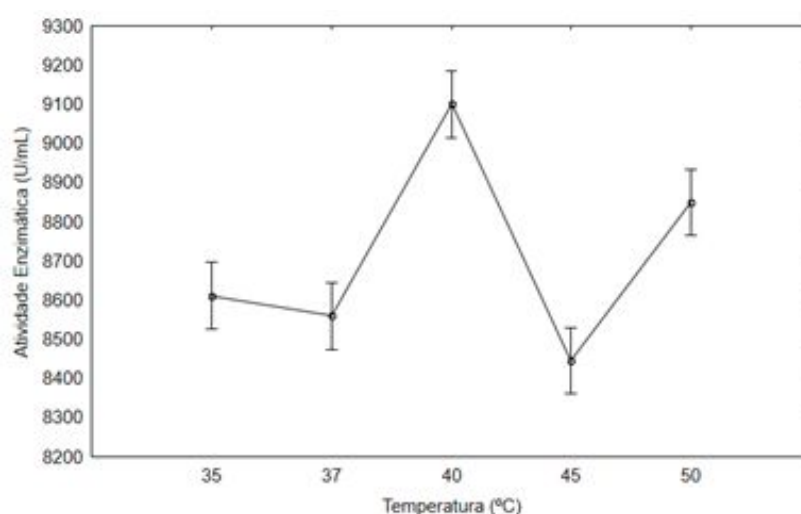
Temperatura (°C)	Atividade enzimática (U/mL)*	Desvio padrão
35	8611 ^c	29
37	8559 ^c	10
40	9100 ^a	6
45	8445 ^c	4
50	8849 ^b	5

*Letras diferentes indicam que há diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05).

Pode-se observar nos resultados da Tabela 7 que o extrato enzimático obteve a máxima atividade lipolítica na temperatura de 40 °C. A fim de comparar a atividade lipolítica obtida nas diferentes faixas de temperatura, realizou-se o teste estatístico de análise de variância, ANOVA (Figura 14).

Verifica-se na Figura 14 que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas, ou seja, a temperatura de 40 °C é a temperatura ótima para atuação da lipase de *E. endophytica*. No entanto, observa-se que dentro da faixa de temperatura avaliada a enzima obteve um bom desempenho, mantendo valores elevados de atividade lipolítica. Esses resultados estão de acordo com os de Colla *et al.* (2015), que obtiveram uma ótima atividade da lipase de *A. niger* na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C. Dors (2006) também verificou que as lipases apresentam maior potencial de hidrólise de lipídeos entre 37 e 45 °C.

Figura 14 - Análise de variância ($p < 0,05$) para a atividade enzimática da lipase produzida pelo fungo *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC em diferentes temperaturas.



Para a caracterização do extrato enzimático quanto ao pH, obteve-se os resultados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Efeito do pH sobre a atividade de lipase do extrato enzimático produzido pelo fungo *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC.

pH	Atividade enzimática (U/mL)*	Desvio padrão
5,5	8840 ^a	17
6,0	8703 ^b	10
7,0	8729 ^b	5
8,0	8618 ^c	3
8,5	8579 ^d	4

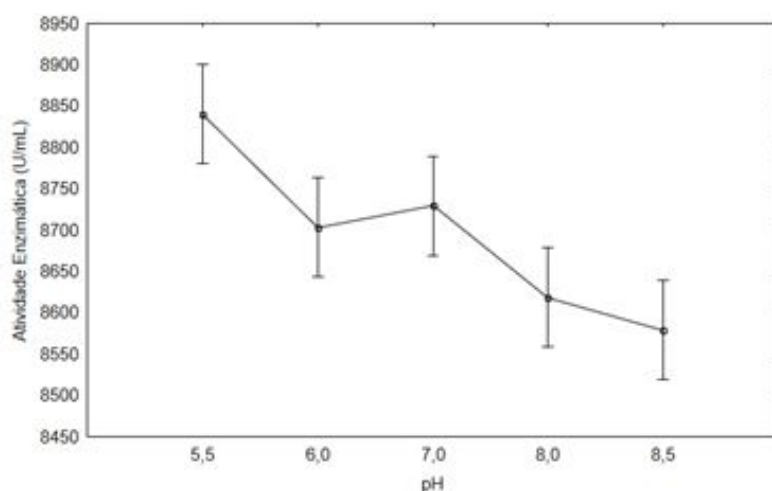
*Letras diferentes indicam que há diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que o extrato enzimático apresentou a maior atividade lipolítica no pH 5,5. A fim de comparar a atividade lipolítica nas diferentes faixas de pH, realizou-se o teste estatístico ANOVA (Figura 15).

A partir da Figura 15, verifica-se que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas, determinando então que o pH 5,5 é o pH ótimo para atuação da lipase obtida por *E. endophytica*. Contudo, observa-se que dentro da faixa de pH avaliada a enzima obteve elevada atividade lipolítica.

Lipases fúngicas, em geral, apresentam atividade em uma ampla faixa de pH. Silveira (2018) obteve uma faixa ótima de pH de 4,0 a 6,5 para a atuação da lipase obtida por *A. niger* e Oliveira (2021) obteve uma faixa de pH de 5,0 a 8,0 para a atuação da lipase produzida pelo fungo endofítico *Preussia africana*, corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

Figura 15 - Análise de variância ($p < 0,05$) para a atividade enzimática da lipase produzida pelo fungo *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC em diferentes valores de pH.



As condições em que a lipase produzida pelo fungo *E. endophytica* é capaz de atuar são ideais para a produção de biodiesel por transesterificação enzimática, especialmente, quando as matérias-primas apresentam elevado índice de acidez, como no caso do resíduo de óleo de fritura.

O índice de acidez é um fator limitante para a produção de biodiesel pelo método da transesterificação na presença de catalisadores alcalinos homogêneos (NaOH, KOH), uma vez que índices de acidez menores que 0,5 mg NaOH/g inviabilizam o processo de conversão (HSIAO *et al.*, 2021). Dessa forma, a utilização de lipase como catalisador na produção de biodiesel a partir dessas matérias-primas pode ser uma alternativa promissora para a produção do biocombustível (TALUKDER *et al.*, 2010; LAMPI *et al.*, 2020).

4.4 Purificação Enzimática

Na etapa de precipitação enzimática foram avaliados três métodos: com sulfato de amônio, etanol e acetona. Apesar da precipitação de enzimas ser comumente realizada com sulfato de amônio em variadas faixas de saturação (MENONCIN, 2007; BORKAR *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2015; SILVA, 2017), no presente estudo as faixas de 0-20%, 0-40% e 40-70% de saturação levou à inativação da lipase fúngica, assim como a precipitação com acetona. Por outro lado, na precipitação com etanol houve detecção de atividade lipolítica e sua concentração na fração precipitada, com atividade específica de 8228,90 U/mg (Tabela 9).

A precipitação por etanol foi empregada com sucesso por Batista (2022) na pré-purificação de amilases fúngicas e por Kamanski (2017), na concentração de lipase, alcançando uma atividade específica de 28,50 U/mg e fator de recuperação superior a 100%. Maldonado (2012) utilizou com êxito a mesma metodologia, obtendo atividade específica de 925 U/mg para a lipase produzida por *Geotrichum candidum*, com fator de recuperação de 56,3%. Esses estudos demonstram a eficácia e versatilidade da técnica de precipitação por etanol na purificação e concentração de enzimas, corroborando os resultados do presente estudo.

Tabela 9 - Resultados da purificação enzimática obtidos para a lipase de *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC.

Amostras	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação
Extrato Enzimático	11262,0	1,72	6434,5	-	-
Precipitação - etanol	8146,0	0,99	8228,9	73,8	1,3
Sephadex G-100	3962,2	0,36	10942,7	36,0	7,9
Amicon® Ultra-2	9058,3	3,48	2602,5	82,1	0,4

O extrato precipitado com etanol foi submetido à purificação na coluna empacotada com Sephadex G-100, sendo coletadas 20 frações de 1 mL. A maior atividade específica lipolítica obtida foi a da fração 16, atingindo 10942,7 U/mg, representando um aumento de cerca de 20% em comparação com a atividade específica do extrato precipitado com etanol (Tabela 9).

Torna-se relevante mencionar que outros pesquisadores também exploraram a eficácia da coluna Sephadex G-100 na purificação de lipases. Pastore *et al.* (2003) avaliaram esta coluna combinada à precipitação por sulfato de amônio na purificação de lipases obtidas a

partir de *Rhizopus* sp., alcançando um aumento significativo na atividade específica, superior a 100%.

Além disso, Hasan *et al.* (2007) conduziram estudos de purificação utilizando Sephadex G-75 para um extrato enzimático proveniente de *Bacillus subtilis*, resultando em um aumento de 57% na atividade específica da enzima. Silva (2017) também relatou um aumento de 100% na atividade específica de uma lipase obtida de *A. niger* purificada em Sephadex G-100, em relação ao extrato bruto. Esses resultados destacam a eficácia da técnica de purificação de lipases utilizando a resina Sephadex, ampliando a compreensão sobre o potencial desses processos de purificação.

O extrato enzimático precipitado em etanol também foi submetido ao processo de purificação por ultrafiltração no sistema Amicon® Ultra-2 (Millipore, 3-100 kDa). Durante esse procedimento, foi identificado que a maior atividade lipolítica estava na fração purificada, conforme relatado pelo fabricante (MERCK, 2021). Entretanto, o extrato enzimático apresentou uma atividade específica de 2602 U/mg, refletindo uma redução de aproximadamente 70% em relação ao extrato obtido por precipitação com etanol (Tabela 9).

Nota-se na Tabela 9 que a amostra ultrafiltrada apresentou alta atividade enzimática e uma concentração igualmente elevada de proteínas, resultando na diminuição da atividade específica. A elevação na concentração de proteínas pode estar relacionada à metodologia de purificação enzimática por ultrafiltração, na qual a membrana utilizada não foi seletiva para a lipase presente no extrato, permitindo que outras proteínas de tamanho molecular semelhante permanecessem na fração purificada, sendo sugerida uma etapa prévia para obter extratos mais puros, como destacado por Nascimento (2012) e Batista (2022), que utilizaram a ultrafiltração para purificar lipase de *Xylella fastidiosa* e amilase de *Penicillium citrinum*, respectivamente.

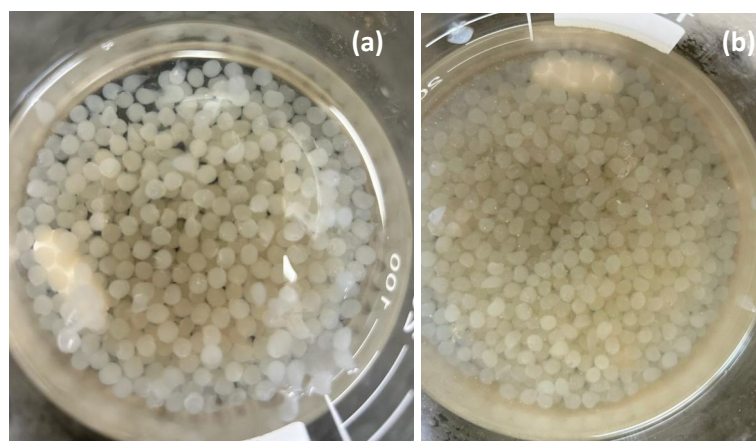
No estudo de Zhao *et al.* (2021) o sistema Amicon® foi aplicado com sucesso para purificar a lipase produzida por *Staphylococcus caprae*, alcançando uma atividade específica de 502,76 U/mg. Lee *et al.*, (2019) também utilizaram uma abordagem semelhante para purificar lipase de um extrato bruto obtido de *Aerobasidium pullulans*, resultando em um notável aumento na atividade específica da amostra, ilustrando a versatilidade e a complexidade da purificação de enzimas e a necessidade de se ajustar o processo de acordo com os objetivos de pureza e atividade desejados.

4.5 Imobilização Enzimática

4.5.1 Imobilização em Alginato de Cálcio

A imobilização enzimática foi utilizada como estratégia para possibilitar a estabilidade e o reuso dos biocatalisadores. Assim, foram avaliados tanto o extrato enzimático quanto o extrato enzimático precipitado em etanol (Figura 16). Foram produzidas 520 esferas do extrato enzimático imobilizado em alginato de cálcio, pesando em média 30 mg cada, com 6 mm de diâmetro (Figura 16a). Após 24 h da fabricação das esferas, foi possível obter eficiência de imobilização de 89,7%. A lipase imobilizada reteve 67% de sua atividade inicial.

Figura 16 - Extrato lipolítico (a) e extrato lipolítico precipitado (b) de *Endomelanconopsis endophytica* QAT_7AC imobilizados em esferas de alginato de cálcio.



A partir da imobilização do extrato enzimático precipitado em alginato de cálcio foram produzidas 848 esferas com peso médio de 15 mg cada, e diâmetro de 7 mm (Figura 16b). Passadas 24 h da imobilização enzimática, foi realizada a quantificação da atividade lipolítica no sobrenadante e nas esferas, obtendo-se um rendimento de 92,26% e uma recuperação da atividade inicial de 100%. Em comparação com outros estudos utilizando o suporte alginato de cálcio na imobilização de lipase, verifica-se que os resultados obtidos no presente trabalho são similares, considerando o rendimento e a recuperação, comprovando assim a eficácia da metodologia utilizada. Na Tabela 10 é possível visualizar essa comparação.

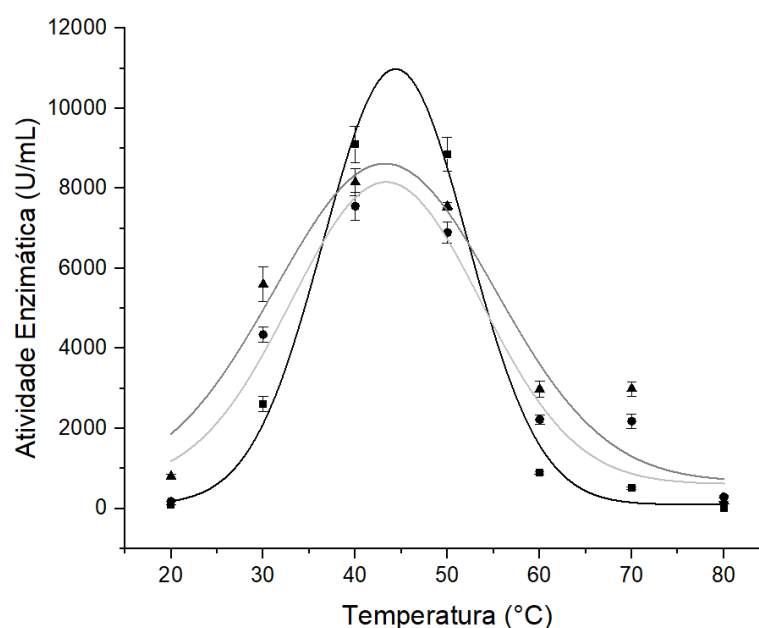
Tabela 10 - Eficiência da imobilização de lipase em alginato de sódio em diferentes estudos.

Alginato de Cálcio (%)	Enzima	Eficiência da imobilização (%)	Atividade retida (%)	Referência
2,0	Lipase de <i>R. oryzae</i>	37,0	60,0	Ghattas <i>et al.</i> , 2014
2,0	Lipase de <i>C. rugosa</i>	100,0	94,0	Vetrano <i>et al.</i> , 2022

2,5	Lipase de <i>Bacillus</i> sp.	69,4	9,0	Sari <i>et al.</i> , 2019
3,7	Extrato lipolítico de <i>Y. lipolytica</i>	100,0	50,0	Pereira <i>et al.</i> , 2021
4,0	Lipase de <i>C. rugosa</i>	99,0	57,6	Knezevic <i>et al.</i> , 2002
6,0	Lipase de <i>C. rugosa</i>	98,7	53,5	Knezevic <i>et al.</i> , 2002
5,0	Extrato Lipolítico de <i>E. endophytica</i>	89,7	67,0	Este estudo
5,0	Extrato precipitado de <i>E. endophytica</i>	92,3	100,0	Este estudo

Após a imobilização, verificou-se a estabilidade térmica do extrato e do extrato precipitado imobilizados (Figura 17).

Figura 17 - Estabilidade térmica do extrato lipolítico de *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC (■) não imobilizado; do extrato (●) e extrato precipitado (▲) imobilizados em alginato de cálcio.



Ao avaliar a estabilidade da enzima em relação à temperatura, observa-se um aumento na atividade à medida que a temperatura aumenta de 20 °C para 50 °C, com atividade máxima registrada a 40 °C, tanto para o extrato livre como para os extratos imobilizados em alginato de cálcio (Figura 17). Outros estudos também observaram temperatura ideal entre 40 e 60 °C para a atividade de lipase, na forma livre e imobilizada em diferentes suportes (COLLA *et al.*, 2015; NG *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2019; ADETUNJI *et al.*, 2018).

O extrato enzimático imobilizado e o extrato precipitado imobilizado apresentaram maior estabilidade da atividade lipolítica entre 30 °C e 50 °C, indicando uma maior resistência da enzima à desnaturação térmica após o aprisionamento em esferas de alginato. Em contrapartida, o aumento adicional da temperatura acima de 50 °C resultou na diminuição acentuada da atividade do extrato não imobilizado. A 80 °C os extratos enzimáticos não apresentaram atividade.

Adicionalmente, o uso do modelo gaussiano permitiu construir uma curva e formular uma equação que descreve com precisão o comportamento enzimático em diferentes temperaturas. Modelos matemáticos, como o modelo gaussiano, são ferramentas essenciais para prever o desempenho enzimático, pois fornecem uma representação detalhada de como a atividade da enzima varia em resposta a alterações de temperatura.

A equação obtida permitiu não apenas confirmar a estabilidade enzimática, mas também identificar as temperaturas específicas nas quais cada forma avaliada atingiu sua máxima atividade enzimática: 44,2 °C para o extrato enzimático livre; 43,3 °C para o extrato enzimático imobilizado; e 43,2 °C para o extrato enzimático precipitado imobilizado. Esses resultados reforçam a precisão do modelo na determinação das condições ideais para o desempenho enzimático. Essas informações são cruciais para otimizar as condições operacionais e melhorar o controle de reações enzimáticas em aplicações industriais.

As equações derivadas estão apresentadas abaixo, oferecendo uma base sólida para maximizar a eficiência e o rendimento nos processos catalíticos. A Equação 16 descreve o ajuste para a estabilidade térmica da enzima livre:

$$y = 100,19 + 10881,03 \cdot e^{\frac{-x^2}{10000}}$$

A Equação 17 descreve o ajuste para a estabilidade térmica do extrato enzimático imobilizado em alginato de cálcio:

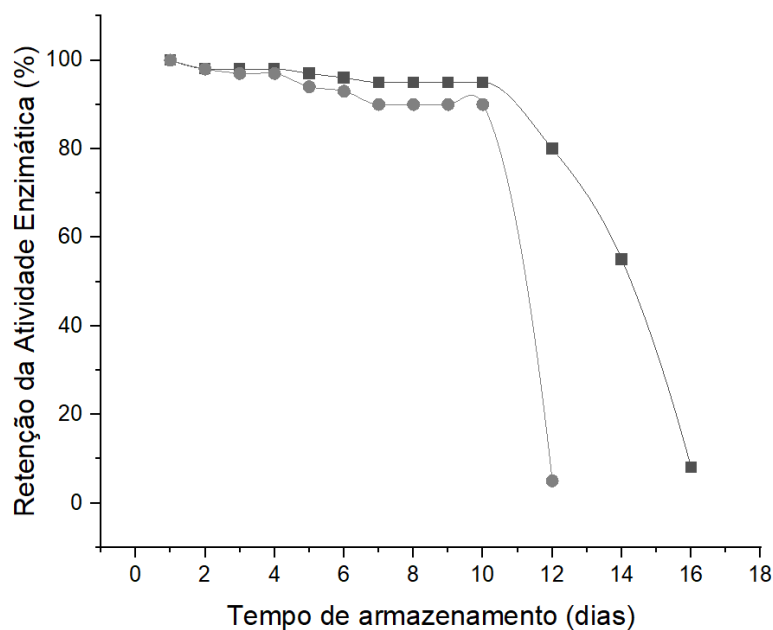
$$y = 610,92 + 7546,87 \cdot e^{\frac{-x^2}{10000}}$$

A Equação 18 descreve o ajuste para a estabilidade térmica da enzima precipitada imobilizada em alginato de cálcio:

$$y = 668,58 + 7952,01 \cdot e^{\frac{-x^2}{10000}}$$

Para avaliar a estabilidade durante o armazenamento dos extratos enzimáticos após o processo de imobilização, monitorou-se a atividade enzimática no meio reacional (sobrenadante) ao longo de 16 dias (Figura 18). Tanto o extrato enzimático quanto o extrato precipitado imobilizados em alginato de cálcio demonstraram estabilidade a atividade lipolítica, sem perda significativa de atividade durante o período de 10 dias de armazenamento. No entanto, após 12 dias, observou-se a deformação das esferas, acompanhada de uma redução drástica de 95% na atividade enzimática para o extrato enzimático imobilizado. Já o extrato precipitado imobilizado apresentou maior estabilidade durante o armazenamento, com a perda da atividade enzimática sendo observada no 16º dia.

Figura 18 – Estabilidade do extrato lipolítico de *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC durante o armazenamento a 3 °C. Atividade relativa do extrato enzimático (■) e do extrato enzimático precipitado (●) imobilizados em alginato de cálcio.



Outros estudos corroboram os resultados encontrados. Vetrano *et al.* (2022) relataram a estabilidade de enzimas imobilizadas por até 7 dias de armazenamento, enquanto Moreira Filho (2019), avaliando a atividade de lipase imobilizada em alginato de cálcio, identificou uma perda de 70% na atividade enzimática após o 28º dia. Esses dados destacam a necessidade de ajustes no processo de estocagem a fim de prolongar a integridade estrutural do suporte e maximizar a vida útil das enzimas imobilizadas.

Verifica-se na Figura 18 que o extrato enzimático precipitado apresentou maior estabilidade quando imobilizado alginato de cálcio do que o extrato enzimático bruto. Esse

comportamento pode ser atribuído à remoção de impurezas durante o processo de precipitação, uma vez que tais impurezas, caso presentes, poderiam interferir nas interações entre a enzima e o suporte, prejudicando a eficácia da imobilização. Além disso, o processo de precipitação tende a concentrar a enzima, aumentando a densidade de ligação ao suporte, o que contribui para sua maior resistência a condições adversas (MOHAMAD *et al.*, 2015).

4.5.2 Imobilização em Nanopartículas Magnéticas

Foram utilizadas nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 tratadas com APTES como material de suporte para imobilização do extrato lipolítico precipitado. O extrato foi covalentemente ligado às nanopartículas amino-funcionalizadas por meio do uso de glutaraldeído como reagente de acoplamento, alcançando uma retenção de atividade de 69% e uma eficiência de ligação enzimática de 50%.

Na Tabela 11 é possível visualizar os resultados obtidos em outros estudo que utilizaram nanopartículas magnéticas para imobilização de lipase, comparando com os resultados obtidos com a lipase de *E. endophytica* QAT_7AC.

Tabela 11- Eficiência da imobilização de lipase em partículas magnéticas em diferentes estudos.

Enzima	Eficiência da imobilização (%)	Atividade retida (%)	Referência
Lipase de <i>Thermomyces lanuginosa</i>	84	70	Xie; Ma, 2009
Lipase B de <i>C. antarctica</i>	100	90	Miao <i>et al.</i> , 2018
Lipase	86	-	Jambuligan <i>et al.</i> , 2019
Lipase	-	60	Badoei-dalfard <i>et al.</i> , 2019
Lipase de <i>A. niger</i>	96	84	Thangaraj <i>et al.</i> , 2016
Extrato enzimático precipitado de <i>E. endophytica</i>	50	69	Este estudo

Como demonstrado na Tabela 11, os resultados deste estudo apresentam atividades retidas similares a relatados em outros trabalhos que utilizaram nanopartículas magnéticas como suporte. No entanto, ao avaliar a eficiência da imobilização, verifica-se que os resultados obtidos no presente estudo foram inferiores. Diversos fatores podem influenciar a imobilização enzimática em nanopartículas magnéticas, incluindo a pureza da enzima, as

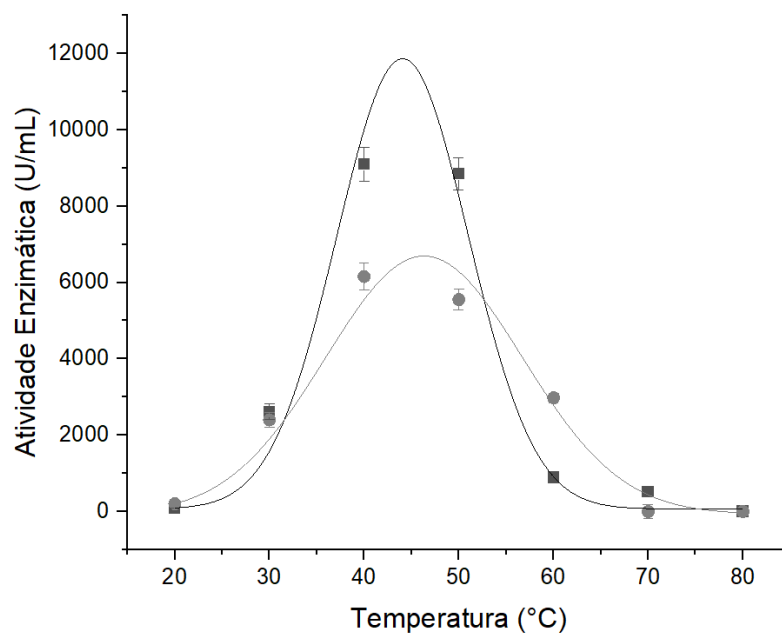
condições do meio, como temperatura e pH, a concentração do reagente de acoplamento, e a compatibilidade entre a enzima e o suporte (ZHONG *et al.*, 2020).

Neste estudo, foi utilizado o extrato lipolítico precipitado e não a lipase purificada, o que pode ter impactado negativamente o processo de imobilização nesse suporte. O extrato enzimático bruto também foi testado, mas não houve sucesso na imobilização, o que corrobora a hipótese de que as impurezas presentes no extrato interferem no processo de imobilização.

Outro fator importante que pode ter contribuído para a obtenção desses resultados é a concentração de glutaraldeído utilizada como reagente de acoplamento. O aumento dessa concentração poderia levar ao aumento da eficiência da imobilização e fortalecer as ligações covalentes entre a enzima e o suporte. Além disso, a interação entre a enzima e o suporte deve ser avaliada para otimizar o processo (ZHONG *et al.*, 2020; BADOEI-DALFARD, *et al.*, 2019).

Apesar dessas limitações, a metodologia utilizada demonstrou-se eficaz para a imobilização da lipase de *E. endophytica* QAT_7AC, destacando seu potencial para aplicações futuras na síntese de biodiesel. Após a imobilização, verificou-se a estabilidade térmica da lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas (Figura 19).

Figura 19 - Estabilidade térmica do extrato lipolítico de *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC (■) não imobilizado; e do extrato (●) e extrato precipitado (▲) imobilizados em nanopartículas magnéticas.



Assim como observado para a lipase imobilizada em alginato de cálcio, a enzima imobilizada em nanopartículas magnéticas apresentou maior estabilidade de sua atividade lipolítica em temperaturas elevadas quando comparada à enzima livre. Esse resultado reforça, mais uma vez, que os suportes podem melhorar significativamente as propriedades das enzimas imobilizadas, conforme destacado por Sheldon e Pelt (2013).

Badoei-Dalfard *et al.* (2019) relataram altas atividades enzimáticas para lipases imobilizadas em nanopartículas magnéticas na faixa de 30 °C a 50 °C, com estabilidade térmica preservada até 70 °C. De forma semelhante, Jambuligam *et al.* (2019) confirmaram a estabilidade térmica para lipases imobilizadas em nanopartículas magnéticas em uma ampla faixa de temperatura (20 °C – 80 °C). Miao *et al.* (2018), ao imobilizar a Lipase B de *Candida antarctica*, observaram estabilidade térmica consistente entre 30 °C e 65 °C, com pico de atividade em 40 °C. Esses resultados corroboram os dados obtidos neste estudo, reforçando a eficácia do método de imobilização em nanopartículas magnéticas.

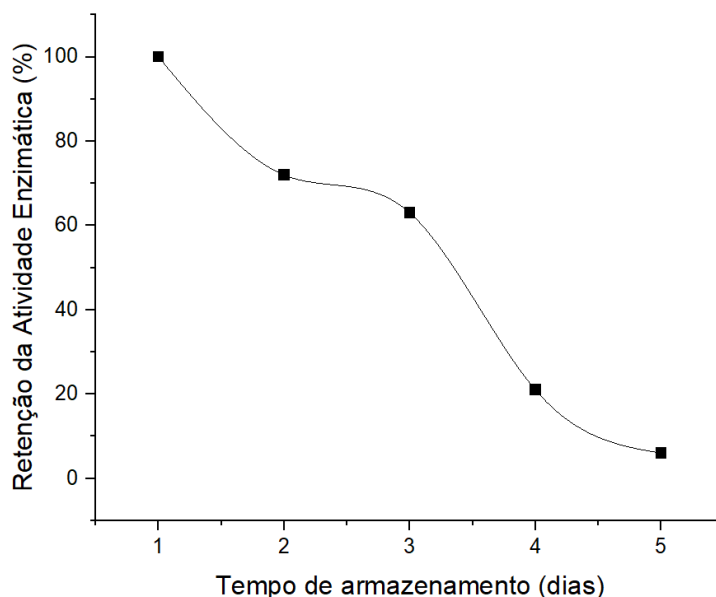
Além disso, com o uso do modelo matemático Gaussiano, foi possível construir uma curva e formular uma equação que descreve o comportamento enzimático em diferentes temperaturas para a lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas. A equação obtida não apenas confirmou a estabilidade térmica da enzima, mas também permitiu identificar a temperatura específica de 46,3 °C para a atividade máxima. Essas informações são essenciais para a otimização das condições operacionais e para um controle mais preciso das reações enzimáticas em aplicações industriais. As equações derivadas, apresentadas a seguir, oferecem uma base sólida para maximizar a eficiência e o rendimento nos processos catalíticos.

A Equação 19 descreve o ajuste da estabilidade térmica do extrato lipolítico imobilizado em nanopartículas magnéticas:

$$y = -73,40 + 6.786,11 \cdot e^{\frac{-x}{46,3}}$$

Para avaliar a estabilidade durante o armazenamento dos extratos enzimáticos após o processo de imobilização, monitorou-se a atividade enzimática no meio reacional (sobrenadante) ao longo de 5 dias (Figura 20).

Figura 20 - Estabilidade do extrato lipolítico precipitado imobilizado em partículas magnéticas durante o armazenamento a 3 °C.



Observa-se que a estabilidade da atividade lipolítica do extrato precipitado imobilizado em nanopartículas magnéticas durante o armazenamento foi inferior à observada para o extrato precipitado imobilizado no outro suporte avaliado neste estudo. Após 5 dias de estocagem, a atividade de lipase caiu 94%.

Outros estudos também investigaram a estabilidade de armazenamento de lipases imobilizadas em partículas magnéticas, apresentando resultados distintos. Miao *et al.* (2018) relataram uma estabilidade de 56% da atividade enzimática após 7 dias de armazenamento do biocatalisador imobilizado, enquanto Badoei-Dalfard *et al.* (2019) e Jambuligam *et al.* (2019) observaram estabilidade da atividade enzimática superior a 24 dias.

Entretanto, é importante destacar que esses estudos utilizaram enzimas purificadas, o que contribui para uma maior estabilidade durante o armazenamento, bem como uma ligação mais robusta ao suporte, resultando em uma imobilização mais eficiente. Essa diferença na pureza da enzima utilizada pode explicar, em parte, a menor estabilidade observada neste trabalho.

4.6 Produção de Biodiesel

4.6.1 Transesterificação Enzimática com Metanol

Inicialmente, a partir do planejamento experimental que visava avaliar os efeitos da proporção álcool: óleo, do tipo de matéria-prima (óleo de soja, resíduo de óleo), bem como

comparar o extrato enzimático fúngico com a enzima comercial sobre o rendimento de biodiesel, utilizando metanol, foram obtidos os resultados demonstrados na Tabela 12.

Ao avaliar os resultados obtidos a partir da transesterificação enzimática utilizando o metanol como álcool de cadeia curta, observa-se que o maior rendimento obtido foi o do experimento 8, onde utilizou-se o óleo de soja, o extrato enzimático fúngico e a proporção 2:1 (metanol:óleo). Entretanto, esses resultados não possuem diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparados aos experimentos 1, 2, 4 e 5. Assim, o experimento 4, foi considerado o mais promissor, tendo em vista o uso do resíduo de óleo de fritura e o extrato enzimático do fungo *E. endophytica*, cujo rendimento foi de 90,64%.

Tabela 12 - Rendimentos de biodiesel obtidos a partir da transesterificação enzimática do óleo de soja (O.S) e do resíduo de óleo de fritura (R.O), comparando o uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *Endomelanconiopsis endophytica* (E.E) com o da enzima comercial (lipase de *Candida rugosa* – E.C) em diferentes proporções de metanol: matéria-prima. As reações foram realizadas a 40 °C, durante 360 min, com 3% (m/m) de biocatalisador.

Experimentos	Parâmetros			Rendimento (%)
	Matéria-prima	Enzima	Proporção álcool: óleo	
1	O.S	E.C	2:1	91,14^a ± 0,56
2	R.O	E.C	2:1	91,64^a ± 0,46
3	R.O	E.E	2:1	89,95 ^b ± 0,94
4	R.O	E.E	3:1	90,64^a ± 1,15
5	O.S	E.C	3:1	91,65^a ± 0,55
6	O.S	E.E	3:1	88,92 ^c ± 1,38
7	R.O	E.C	3:1	88,05 ^c ± 0,63
8	O.S	E.E	2:1	92,43^a ± 0,50

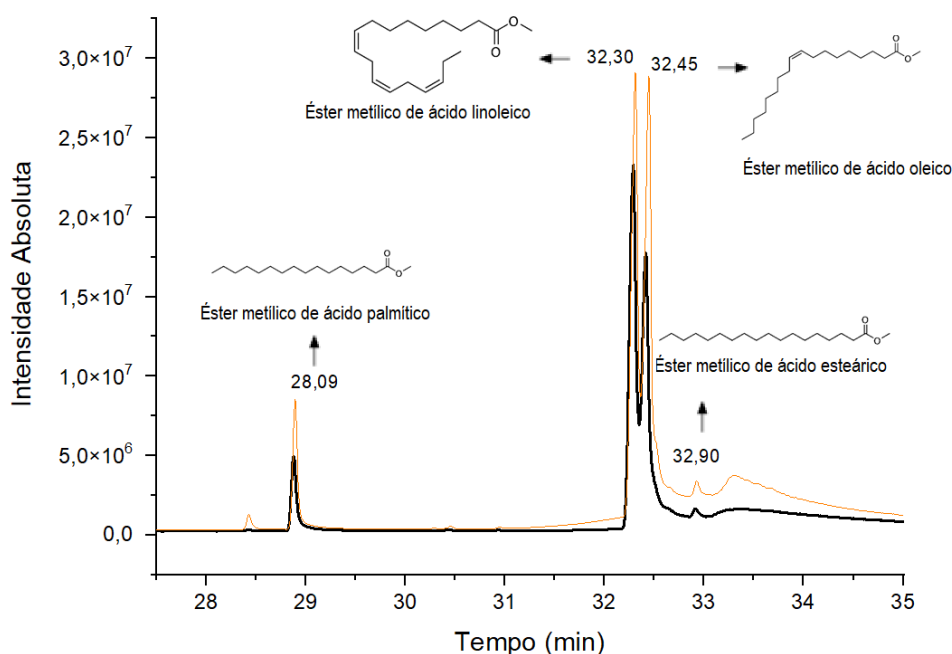
Letras diferentes indicam que há diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os maiores valores de rendimento estão em negrito.

Na Figura 21 é possível observar o cromatograma das amostras de biodiesel obtidas nos ensaios 4 e 8. Os ésteres metílicos provenientes das reações biocatalíticas foram

identificados como o éster de ácido linoleico (tempo de retenção = 32,30 min), produzido em maior quantidade e o éster de ácido oleico (tempo de retenção = 32,45 min).

Também foi possível identificar o éster de ácido palmítico (tempo de retenção = 28,09 min) e em menor proporção, o éster de ácido esteárico (tempo de retenção = 32,90 min). Vazquez *et al.* (2023) também relataram concentrações predominantes de ésteres de ácido oleico e linoleico ao utilizar lipase de *Leonotis nepetifolia* como biocatalisador, tanto na transesterificação de óleo de soja quanto na do resíduo de óleo de fritura, corroborando os resultados apresentados neste estudo.

Figura 21 - Cromatogramas de amostras de biodiesel produzido por transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura (Ensaio 4, em vermelho) e do óleo de soja (Ensaio 8, em preto), a partir do uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *Endomelanconopsis endophytica*. A proporção metanol:resíduo foi de 2:1 e de metanol:óleo foi de 3:1. As reações foram realizadas a 40 °C durante 360 min.



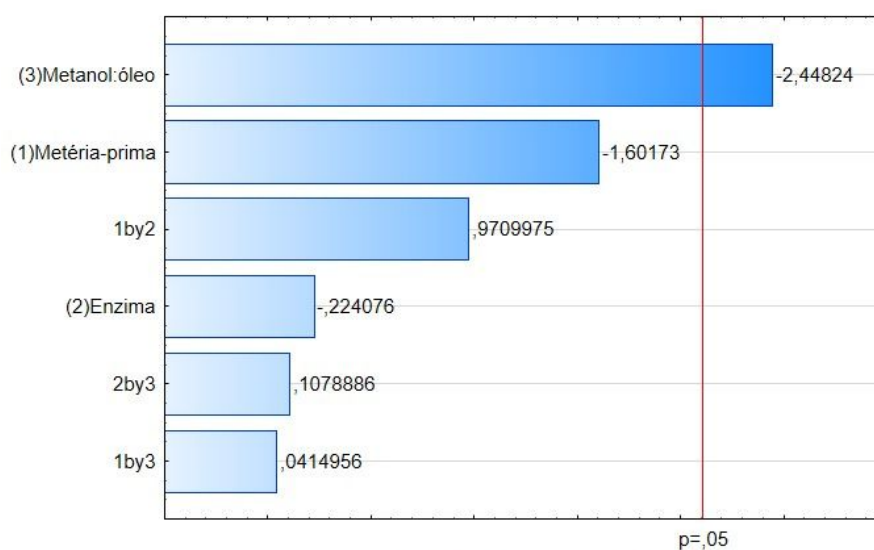
As variáveis estudadas por meio do planejamento experimental apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) sobre o rendimento de biodiesel, sendo a proporção metanol:

matéria-prima o fator independente com maior efeito sobre o rendimento (Figura 22), ou seja, menores proporções promoveram a obtenção de maiores rendimentos de biodiesel.

Segundo Geris *et al.* (2007), para uma transesterificação estequiometricamente completa, uma proporção molar de 3:1 álcool: triacilglicerídeo é necessária. Entretanto, devido ao caráter reversível da reação, o agente transesterificante (álcool) geralmente é adicionado em excesso nessas reações, contribuindo assim para aumentar o rendimento do éster, bem como permitir a sua separação do glicerol formado. Contudo, o excesso de álcool pode prejudicar a atividade enzimática, pois pode desestabilizar a estrutura da enzima, comprometendo sua conformação tridimensional e, conseqüentemente, sua função catalítica (REN *et al.*, 2013).

Além disso, o álcool pode atuar como um inibidor não competitivo da enzima, ou seja, ele se liga a locais diferentes do sítio ativo enzimático, interferindo na sua capacidade de se ligar ao substrato e realizar a catálise. Essas interações indesejadas entre o álcool e a enzima podem resultar em uma redução significativa da atividade enzimática (JOSÉ *et al.*, 2011; AGUIEIRAS *et al.*, 2013). Por isso, é essencial evitar o excesso de álcool na reação biocatalítica, a fim de preservar a estrutura e a função correta do biocatalisador, garantindo a eficiência no processo de transesterificação (QUEIROZ *et al.*, 2014).

Figura 22 - Gráfico de Pareto obtido a partir da transesterificação enzimática do óleo de soja e do resíduo de óleo de fritura, em diferentes proporções metanol:matéria-prima, comparando-se o uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *E. endophytica* e o da enzima comercial (lipase de *Candida rugosa*).



Os rendimentos de biodiesel obtidos a partir do extrato enzimático do fungo *E. endophytica* QAT_7AC utilizando metanol são comparáveis aos de outros estudos que utilizaram reações de transesterificação biocatalítica mediadas por lipase (Tabela 13) (YAN *et al.*, 2011; TAHER *et al.*, 2017; PARANDI *et al.*, 2022; VAZQUEZ *et al.*, 2023).

O extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico amazônico possibilitou a obtenção de rendimentos comparáveis aos obtidos com a lipase comercial de *C. rugosa*, enzima que passou por processo de purificação. Além disso, quando comparados com os resultados obtidos por outros autores, os valores de rendimento aqui obtidos mostram-se promissores, visto que se obteve 92,43% utilizando o extrato enzimático fúngico, resultado semelhante ao obtido em estudos que utilizaram enzimas purificadas para a reação biocatalítica (PARANDI *et al.*, 2022; TAHER *et al.*, 2017).

Tabela 13 - Rendimentos de biodiesel obtidos por transesterificação biocatalítica em diferentes condições reacionais com a utilização de metanol.

Matéria-prima	Condições reacionais (T; A:O; t)	Biocatalisador	Rendimento (%)	Referência
Óleo de soja	34 °C; 3:1; 8 h	Lipase de <i>Leonotis nepetifolia</i>	74,50	Vazquez <i>et al.</i> (2023)
Resíduo de óleo	40 °C; 4:1; 30 h	Lipase B de <i>C. antarctica</i> imobilizada	96,00	Parandi <i>et al.</i> (2022)
Resíduo de óleo	40 °C; 4:1; 4 h	Lipase de <i>Geotrichum</i> sp.	85,00	Yan <i>et al.</i> (2011)
Resíduo de óleo	50 °C; 6:1; 4 h	Lipase comercial Novozyme®435	72,00	Taher <i>et al.</i> (2017)
Resíduo de óleo	40 °C; 3:1; 6h	Extrato lipolítico de <i>E. endophytica</i>	90,64	Este estudo
Óleo de Soja	40 °C; 2:1; 6h	Extrato lipolítico de <i>E. endophytica</i>	92,43	Este estudo

T = Temperatura da reação; A:O = Proporção metanol: óleo; t = tempo de reação.

4.6.2 Transesterificação Enzimática com Etanol

A partir do planejamento experimental, que visava avaliar os efeitos da proporção álcool: óleo, do tipo de matéria-prima (óleo de soja, resíduo de óleo), além de comparar o extrato enzimático fúngico com a enzima comercial sobre o rendimento de biodiesel, utilizando etanol, foram obtidos os resultados demonstrados na Tabela 14.

Ao avaliar os resultados obtidos a partir da transesterificação enzimática utilizando o etanol como álcool de cadeia curta, observa-se que o maior rendimento obtido foi o do experimento 5, onde utilizou-se o óleo de soja, a enzima comercial e a proporção 3:1 (etanol: óleo). Entretanto, esses resultados não possuem diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparados aos experimentos 3 e 4. Assim, os experimentos 3 e 4 foram considerados os mais promissores, tendo em vista o uso do resíduo de óleo de fritura e o extrato enzimático do fungo *E. endophytica*, cujos rendimentos foram 92,39% e 92,73% respectivamente.

Tabela 14 - Rendimentos de biodiesel obtidos a partir da transesterificação enzimática do óleo de soja (O.S) e do resíduo de óleo de fritura (R.O), comparando o uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *Endomelanconiosis endophytica* (E.E) com o da enzima comercial (lipase de *Candida rugosa* – E.C) em diferentes proporções de etanol: matéria-prima. As reações foram realizadas a 40 °C, durante 360 min, com 3% (m/m) de biocatalisador.

Ensaio	Parâmetros			Rendimento (%)
	Matéria-prima	Enzima	Proporção álcool: óleo	
1	O.S	E.C	2:1	89,42 ^b ± 1,05
2	R.O	E.C	2:1	89,50 ^b ± 0,55
3	R.O	E.E	2:1	92,39^a ± 0,11
4	R.O	E.E	3:1	92,42^a ± 0,07
5	O.S	E.C	3:1	92,73^a ± 0,06
6	O.S	E.E	3:1	90,15 ^b ± 0,10
7	R.O	E.C	3:1	90,16 ^b ± 0,08
8	O.S	E.E	2:1	90,02 ^b ± 0,90

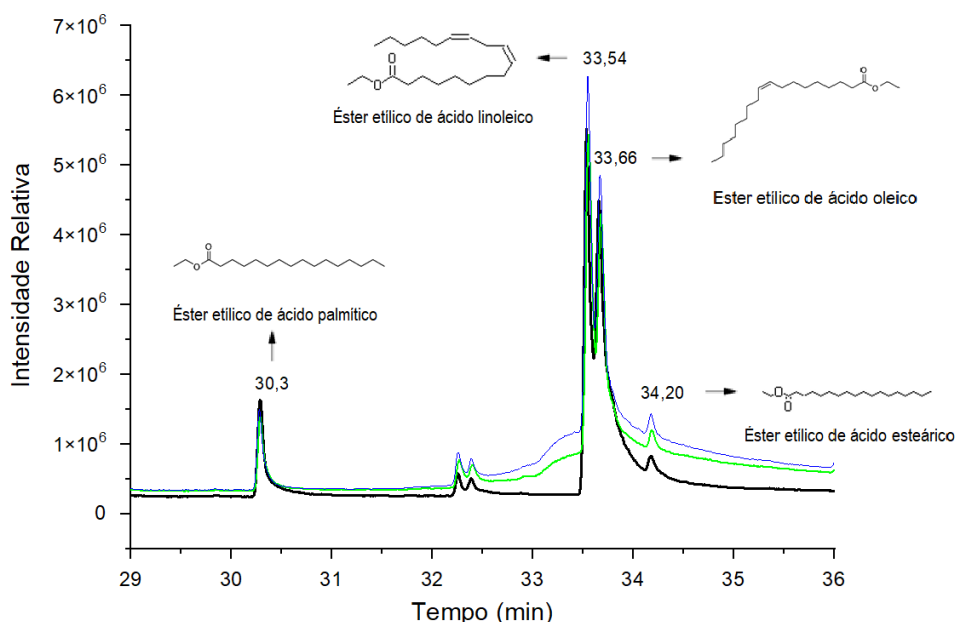
Letras diferentes indicam que há diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os maiores valores de rendimento estão em negrito.

Na Figura 23 é possível observar o cromatograma das amostras de biodiesel obtidas nos ensaios 3, 4 e 5. O éster de ácido linoleico (tempo de retenção = 33,54 min) foi produzido em maior quantidade, seguido pelo éster de ácido oleico (tempo de retenção = 33,66 min).

Também foi possível identificar o éster de ácido palmítico (tempo de retenção = 30,30) e em menor proporção, o éster de ácido esteárico (tempo de retenção = 34,20 min).

Abdulla et al. (2022) também identificaram os principais ésteres etílicos na produção de biodiesel, destacando-se o oleato de etila como o mais abundante, seguido pelo palmitato de etila e, por último, o linoleato de etila, produzido em menor quantidade. Os autores observaram que o ácido graxo é convertido em éster etílico durante o processo de transesterificação, gerando os compostos linoleato de etila, oleato de etila e palmitato de etila. Este comportamento é consistente com os resultados obtidos no presente estudo, evidenciando a predominância de oleato de etila, seguido pelos outros dois ésteres.

Figura 23 - Cromatogramas de amostras de biodiesel produzido por transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura, a partir do uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *E. endophytica* (Ensaio 3, em azul e ensaio 4, em verde) e da transesterificação do óleo de soja, a partir do uso da enzima comercial – lipase de *Candida rugosa* (Ensaio 5, em preto). A proporção etanol: matéria prima foi de 2:1 (Ensaio 3) e de 3:1 (Ensaio 4 e 5). As reações foram realizadas a 40 °C durante 360 min.



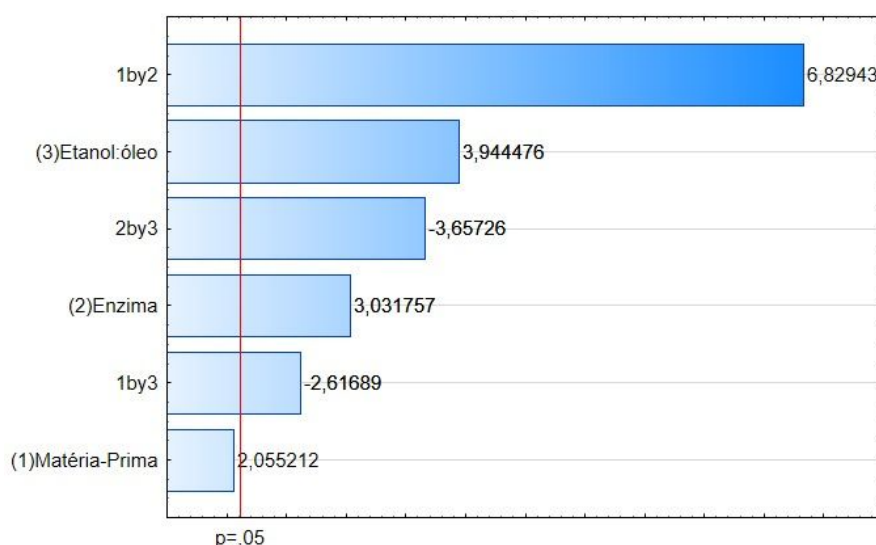
As variáveis estudadas por meio do planejamento experimental apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) sobre o rendimento de biodiesel, sendo a proporção etanol: matéria-prima o fator independente com maior efeito sobre o rendimento (Figura 24). Nesse

caso, ao contrário do observado para os experimentos com metanol, maiores proporções etanol: matéria-prima promoveram a obtenção de maiores rendimentos de biodiesel. Esse resultado corrobora os obtidos por Rodrigues *et al.* (2023) e Ren *et al.* (2013), onde foi observado que o uso de maiores proporções de etanol proporcionou maiores rendimentos de biodiesel.

A interação entre os fatores matéria-prima e enzima apresenta o maior efeito significativo sobre o rendimento de biodiesel. Verifica-se, portanto, que a transesterificação do resíduo de óleo de fritura mediada pelo extrato enzimático de *E. endophytica* na presença de etanol é a condição reacional que produz biodiesel com maior eficiência. Além disso, verifica-se a influência positiva do aumento da proporção etanol: matéria-prima sobre a reação, ou seja, as reações em que se utilizou a proporção 3:1 promoveram a obtenção de maiores rendimentos.

Contudo, a interação entre o tipo de biocatalisador a proporção etanol: matéria prima apresenta efeito negativo, mostrando que a enzima comercial com maiores proporções de etanol: matéria prima tem-se maiores rendimentos de biodiesel. A interação matéria-prima e proporção etanol: matéria prima, também apresentou um efeito negativo para esta reação, mostrando que com o uso do óleo de soja associado a maiores proporções etanol: matéria prima, obtém-se maiores rendimentos de biodiesel.

Figura 24 - Gráfico de Pareto obtido a partir da transesterificação enzimática do óleo de soja e do resíduo de óleo de fritura, em diferentes proporções etanol: matéria-prima, comparando-se o uso do extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *E. endophytica* e o da enzima comercial (lipase de *Candida rugosa*).

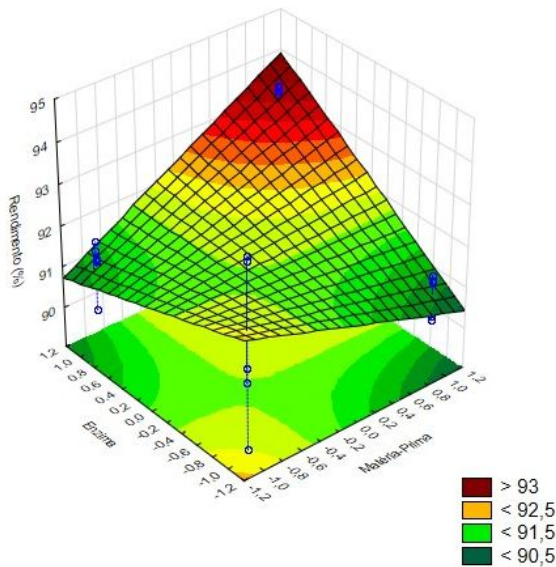


As interações entre as variáveis estudadas e sua influência sobre o rendimento de biodiesel podem ser visualizadas nos gráficos de superfície de resposta (Figura 25).

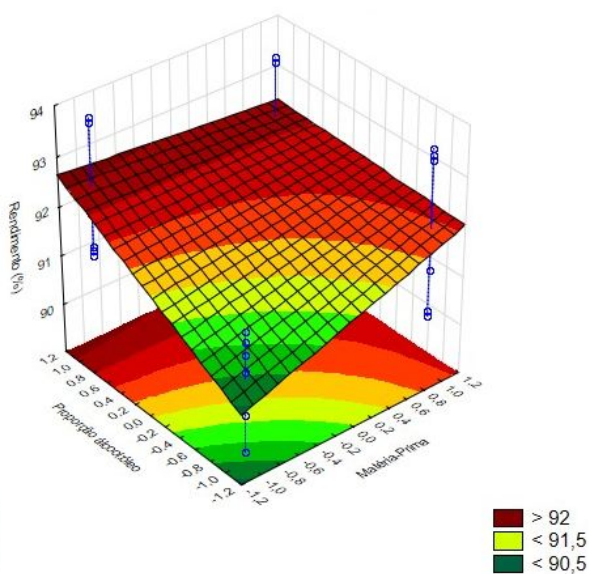
Os rendimentos de biodiesel obtidos a partir do uso do extrato enzimático do fungo *E. endophytica* são comparáveis aos de outros estudos que utilizaram reações de transesterificação biocatalítica mediada por lipase, utilizando o etanol (SILVA, 2016; AGUIEIRAS *et al.*, 2017; AGUIEIRAS *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2011; RAITA *et al.*, 2011). Na Tabela 15 estão demonstrados os rendimentos de biodiesel obtidos com a transesterificação de diferentes matérias-primas oleosas em diferentes condições reacionais.

Figura 25 – Superfícies de resposta para o rendimento de biodiesel em função da matéria-prima – óleo de soja (-1) e resíduo de óleo (-1); do tipo de enzima – enzima comercial (-1) e extrato enzimático fúngico (+1); e da proporção etanol: matéria prima – 2:1 (-1) e 3:1 (+1). Em (a): matéria-prima versus tipo de enzima; em (b) proporção etanol: óleo versus a matéria-prima; e em (c) o tipo de enzima versus a proporção etanol: óleo.

a)



b)



c)

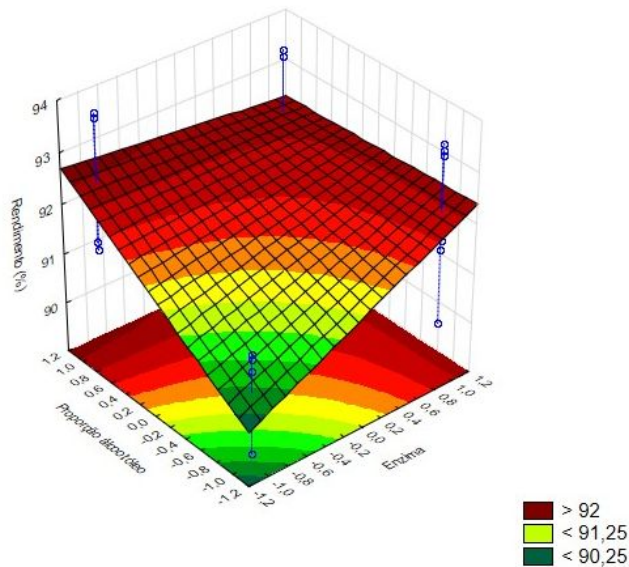


Tabela 15 - Rendimentos de biodiesel obtidos por transesterificação biocatalítica em diferentes condições reacionais com a utilização de etanol.

Matéria-prima	Condições reacionais (T; A:O; t)	Biocatalisador	Rendimento (%)	Referência
---------------	----------------------------------	----------------	----------------	------------

Óleo de soja	37 °C; 1:1; 2 h	Lipase de <i>T. lanuginosus</i>	85,00	Silva (2015)
Óleo de macaúba	37 °C; 1:1; 2 h	Lipase de <i>T. lanuginosus</i>	71,00	Silva (2015)
Óleo de soja	45 °C; 3:1; 6 h	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	74,00	Aguieras <i>et al.</i> (2017)
Óleo de macaúba	40 °C; 2:1; 8 h	Lipase de <i>R. miehei</i>	91,00	Aguieras <i>et al.</i> (2014)
Óleo de oliva	30 °C; 1:1; 3 h	Lipase de <i>Candida</i> sp.	80,00	Li <i>et al.</i> (2011)
Óleo de dendê	50 °C; 4:1; 6 h	Lipase comercial Novozyme®435	87,20	Raita <i>et al.</i> (2011)
Resíduo de óleo	40 °C; 10:1; 32 h	Lipase de <i>C. rugosa</i> imobilizada	85,70	Abdulla <i>et al.</i> (2022)
Resíduo de óleo	40 °C; 3:1; 6 h	Extrato lipolítico de <i>E. endophytica</i>	92,73	Este estudo
Óleo de Soja	40 °C; 3:1; 6 h	Extrato lipolítico de <i>E. endophytica</i>	90,15	Este estudo

T = Temperatura da reação; A:O = Proporção etanol: óleo; t = tempo de reação.

Novamente, o extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico amazônico possibilitou a obtenção de rendimentos comparáveis aos obtidos com a lipase comercial de *C. rugosa*, enzima que passou por processo de purificação. Quando comparados com os resultados obtidos por outros autores, os valores de rendimento aqui obtidos mostram-se promissores, visto que se obteve 92,73% utilizando o extrato enzimático fúngico, resultado semelhante ao obtido em estudos que utilizaram enzimas purificadas para a reação biocatalítica com etanol (AGUIEIRAS *et al.*, 2014; ABDULLA *et al.*, 2022).

4.6.3 Transesterificação Enzimática – Avaliação do Tempo de Reação e de Maiores Proporções Álcool: Resíduo de Óleo de Fritura

Considerando o desempenho promissor do sistema biocatalítico fúngico na produção de biodiesel a partir da transesterificação do resíduo de óleo de fritura, avaliou-se por meio de um planejamento experimental a influência de outros parâmetros que afetam o rendimento da transesterificação, como o tempo de reação e o tipo de álcool, utilizando maiores proporções de álcool: resíduo. Os resultados obtidos em cada ensaio estão dispostos na Tabela 16.

Tabela 16 - Rendimentos de biodiesel obtidos a partir da transesterificação do resíduo de óleo de fritura catalisada pelo extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC em diferentes condições reacionais.

Experimento	Parâmetros			Rendimento (%)
	Tempo (min)	Álcool: resíduo de óleo	Álcool	
1	120	3:1	Metanol	86,50 ^b ± 0,19
2	360	3:1	Metanol	89,57^a ± 0,60
3	120	4:1	Metanol	83,83 ^c ± 0,55
4	360	4:1	Metanol	81,43 ^d ± 0,49
5	120	3:1	Etanol	85,15 ^{b,c} ± 0,95
6	360	3:1	Etanol	89,29^a ± 0,22
7	120	4:1	Etanol	89,19^a ± 0,53
8	360	4:1	Etanol	89,50^a ± 0,60

Letras diferentes indicam que há diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os rendimentos de biodiesel variaram entre 81,43% e 89,57%, o que confirma o bom desempenho do sistema biocatalítico utilizado nas reações de transesterificação. Na Tabela 16 observa-se que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os experimentos 2, 6, 7 e 8 em termos de rendimento. Nota-se também que destes, apenas o experimento 2 foi realizado com metanol.

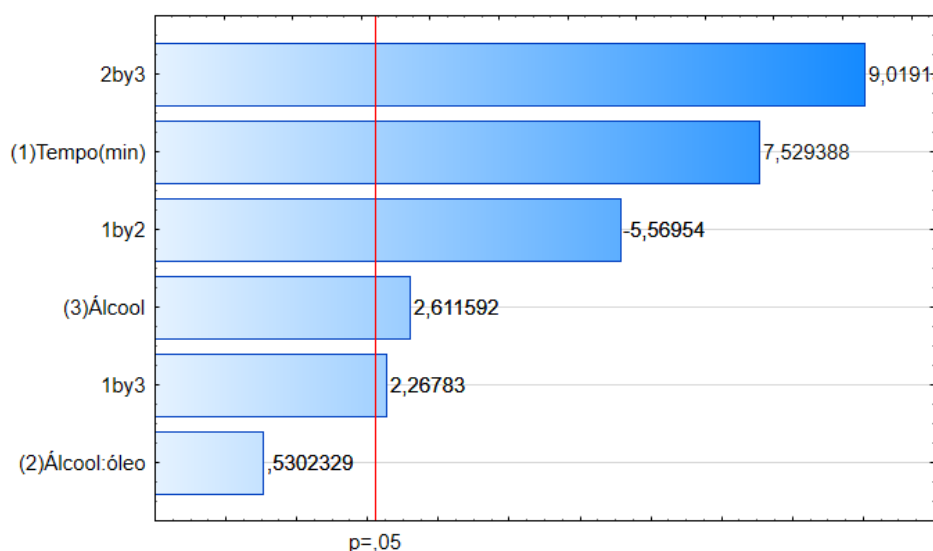
O metanol é amplamente empregado como solvente e reagente na produção de biodiesel por transesterificação enzimática. Sua alta reatividade permite a conversão rápida dos triglicerídeos em ésteres metílicos, resultando em um processo eficiente e de rápida execução (NIELSEN *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2021). Em um estudo conduzido por Rosset *et al.* (2017) sobre a proporção de metanol e óleo na produção de biodiesel, obteve-se um rendimento de 62,5% ao utilizar a proporção de 3:1. Por sua vez, Muanruksa e Kaewkannetra (2020) obtiveram um rendimento de 91,3% nas mesmas condições utilizando uma lipase comercial.

As variáveis estudadas por meio do planejamento experimental apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) sobre o rendimento de biodiesel, sendo o tempo de reação o fator independente com maior efeito sobre o rendimento (Figura 26), ou seja, os maiores tempos de reação foram favoráveis para obtenção de maiores rendimentos de biodiesel. Esses resultados estão alinhados com as conclusões de Souza *et al.* (2016), que identificaram as lipases de *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia cepacia* como os biocatalisadores mais

eficientes na síntese de biodiesel. O estudo destacou que, ao otimizar o tempo de reação, ambos os biocatalisadores alcançaram rendimentos máximos de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE) em 72 horas, com valores de 91,1% e 98,3%, respectivamente, enfatizando a importância do controle do tempo de reação para maximizar a eficiência no processo de transesterificação catalisado por lipases.

Por outro lado, verifica-se na Tabela 16 que ao se utilizar uma proporção de etanol de 4:1, tanto em um tempo de reação de 120 quanto de 360 minutos, foram obtidos rendimentos equivalentes. Esses resultados indicam, portanto, que com maiores proporções de álcool: resíduo, o aumento do tempo de reação não se faz necessário para o sistema biocatalítico empregado no presente estudo.

Figura 26 - Gráfico de Pareto obtido a partir da transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura catalisada pelo extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC.



O tempo da reação é uma variável importante de se avaliar a fim de garantir a conversão dos triglicerídeos em ésteres metílicos ou etílicos. Um tempo de reação insuficiente pode levar a uma baixa conversão de ésteres, enquanto um tempo de reação excessivo pode levar à formação de subprodutos indesejados, o que pode reduzir a qualidade do biodiesel produzido (YAN *et al.*, 2011). Parandi *et al.* (2022) utilizaram metanol na produção de biodiesel, avaliando o tempo de reação, entre 12 e 36 horas, com o maior rendimento após 30 h (1800 minutos), um tempo de reação bem acima do avaliado no presente estudo.

O tipo de álcool também influenciou de forma significativa ($p < 0,05$) o rendimento de biodiesel, sendo que o etanol é preferível ao uso do metanol. O emprego da rota etílica em

substituição ao uso do metanol na produção do biodiesel é importante, pois os ésteres etílicos apresentam diversas vantagens sobre os metílicos, como maior índice de cetano, maior estabilidade oxidativa, menor índice de iodo e melhores propriedades de lubrificidade; além disso, a rota etílica produz biodiesel 100% renovável e melhor balanço energético por tratar-se de um combustível sintetizado a partir de fermentação de biomassa, além das vantagens da não-toxicidade e biodegradabilidade (ALMEIDA *et al.*, 2016).

A proporção alcoólica, ou seja, a quantidade de metanol ou etanol utilizada em relação ao resíduo de óleo, também é um fator importante a ser considerado na produção de biodiesel. Entretanto, este fator, individualmente, não apresentou significância estatística (Figura 26). As interações entre as variáveis estudadas podem ser visualizadas nos gráficos de superfície de resposta (Figura 27).

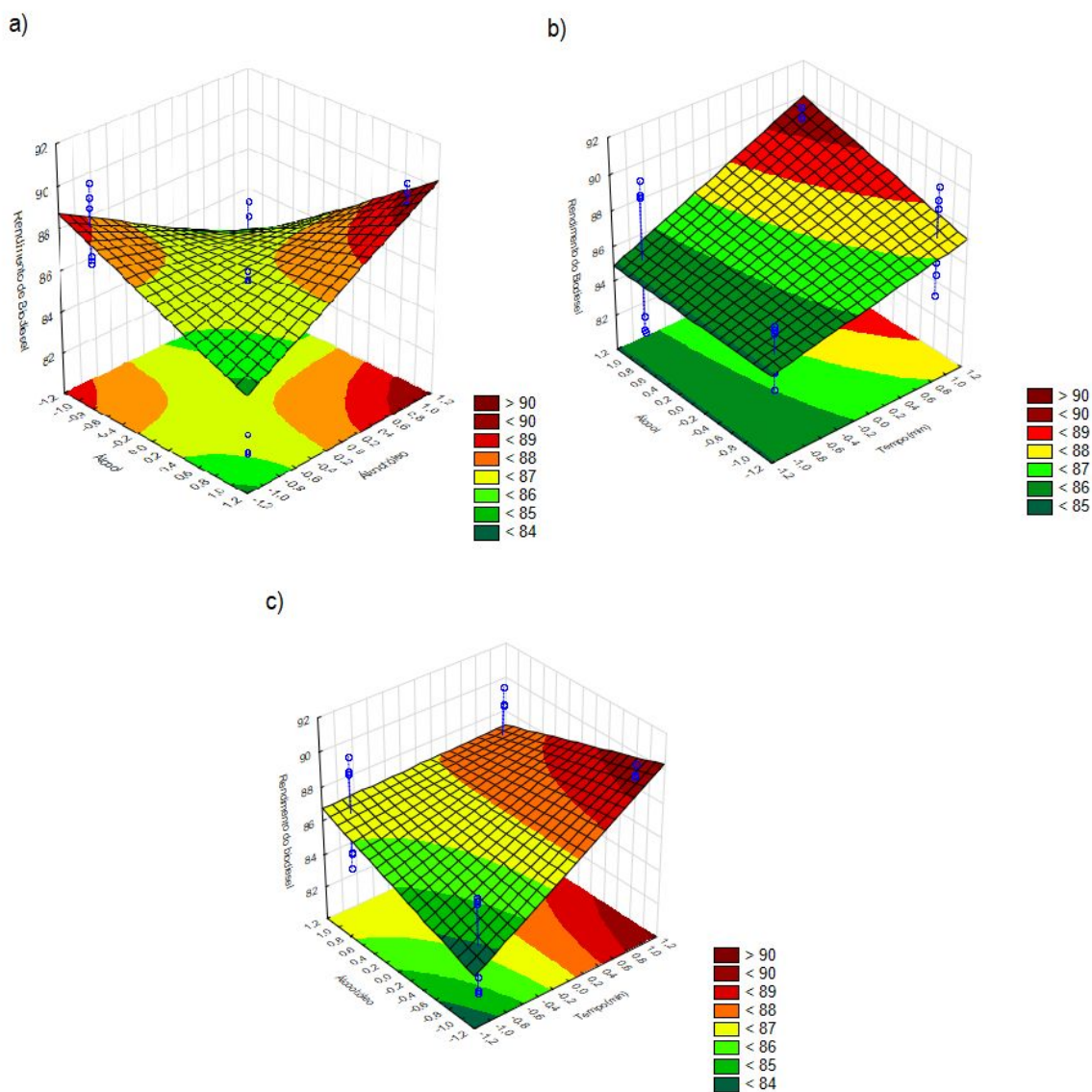
A interação entre a proporção álcool: resíduo de óleo e o tipo de álcool é a que possui maior influência sobre o rendimento de biodiesel (Figura 27a). A proporção adequada do álcool a ser utilizado pode garantir a alta eficiência da reação e minimizar a formação de subprodutos indesejados. No entanto, é importante avaliar a influência da proporção alcoólica nessas diferentes condições experimentais.

Em proporções mais elevadas, para o metanol, é possível observar a diminuição do rendimento do biodiesel, resultado que corrobora os obtidos por Rosset *et al.* (2017). Esse comportamento pode ser atribuído a um efeito inibitório do metanol sobre a lipase, acelerando a desnaturação da enzima e, conseqüentemente, prejudicando o rendimento do processo. Já Ren, Li e Liu (2013) demonstraram que a proporção de etanol: óleo para a conversão de biodiesel utilizando lipase como biocatalisador pode ser aumentada até 4:5.

Além disso, ao compararmos os resultados obtidos neste estudo com outras metodologias que empregaram resíduo de óleo de cozinha para a produção de biodiesel, observamos rendimentos similares ou superiores. Corral-Bobadilha *et al.* (2022) alcançaram um rendimento máximo de 92,7% utilizando a catálise alcalina. Lin *et al.* (2020) e Peng *et al.* (2018) obtiveram rendimentos máximos de 87,3% e 87,8%, respectivamente, ao adotarem o óxido de cálcio como catalisador em um sistema de aquecimento por micro-ondas.

Adicionalmente, Banchapattanasakda *et al.* (2023) atingiram um rendimento máximo de 81,7% com pirolise direta e 83,5% ao utilizar carvão ativado como catalisador. Esses resultados reforçam a eficácia da metodologia de biocatálise empregada neste estudo, demonstrando que ela proporciona rendimentos comparáveis aos obtidos com metodologias clássicas e com os obtidos em outras pesquisas.

Figura 27 - Superfície de resposta para o rendimento de biodiesel em função do tempo de reação – 120 min (-1) e 360 min (+1); da proporção álcool: resíduo de óleo – 3:1 (-1) e 4:1(+1); e do tipo de álcool – metanol (-1) e etanol (+1). Em (a) a proporção álcool: resíduo de óleo versus o tipo de álcool; em (b) o tempo de reação versus o tipo de álcool; e em (c) o tempo de reação versus a proporção álcool: resíduo de óleo.



A partir da análise estatística, foi possível verificar que, neste estudo, o uso de etanol resultou em um aumento significativo no rendimento do biodiesel, como pode ser observado no diagrama de Pareto da Figura 24.

A função multivariada que descreve o rendimento de biodiesel para a transesterificação do resíduo de óleo com etanol, considerando o tempo de reação e a proporção álcool: resíduo de óleo está apresentada na Equação 20 ($R^2 = 0,98167$).

$$y = 42,93 + 0,12x_1 + 11,52x_2 - 0,03x_1x_2 \quad (20)$$

Onde:

y = Rendimento de biodiesel (%)

x₁ = Tempo em minutos (variando de 120 a 360 minutos);

x₂ = Número de mols de álcool na proporção álcool: resíduo de óleo (variando entre 3 e 4 mols);

Anwar *et al.* (2018) conduziram um estudo sobre a produção de biodiesel a partir do óleo de *Carica papaya* e investigaram a relação entre a porcentagem de biodiesel em blendas, a carga e a rotação do motor. Os autores desenvolveram uma função multivariada que forneceu respostas importantes para os testes de motores.

Assim, a função multivariada desenvolvida neste estudo representa uma ferramenta útil para se prever o rendimento do processo de transesterificação. Ao considerar simultaneamente o tempo de reação e a razão álcool: resíduo de óleo, o modelo permite compreender as complexas interações entre essas variáveis e seu impacto no resultado. O tempo de reação é um fator crítico que influencia a formação de ésteres etílicos, enquanto a proporção entre álcool e óleo residual tem um papel fundamental na determinação da quantidade de biodiesel produzido e na atuação enzimática. Ao sintetizar esses elementos em uma função conjunta, pesquisadores e profissionais podem prever com maior precisão o rendimento do processo de transesterificação sob diferentes condições experimentais.

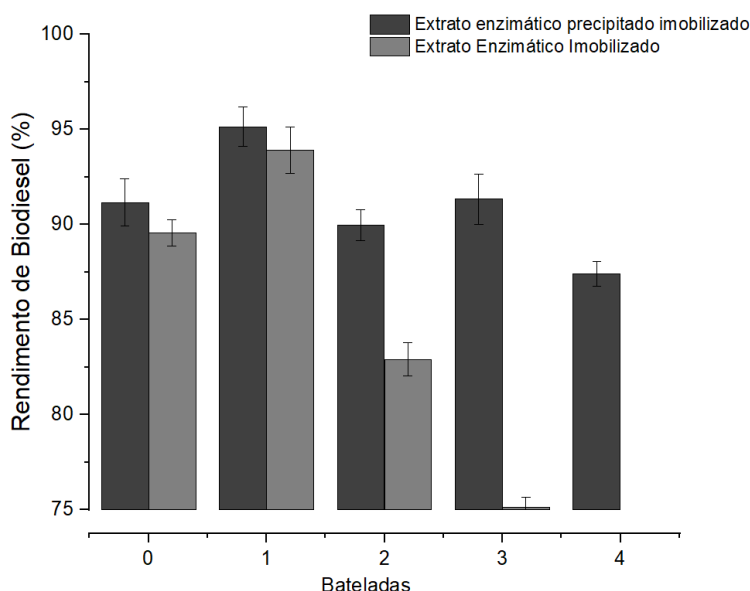
Os resultados obtidos por meio do planejamento experimental destacam a importância dessa etapa na avaliação da eficiência da produção de biodiesel e na determinação das condições ideais de reação para garantir maiores rendimentos do biocombustível. Além disso, os resultados apontam que a utilização do etanol para a produção de biodiesel é mais adequada, o que é uma vantagem quando se consideram os benefícios ambientais associados à escolha do etanol, contribuindo para a redução da dependência de combustíveis fósseis e a diminuição das emissões de gases de efeito estufa, fortalecendo assim a sustentabilidade do processo de produção de biodiesel. Portanto, os resultados evidenciam não apenas a eficiência da produção de biodiesel utilizando a enzima produzida pelo fungo endofítico, mas também a possibilidade de se alcançar um processo sustentável.

4.6.4 Produção de Biodiesel com o Extrato Lipolítico Imobilizado em Alginato de Cálcio

Utilizando os parâmetros reacionais que levaram à obtenção do maior rendimento de biodiesel (proporção álcool: óleo 3:1 e tempo de 360 min), o biocombustível foi produzido utilizando o extrato enzimático e o extrato enzimático precipitado imobilizados em alginato de cálcio, para avaliar a possibilidade de sua reutilização. Os rendimentos obtidos para os diferentes ciclos reacionais estão dispostos na Figura 28.

Conforme mostrado na Figura 28, o primeiro aspecto a ser destacado é o aumento no rendimento do biodiesel ao se empregar os biocatalisadores imobilizados, em comparação com os extratos lipolíticos utilizados na forma livre (batelada 0). O rendimento do biodiesel foi de 93,91% ao se empregar o extrato lipolítico imobilizado e de 95,15% ao se utilizar o extrato precipitado imobilizado. Outros estudos também comprovaram o aumento no rendimento de biodiesel ao se utilizar a enzima imobilizada ao invés da enzima livre, destacando a vantagem da imobilização para processos de produção de biodiesel (KNEZEVIC *et al.*, 2002; BHUSHAN *et al.*, 2008; ZHONG *et al.*, 2020).

Figura 28 - Rendimentos de biodiesel obtidos através da reutilização do extrato enzimático de *Endomelanconopsis endophytica* QAT_7AC e do extrato enzimático precipitado imobilizados em alginato de cálcio na transesterificação do resíduo de óleo de fritura com etanol. Os rendimentos obtidos com os extratos não imobilizados referem-se à batelada 0.



Os rendimentos de biodiesel se mantiveram acima de 75% após três ciclos de reação ao se usar o extrato enzimático imobilizado, com uma diminuição na eficiência de cerca de 20%, em comparação com o primeiro ciclo. Com o extrato precipitado imobilizado, o rendimento permaneceu acima de 87% após 4 ciclos reacionais, reduzindo menos de 10% em

comparação com o primeiro ciclo de reação. No entanto, a atividade enzimática do extrato lipolítico precipitado imobilizado diminuiu cerca de 90% no último ciclo de reação (Tabela 17).

Essa queda na atividade enzimática também foi observada por Knezevic *et al.* (2002), que utilizaram a lipase de *C. rugosa* imobilizada em alginato de cálcio por seis ciclos para a produção de biodiesel. Os autores observaram uma redução na atividade enzimática de 83,3% ao final do sexto ciclo.

Tabela 17 - Rendimento de biodiesel e atividade enzimática retida após a reutilização do extrato enzimático de *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC e do extrato enzimático precipitado imobilizados em alginato de cálcio na transesterificação do resíduo de óleo de fritura com etanol.

Batelada	Extrato enzimático imobilizado		Extrato enzimático precipitado imobilizado	
	Rendimento	Atividade enzimática retida (%)	Rendimento	Atividade enzimática retida (%)
0*	89,57	100,0	91,16	100,0
1	93,91	67,0	95,15	100,0
2	82,92	55,2	89,98	85,0
3	75,13	11,8	91,34	73,2
4	NR	NR	87,43	18,1

*Batelada 0 = resultados obtidos com os extratos não imobilizados. NR = Não realizado.

Por outro lado, Bhushan *et al.* (2008) imobilizaram a lipase produzida por *Arthrobacter sp.* em alginato de cálcio e conseguiram reutilizá-la por 10 ciclos na hidrólise de triacilglicerídeos. A enzima de *Arthrobacter sp.* imobilizada mostrou aumento na estabilidade térmica, de pH e de armazenamento em comparação com a enzima livre. Vetrano *et al.* (2022) observaram excelente reciclabilidade da lipase de *C. rugosa* imobilizada em alginato de cálcio, que apresentou atividade enzimática residual superior a 80% no décimo ciclo de reação.

Zhong *et al.* (2020) relataram o uso da enzima imobilizada em alginato de cálcio por até seis ciclos em reação de hidrólise, enquanto Kareem *et al.* (2020) mostraram que a lipase de *A. niger* alcançou um rendimento máximo de biodiesel de 96,9%, podendo ser reutilizado por até 12 ciclos.

Embora os extratos lipolíticos imobilizados de *E. endophytica* mostrem potencial como biocatalisadores para produção de biodiesel, há espaço para melhorias. Uma

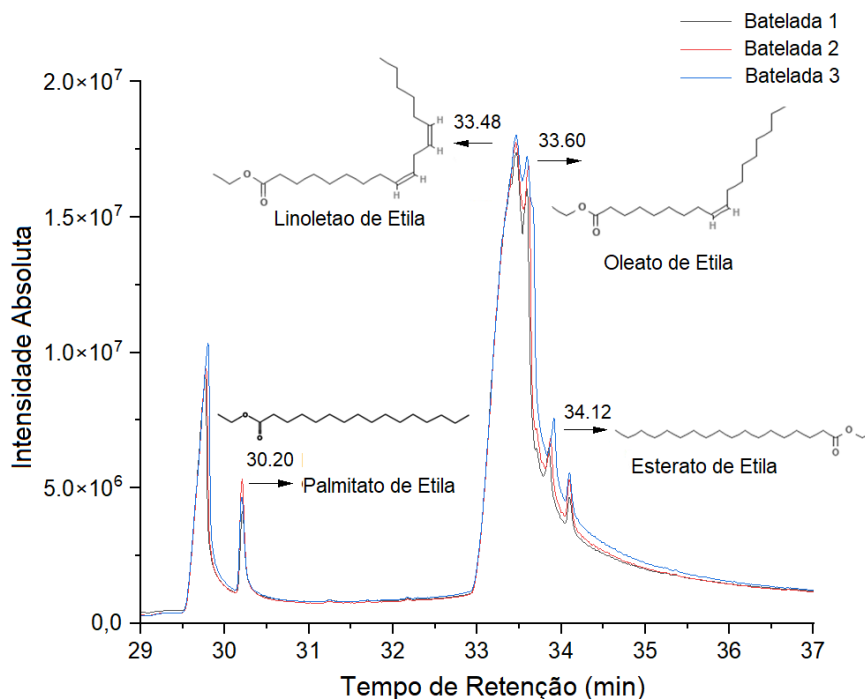
possibilidade seria a combinação da imobilização com técnicas de estabilização, como suportes híbridos (alginato de cálcio e nanopartículas magnéticas), conforme descrito no trabalho de Zhao *et al.* (2021). A adição de polietilenoglicol (PEG) cria uma rede densa, protegendo a enzima, minimizando a lixiviação e permitindo mais ciclos reacionais com alta eficiência. Essa abordagem é promissora para aprimorar o desempenho e a longevidade dos biocatalisadores.

Além disso, é importante destacar que o presente estudo utilizou extratos enzimáticos brutos e precipitados imobilizados, o que pode ter influenciado nos resultados, especialmente em comparação com outros trabalhos que empregaram enzimas purificadas e imobilizadas e que conseguiram reutilizar os biocatalisadores por mais ciclos reacionais (CHATTOPADHYAY *et al.*; 2013; POPPE *et al.*, 2015; ALNOCH *et al.*, 2020).

Contudo, a metodologia utilizada no presente estudo demonstra um grande potencial, evidenciando que a enzima produzida pelo fungo endofítico amazônico pode alcançar rendimentos comparáveis aos das enzimas comerciais. Além disso, o uso de etanol como álcool de cadeia curta também se destaca, tornando a reação mais sustentável, reforçando o impacto ecológico positivo e a relevância do estudo.

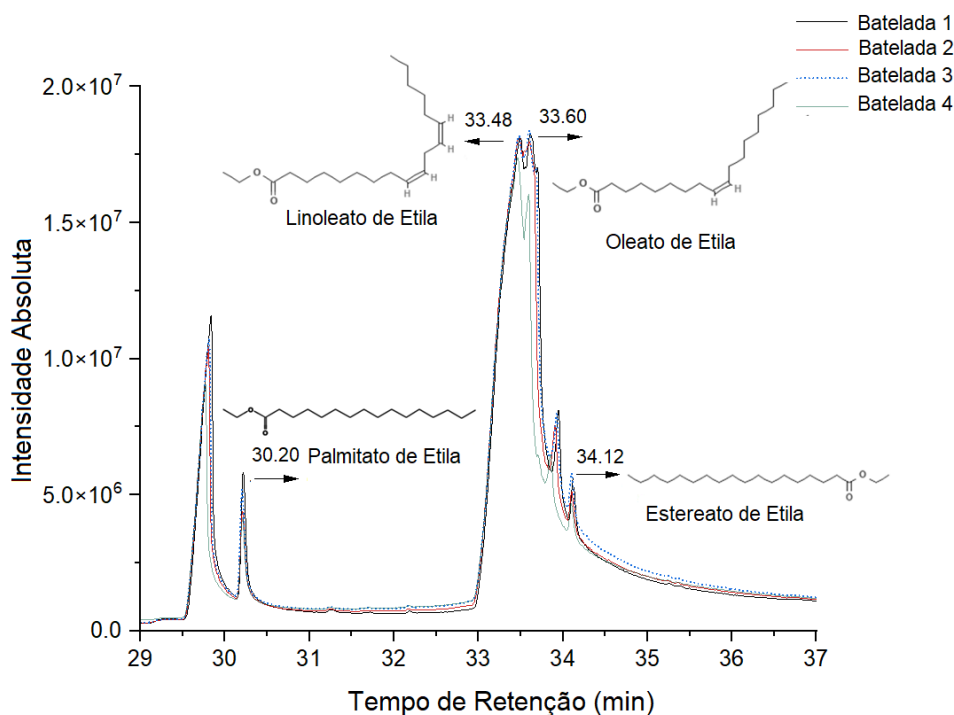
Nas Figuras 29 e 30 é possível observar os cromatogramas das amostras de biodiesel obtidas a partir da transesterificação enzimática do resíduo de óleo de cozinha com etanol, utilizando o extrato enzimático imobilizado e o extrato enzimático precipitado imobilizado, respectivamente.

Figura 29 - Cromatogramas de amostras de biodiesel produzido por transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura com etanol, com reutilização do extrato lipolítico de *Endomelanconiopsis endophytica* imobilizado em alginato de cálcio. As reações foram realizadas a 40 °C durante 360 min, com a proporção etanol: resíduo de óleo de fritura de 3:1.



Com ambos os biocatalisadores imobilizados, o éster de ácido linoleico (tempo de retenção = 33,48 min) foi produzido em maior quantidade, seguido do éster de ácido oleico (tempo de retenção = 33,60 min). Também foi possível identificar o éster de ácido palmítico (tempo de retenção = 30,20) e, em menor proporção, o éster de ácido esteárico (tempo de retenção = 34,12 min).

Figura 30 - Cromatogramas de amostras de biodiesel produzido por transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura com etanol, com reutilização do extrato lipolítico precipitado de *Endomelanconiosis endophytica* imobilizado em alginato de cálcio. As reações foram realizadas a 40 °C durante 360 min, com a proporção etanol: resíduo de óleo de fritura de 3:1.



Para fins de comparação, foi realizada a transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura pré-tratado com etanol, utilizando o extrato lipolítico precipitado imobilizado em alginato de cálcio. Nessa condição, obteve-se um rendimento de 93,8% na conversão de biodiesel, valor superior ao obtido com o resíduo de óleo de fritura não tratado. Esse aumento no rendimento pode ser atribuído ao pré-tratamento do resíduo, que reduz a presença de impurezas e ácidos graxos livres (AGL), minimizando reações indesejadas, como a saponificação, e facilitando a interação entre o biocatalisador e os triglicerídeos, resultando em uma reação mais eficiente e uma maior conversão em biodiesel (Bizerra *et al.*, 2016).

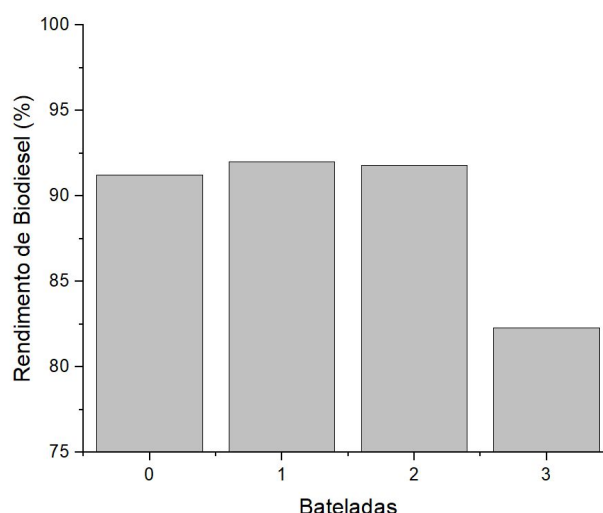
Outros estudos corroboram essa observação. Outili *et al.* (2021) analisaram pré-tratamentos de óleo de fritura utilizando adsorção com carvão ativado e esterificação ácida com metanol e ácido sulfúrico, ambos eficazes na redução de AGL, facilitando a transesterificação subsequente. Além disso, Asri *et al.* (2015) demonstraram que o uso de adsorvente de fibra de coco no pré-tratamento de óleo residual de fritura resultou em uma redução significativa de AGL, melhorando a qualidade do óleo para a produção de biodiesel.

Esses estudos evidenciam que pré-tratamentos adequados são essenciais para aumentar a eficiência da produção de biodiesel a partir de óleos residuais.

4.6.5 Produção de Biodiesel com o Extrato Lipolítico Imobilizado em Nanopartículas Magnéticas

Utilizando os parâmetros reacionais que levaram à obtenção do maior rendimento de biodiesel (proporção álcool: óleo 3:1 e tempo de 360 min), o biocombustível foi produzido utilizando o extrato enzimático e o extrato enzimático precipitado imobilizados em nanopartículas magnéticas, para avaliar a possibilidade de sua reutilização. Os rendimentos obtidos em cada ciclo reacional estão dispostos na Figura 31.

Figura 31 - Rendimentos de biodiesel obtidos através da reutilização do extrato enzimático precipitado de *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC imobilizado em nanopartículas magnéticas na transesterificação do resíduo de óleo de fritura com etanol. Os rendimentos obtidos com os extratos não imobilizados referem-se à batelada 0.



Observa-se na Figura 31 o alto rendimento de biodiesel obtido ao se utilizar o extrato lipolítico precipitado imobilizado em nanopartículas magnéticas (92,02%), ligeiramente superior ao obtido com o extrato na forma livre (91,16%, batelada 0). Estudos realizados por outros pesquisadores também demonstraram altos rendimentos de biodiesel ao se empregar enzimas imobilizadas, em comparação com enzimas livres.

Cruz-Isquierdo *et al.* (2014) relataram um rendimento de 92% após 72 horas de reação em condições semelhantes aos deste estudo. Thangaraj *et al.*, (2016) alcançaram rendimentos superiores a 90% no primeiro ciclo de reação, enquanto Jambuligam *et al.*, (2019) obtiveram

um rendimento máximo de 84% utilizando lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas. Esses resultados corroboram os dados obtidos neste trabalho, reforçando a eficiência da imobilização enzimática na produção de biodiesel.

Foi possível reutilizar o extrato lipolítico imobilizado em nanopartículas magnéticas por até três ciclos de reação, com os dois primeiros ciclos apresentando rendimentos superiores a 90%. Porém, ao término do segundo ciclo, identificou-se uma redução de 61% na atividade enzimática, que chegou a 94% ao final do terceiro ciclo (Tabela 18). Essa redução pode ter sido causada pela agitação mecânica, somada à fraca interação entre a enzima e o suporte, resultando na liberação da enzima no meio reacional, comprometendo assim a continuidade do processo (ZHON *et al.*, 2020).

Tabela 18 - Rendimento de biodiesel e atividade enzimática retida após a reutilização do extrato enzimático precipitado de *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC imobilizado em nanopartículas magnéticas na transesterificação do resíduo de óleo de fritura com etanol.

Batelada	Enzima precipitada imobilizada	
	Rendimento (%)	Atividade enzimática retida (%)
0*	91,25	100
1	92,0	50
2	91,8	39
3	82,3	6

*Batelada 0 = resultados obtidos com o extrato precipitado não imobilizado.

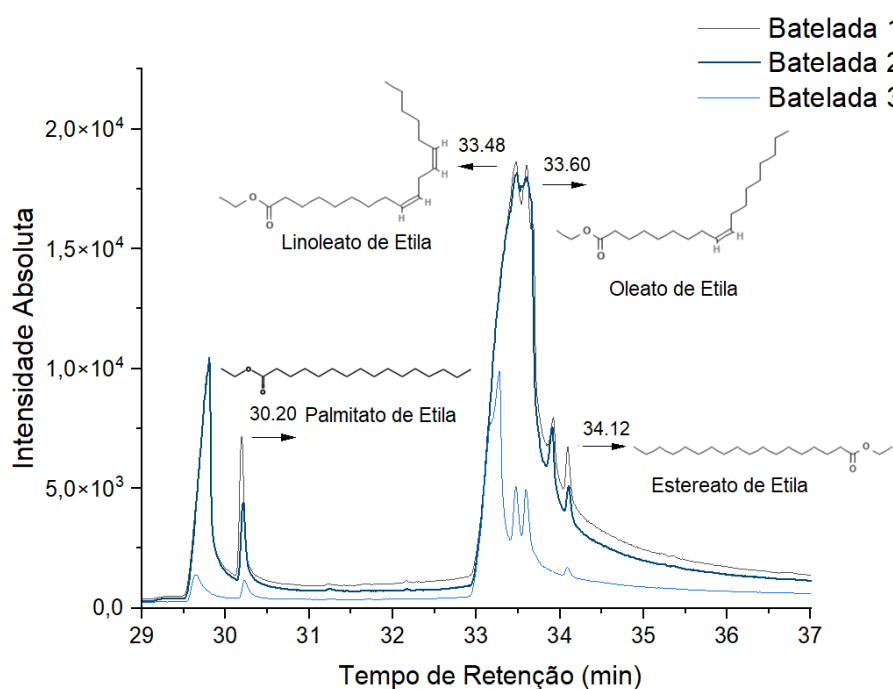
Outros estudos apresentam resultados semelhantes quanto ao reuso do biocatalisador imobilizado na produção de biodiesel. Thangaraj *et al.* (2016) relataram o uso da enzima imobilizada por até quatro ciclos, com um rendimento de apenas 20% no último ciclo. Miao *et al.* (2018) utilizaram lipases imobilizadas em nanopartículas magnéticas por até cinco ciclos, alcançando um rendimento de 70% no último ciclo. Já Badoei-Dalfard *et al.* (2019) comprovaram ser possível a utilização de lipase imobilizada em até seis ciclos de reação.

É importante ressaltar que no presente estudo foram utilizados extratos enzimáticos precipitados, ou seja, as lipases foram pré-purificadas. A utilização de enzimas purificadas possivelmente aumentaria os rendimentos de obtenção do biodiesel e também poderia prolongar significativamente o número de ciclos de reutilização dos biocatalisadores imobilizados em nanopartículas magnéticas, otimizando assim o processo.

Na Figura 32 é possível observar os cromatogramas das amostras de biodiesel obtido a partir da transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura com etanol, utilizando o extrato lipolítico precipitado imobilizado em nanopartículas magnéticas.

Verifica-se que o éster de ácido linoleico (tempo de retenção = 33,48 min) foi produzido em maior quantidade, seguido do éster de ácido oleico (tempo de retenção = 33,60 min). Também foi possível identificar o éster de ácido palmítico (tempo de retenção = 30,20 min) e, em menor proporção, o éster de ácido esteárico (tempo de retenção = 34,12 min). Estes resultados estão de acordo com os observados nas reações realizadas anteriormente.

Figura 32 - Cromatogramas de amostras de biodiesel produzido por transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura com etanol, com reutilização do extrato lipolítico precipitado de *Endomelanconiopsis endophytica* imobilizado em nanopartículas magnéticas. As reações foram realizadas a 40 °C durante 360 min, com a proporção etanol: resíduo de óleo de fritura de 3:1.



O pré-tratamento do óleo de fritura com etanol, seguido da transesterificação enzimática utilizando extrato lipolítico precipitado imobilizado em nanopartículas magnéticas, resultou em um rendimento de 92,7% na conversão para biodiesel. Este valor, embora próximo ao obtido com o resíduo de óleo de fritura não tratado (92%), apresenta um ligeiro aumento, que novamente pode ser atribuído à redução de impurezas e ácidos graxos livres (AGL), proporcionada pelo pré-tratamento. Esse processo minimiza reações indesejadas,

como a saponificação, e melhora a interação entre o substrato e o biocatalisador, otimizando a eficiência da reação (BIZERRA *et al.* 2016).

Apesar da proximidade nos valores de rendimento de biodiesel, o pré-tratamento confere vantagens adicionais, como a potencial redução de desgastes no biocatalisador devido a impurezas, prolongando sua vida útil e contribuindo para a consistência nos ciclos subsequentes de transesterificação. Estudos como os de Outili *et al.* (2021) novamente corroboram essa observação, demonstrando que o pré-tratamento adequado de óleos residuais não apenas aumenta o rendimento da reação, mas também melhoram a qualidade final do biodiesel, reforçando sua viabilidade em aplicações comerciais.

4.7 Caracterização do Biodiesel

As amostras de biodiesel obtidas a partir do planejamento experimental 2³ apresentado na Tabela 4, com o uso de metanol e etanol como álcool de cadeia curta, foram caracterizadas. Avaliou-se o efeito da matéria-prima (óleo de soja e resíduo de óleo de fritura), da proporção álcool: matéria-prima (2:1 e 3:1) e do tipo de biocatalisador (extrato enzimático fúngico e enzima comercial) sobre as características do biodiesel produzido: viscosidade cinemática, massa específica, cinzas, ponto de fulgor e índice de acidez. Os resultados estão dispostos na Tabelas 19, para as reações realizadas com metanol.

Os resultados demonstrados na Tabela 19 revelam que a viscosidade cinemática, a massa específica, o conteúdo de cinzas e o ponto de fulgor das amostras de biodiesel obtidas estão em conformidade com as normas estabelecidas (ANP, 2005). No entanto, o índice de acidez excedeu os limites estabelecidos para todas as amostras. Tal ocorrência pode estar associado à presença de ácidos graxos livres, como consequência da conversão parcial na reação de transesterificação.

Na Figura 33 estão apresentados os diagramas de Pareto, onde podem ser observados os efeitos das variáveis sobre as características físico-químicas do biodiesel produzido a partir da transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura com metanol.

A interação entre o tipo de matéria-prima e a proporção metanol: matéria-prima apresentou efeito estatístico significativo ($p < 0,05$) sobre a viscosidade cinemática (Figura 33a). Verifica-se que as menores proporções metanol: matéria-prima e o uso do óleo de soja, foram as condições que promoveram a obtenção de maiores viscosidades. Segundo Lobo *et al.* (2009), Melo (2014) e Lopes *et al.* (2020), a viscosidade cinemática tende a aumentar devido ao processo de oxidação do biocombustível, que leva à formação de compostos

polares, e à presença de ácidos graxos não consumidos durante a reação, os quais contribuem para a elevação dessa propriedade.

Sabe-se que a proporção adequada do álcool a ser utilizado pode garantir a alta eficiência da reação e minimizar a formação de subprodutos indesejados (ROSSET *et al.*, 2017). Logo, considera-se que as menores proporções metanol: matéria-prima auxiliaram para que a viscosidade cinemática aumentasse. Por outro lado, verifica-se que mesmo com as maiores proporções metanol: matéria-prima, este parâmetro ficou dentro do estipulado pela ANP (2005).

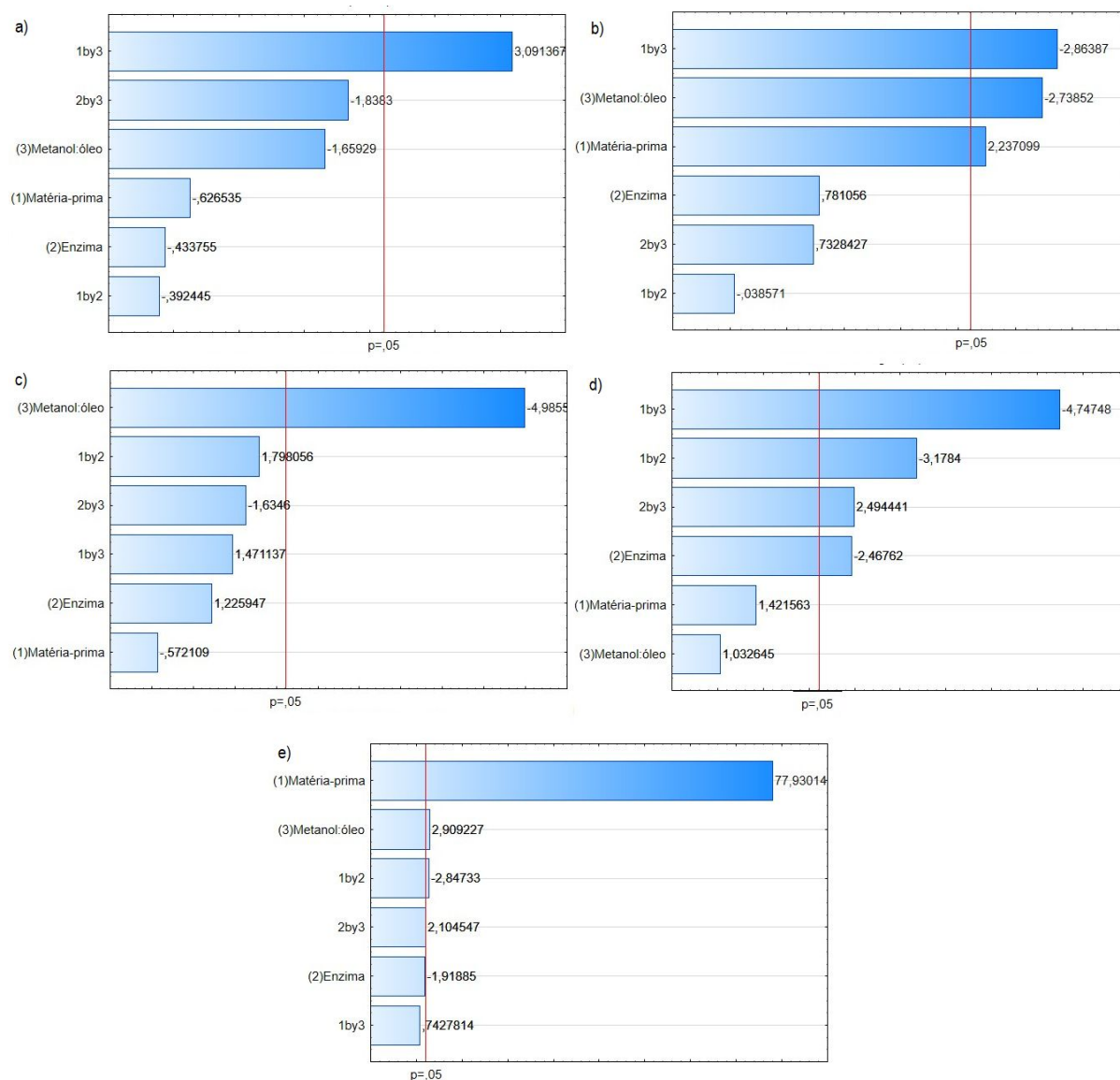
Para a massa específica se observou o efeito significativo da interação entre a matéria-prima e a proporção metanol: matéria-prima, assim como desses fatores individuais (Figura 33b). A proporção metanol: matéria-prima apresentou efeito negativo estatisticamente significativo ($p < 0,05$), ou seja, as menores proporções foram favoráveis para obtenção de maiores massas específicas, corroborando o efeito observado para a viscosidade cinemática. Já a matéria-prima apresentou efeito positivo, ou seja, o uso do resíduo favoreceu o aumento deste parâmetro. Segundo Lobo *et al.* (2009) a massa específica do biodiesel está diretamente ligada com a estrutura de suas moléculas. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica dos ésteres, maior será a densidade. No entanto, este valor decrescerá quanto maior for o número de insaturações presentes na molécula. A presença de impurezas também pode influenciar a massa específica do biodiesel como, por exemplo, álcool residual ou substâncias adulterantes. Assim, espera-se que o uso do resíduo contribua para o aumento da massa específica do biodiesel.

Tabela 19 - Resultados obtidos para a caracterização de amostras de biodiesel obtidas a partir do planejamento experimental 2³, variando-se a matéria-prima oleaginosa, a proporção metanol: óleo e o tipo de biocatalisador. As reações foram realizadas durante 360 min, com 3% (m/v) do biocatalisador, a 40°C.

Ensaio s	Parâmetros			Características				
	Matéria-Prima	Enzima	Proporção metanol: matéria-prima	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Massa específica (kg/m ³)	Cinzas (%)	Ponto de fulgor (°C)	Índice de acidez (mg KOH/g)
1	O.S (-1)	E.C (-1)	2:1 (-1)	3,84	879,3	0,02	112	0,89
2	R.O (+1)	E.C (-1)	2:1 (-1)	3,25	885,0	0,01	125,5	7,27
3	R.O (+1)	E.E (+1)	2:1 (-1)	3,56	896,9	0,02	113,5	6,80
4	R.O (+1)	E.E (+1)	3:1 (+1)	3,29	869,8	0,01	113,7	7,18
5	O.S (-1)	E.C (-1)	3:1 (+1)	3,30	866,8	0,01	117,8	0,81
6	O.S (-1)	E.E (+1)	3:1 (+1)	3,26	882,9	0,01	120,1	1,14
7	R.O (+1)	E.C (-1)	3:1 (+1)	3,85	875,3	0,01	115,9	7,48
8	O.S (-1)	E.E (+1)	2:1 (-1)	3,87	869,2	0,02	111,5	0,71
ANP (2005)				3,0 a 5,0	850 a 900	< 0,02	>100	< 0,50

O.S = Óleo de Soja; R.O = Resíduo de óleo de fritura. E.C = Enzima Comercial (Lipase de *C. rugosa*). E.E = Extrato enzimático de *E. endophytica*.

Figura 33 - Gráficos de Pareto para a caracterização do biodiesel obtido a partir do planejamento experimental 2^3 , variando-se a matéria-prima oleaginosa, a proporção metanol: matéria-prima e o tipo de biocatalisador. (a) Viscosidade cinemática; (b) Massa específica; (c) Cinzas; (d) Ponto de fulgor e (e) Índice de acidez.



Para o teor de cinzas do biodiesel produzido também se observou efeito significativo da proporção metanol: matéria-prima, onde menores proporções aumentaram o teor de cinzas nas amostras (Figura 33c). O ensaio de cinzas sulfatadas visa controlar a quantidade de metais contidos em uma amostra de óleo. Menores quantidades de álcool na transesterificação podem levar ao aumento do teor de cinzas no biodiesel, pois não promovem a diluição e remoção eficaz de compostos inorgânicos, como sais metálicos ou subprodutos da neutralização de ácidos graxos livres. Esses resíduos, como sulfatos ou fosfatos de metais (bário, cálcio,

magnésio, sódio e potássio), permanecem no produto final, contribuindo para o aumento das cinzas (SCHUARÇA e MARTIM, 2014).

O ponto de fulgor foi a característica do biodiesel que sofreu influência significativa de todas as interações entre os fatores avaliados no planejamento experimental, bem como do tipo de biocatalisador utilizado (Figura 33d). Novamente, a combinação de fatores matéria-prima e proporção metanol: matéria-prima foi a interação com maior efeito. Segundo Lobo *et al.* (2009) o ponto de fulgor é a temperatura mínima onde é observada a liberação de vapores de um líquido, em quantidade suficiente para formar uma mistura inflamável com o ar. Para o biodiesel, os valores de ponto de fulgor são consideravelmente mais elevados que os valores encontrados para o diesel mineral. Para o biodiesel puro o valor do ponto de fulgor encontra-se próximo aos 170 °C, porém, mínimas quantidades de álcool adicionadas ao biodiesel ocasionam um decréscimo bastante significativo neste valor, o que prejudica a qualidade do biocombustível. Assim, verifica-se que o excesso de álcool e a conversão parcial em ésteres pode diminuir o ponto de fulgor. Verifica-se ainda que o uso da enzima comercial favoreceu o aumento do ponto de fulgor.

Para o índice de acidez, o principal fator que mostrou efeito significativo foi a matéria-prima, onde o uso do resíduo colaborou para maiores índices de acidez (Figura 33e), resultado já esperado. Segundo Martinelli *et al.* (2022); Muciño *et al.* (2014); Suzihaque *et al.* (2022) e Azahar *et al.* (2016), durante o processo de fritura, os óleos são aquecidos a temperaturas acima de 100 °C e podem ser usados repetidamente, o que leva a uma degradação da qualidade do óleo, pois, durante esse processo, ocorrem reações térmicas, hidrolíticas, oxidativas, polimerização e craqueamento, modificando quimicamente o óleo original. Essas alterações alteram as propriedades do resíduo de óleo, apresentando maior teor de ácidos graxos livres (AGL), o que pode afetar a reação de transesterificação devido ao elevado índice de acidez.

Na Tabela 20 estão apresentados os resultados obtidos para a caracterização do biodiesel produzido por meio da transesterificação enzimática com etanol, modificando-se o tipo de biocatalisador, a matéria-prima oleaginosa e a proporção etanol: matéria-prima

Na Figura 34 estão apresentados os diagramas de Pareto, onde podem ser observados os efeitos das variáveis sobre as características físico-químicas do biodiesel produzido a partir da transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura com etanol.

Com os resultados demonstrados na Tabela 20, novamente revela-se que a viscosidade cinemática, a massa específica, o conteúdo de cinzas e o ponto de fulgor das amostras de biodiesel obtidas estão em conformidade com as normas estabelecidas. Contudo, assim como

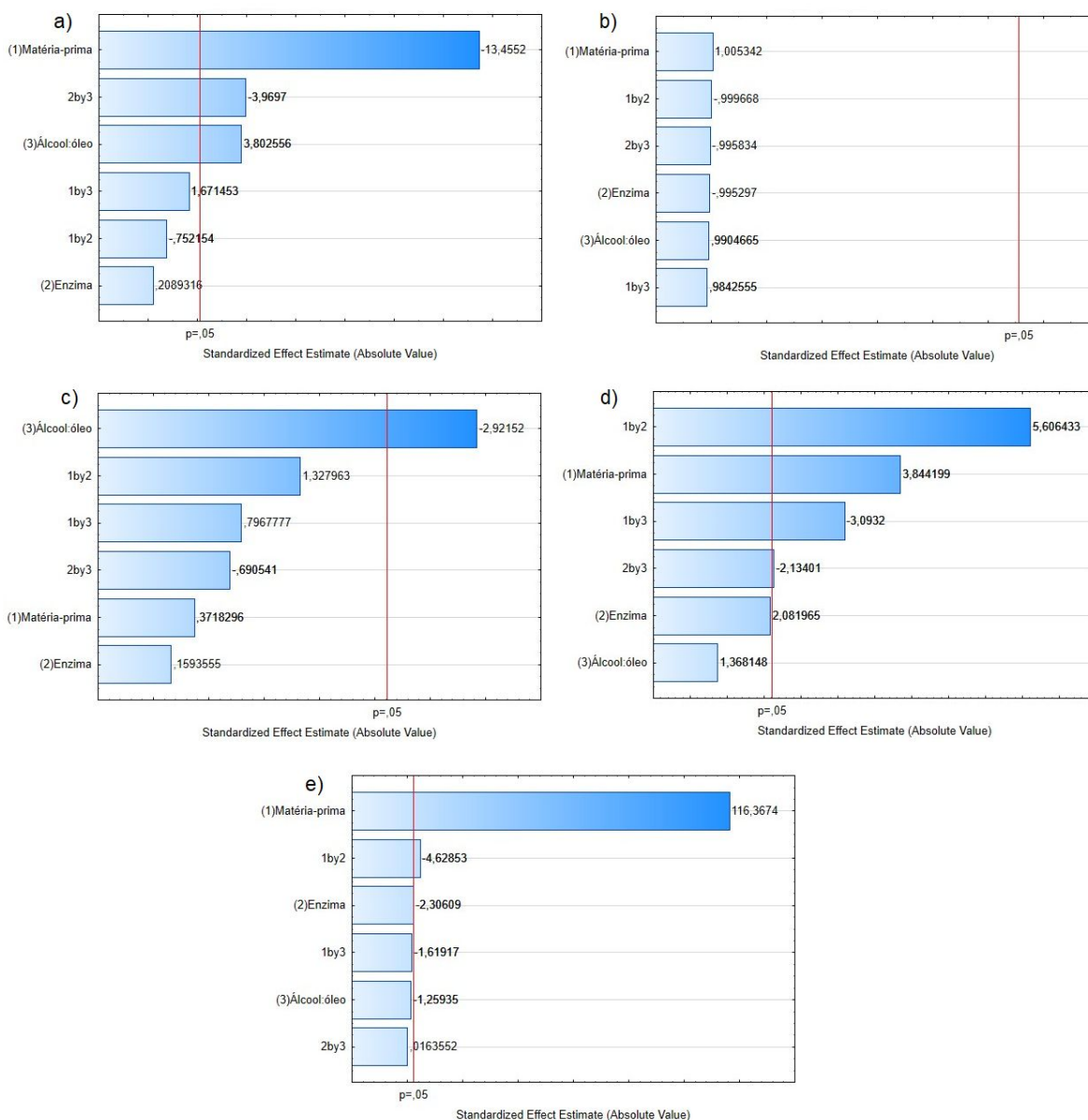
observado para as reações com metanol, o índice de acidez excedeu os limites estabelecidos para todas as amostras (ANP, 2005).

Tabela 20 - Resultados obtidos para a caracterização de amostras de biodiesel obtidas a partir do planejamento experimental 2³, variando-se a matéria-prima oleaginosa, a proporção etanol: óleo e o tipo de biocatalisador. As reações foram realizadas durante 360 min, com 3% (m/v) do biocatalisador, a 40°C.

Ensaio s	Parâmetros			Características				
	Matéria-Prima	Enzima	Proporção Álcool:matéria-prima	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Massa específica (kg/m ³)	Cinzas (%)	Ponto de fulgor (°C)	Índice de acidez (mg KOH/g)
1	OS (-1)	E.C (-1)	2:1 (-1)	3,78	880	0,02	118	0,83
2	RO (+1)	E.C (-1)	2:1 (-1)	3,22	883,4	0,01	125,3	6,94
3	RO (+1)	E.E (+1)	2:1 (-1)	3,33	894,1	0,02	143	6,73
4	RO (+1)	E.E (+1)	3:1 (+1)	3,44	870,2	0,01	139	6,44
5	OS (-1)	E.C (-1)	3:1 (+1)	4,01	871,2	0,01	137,1	0,71
6	OS (-1)	E.E (+1)	3:1 (+1)	3,89	886,9	0,01	120,1	0,97
7	RO (+1)	E.C (-1)	3:1 (+1)	3,57	874,4	0,01	121,9	6,93
8	OS (-1)	E.E (+1)	2:1 (-1)	3,99	870	0,01	119,2	0,81
ANP (2005)				3,0 a 5,0	850 a 900	< 0,02	>100	< 0,50

O.S = Óleo de Soja; R.O = Resíduo de óleo de fritura. E.C = Enzima Comercial (Lipase de *C. rugosa*). E.E = Extrato enzimático de *E. endophytica*.

Figura 34 - Gráficos de Pareto para a caracterização do biodiesel obtido a partir do planejamento experimental 2^3 , variando-se a matéria-prima oleaginosa, a proporção etanol: matéria-prima e o tipo de biocatalisador. (a) Viscosidade cinemática; (b) Massa específica; (c) Cinzas; (d) Ponto de fulgor e (e) Índice de acidez.



A matéria-prima oleaginosa foi o fator que apresentou maior efeito estatístico significativo ($p < 0,05$) sobre a viscosidade cinemática (Figura 34a). Observa-se que, de forma similar às reações realizadas com metanol, o uso de óleo de soja resulta em maiores viscosidades. Esse comportamento pode ser explicado pela presença de ácidos graxos que não foram totalmente consumidos durante a reação, o que também foi relatado nos estudos de Lobo *et al.* (2009), Melo (2014) e Lopes *et al.* (2020).

Nenhum dos fatores avaliados apresentou efeito significativo sobre a massa específica, ao contrário do observado para as reações com metanol, em que a proporção álcool: matéria-prima, bem como esses fatores isoladamente, interferiram nessa característica (Figura 34b). Para cinzas, assim como observado para as reações com metanol, também se observou efeito significativo da proporção etanol: matéria-prima, onde menores proporções aumentaram o teor de cinzas nas amostras (Figura 34c).

O ponto de fulgor foi novamente a característica do biodiesel que sofreu influência significativa de todas as interações entre os fatores avaliados, bem como da matéria-prima utilizada e do tipo de biocatalisador (Figura 34d). A interação entre os fatores matéria-prima e o tipo de biocatalisador foi a de maior efeito significativo, sendo a utilização do resíduo de óleo de fritura e o extrato enzimático responsáveis por um biodiesel com maior temperatura de ponto de fulgor. Segundo Lobo *et al.* (2009), essa interação favorece uma conversão mais eficiente do álcool em biodiesel, resultando em um produto com menor quantidade de álcool residual. Isso contribui para a elevação do ponto de fulgor, refletindo um biodiesel com maior segurança operacional e melhor qualidade para armazenamento e transporte.

Para o índice de acidez, o principal fator que mostrou efeito significativo foi a matéria-prima, onde o uso do resíduo colaborou para maiores índices de acidez (Figura 34e), assim como observado para as reações realizadas com metanol (Figura 33e).

A caracterização do biodiesel também foi realizada para as amostras obtidas a partir do planejamento experimental 2^3 apresentado na Tabela 5 em que se avaliou o tempo de reação para a obtenção do biodiesel a partir do extrato enzimático, a proporção álcool: resíduo de fritura e o tipo de álcool (metanol e etanol), mantendo as condições de 3% (m/v) do biocatalisador. Os resultados estão apresentados na Tabela 21.

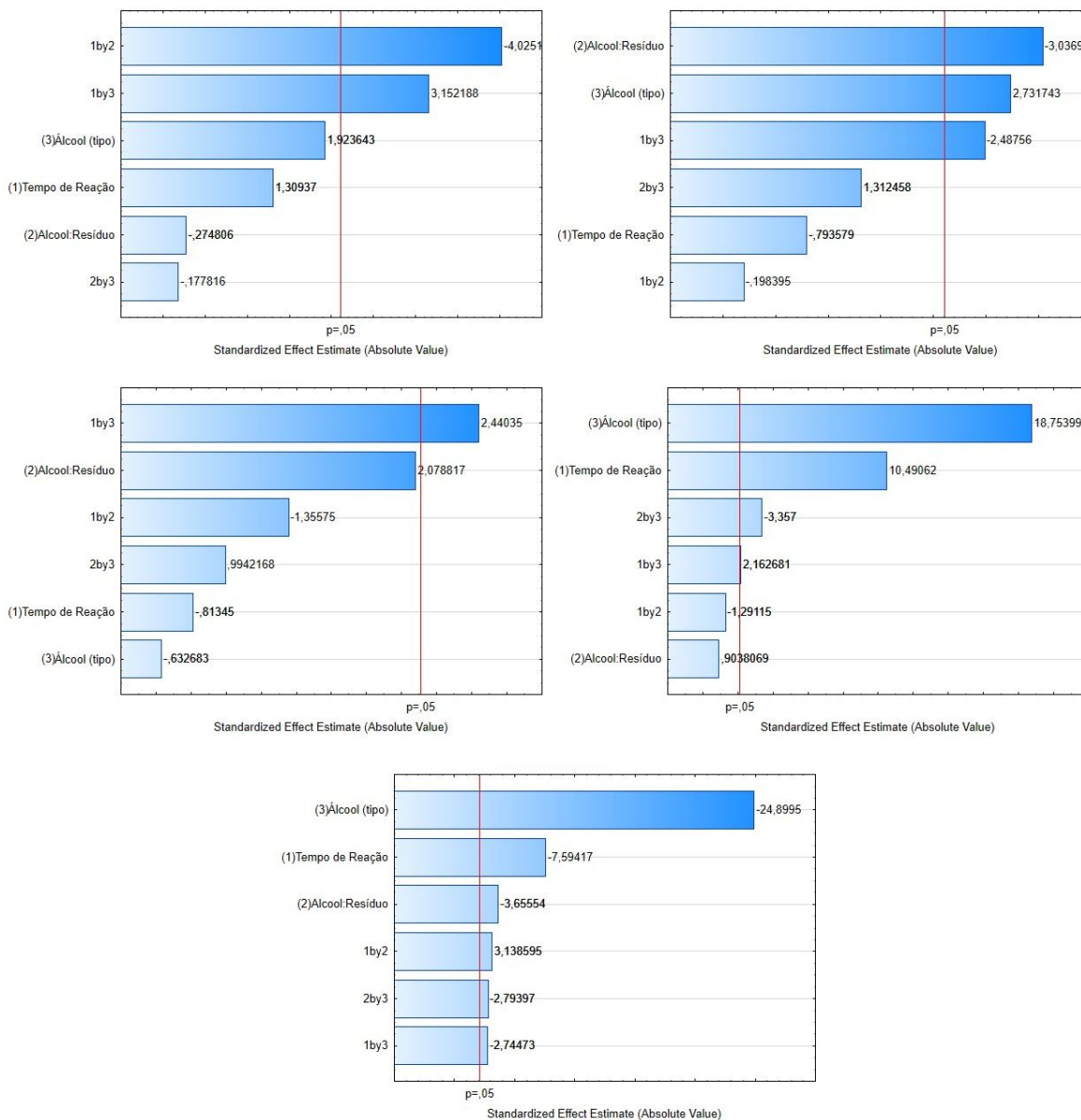
Os resultados demonstrados na Tabela 21 revelam que a viscosidade cinemática, a massa específica, o conteúdo de cinzas e o ponto de fulgor das amostras de biodiesel obtidas estão em conformidade com as normas estabelecidas, entretanto, novamente, o índice de acidez excedeu os limites estabelecidos para todas as amostras (ANP, 2005).

Na Figura 35 estão apresentados os diagramas de Pareto, onde podem ser observados os efeitos das variáveis sobre as características físico-químicas do biodiesel produzido a partir da transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura.

Tabela 21 - Resultados obtidos para a caracterização de amostras de biodiesel obtidas a partir do planejamento experimental 2³, variando-se o tempo de reação, a proporção álcool: resíduo de óleo e o tipo de álcool. As reações foram realizadas com 3% (m/v) do extrato enzimático fúngico, a 40°C.

Ensaio	Parâmetros			Características				
	Tempo de reação	Proporção álcool: resíduo de óleo de fritura	Álcool	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Massa específica (kg/m ³)	Cinzas (%)	Ponto de fulgor (°C)	Índice de acidez (mg KOH/g)
1	120 (-1)	3:1 (-1)	Metanol (-1)	3,51	891,5	0,01	115,2	7,12
2	360 (+1)	3:1 (-1)	Metanol (-1)	3,74	896,8	0,01	120,8	6,78
3	120 (-1)	4:1 (+1)	Metanol (-1)	3,83	890,2	0,01	118,7	7,05
4	360 (+1)	4:1 (+1)	Metanol (-1)	3,42	888,6	0,01	121,7	6,73
5	120 (-1)	3:1 (-1)	Etanol (+1)	3,58	899	0,01	125,4	6,01
6	360 (+1)	3:1 (-1)	Etanol (+1)	3,9	892,4	0,01	132,7	4,89
7	120 (-1)	4:1 (+1)	Etanol (+1)	3,65	894,1	0,01	124,9	5,15
8	360 (+1)	4:1 (+1)	Etanol (+1)	3,78	893,7	0,01	131,4	4,87
ANP (2005)				3,0 a 5,0	850 a 900	< 0,02	>100	< 0,50

Figura 35 - Gráficos de Pareto para a caracterização do biodiesel obtido a partir do planejamento experimental 2^3 , variando-se o tempo de reação, a proporção álcool: resíduo e o tipo de álcool (a) Viscosidade cinemática; (b) Massa específica; (c) Cinzas; (d) Ponto de fulgor e (e) Índice de acidez.



As interações entre o tempo de reação e a proporção álcool: resíduo, bem como entre o tempo de reação e o tipo de álcool foram as que apresentaram maiores efeitos estatísticos significativos ($p < 0,05$) sobre a viscosidade cinemática (Figura 35a). Verificou-se que menores proporções de álcool: resíduo e maiores tempos de reação, além do uso do etanol combinado a tempos de reação prolongados, favorecem a obtenção de valores mais elevados de viscosidade. Isso pode estar associado com menores proporções de álcool podem não ser suficientes para promover uma transesterificação completa, deixando ácidos graxos não

convertidos ou triglicerídeos parcialmente reagidos no biodiesel. Esses compostos residuais contribuem diretamente para o aumento da viscosidade (Lobo *et al.*, 2009).

Em relação à massa específica (Figura 35b), os fatores proporção álcool: resíduo e tipo de álcool, analisados individualmente, demonstraram maior significância estatística ($p < 0,05$). A utilização de menores proporções de álcool em relação ao resíduo e o emprego de etanol resultaram em valores mais elevados de massa específica. Além disso, a interação entre o tempo de reação e o tipo de álcool mostrou-se significativa, indicando que maiores proporções de álcool em menores tempos de reação contribuem para o aumento da massa específica. Esses resultados podem ser atribuídos à formação de subprodutos e à presença de compostos não convertidos, que elevam a densidade do biodiesel. Estudos indicam que a proporção molar álcool: óleo é uma variável crucial que afeta o rendimento e as propriedades do biodiesel, sendo necessário otimizar essa proporção para minimizar custos e melhorar a qualidade do produto final (SALTARIN, 2013).

Para cinzas, a interação entre tempo de reação e o tipo de álcool revelou um efeito significativo. Maiores tempos de reação na presença de metanol elevaram o teor de cinzas nas amostras (Figura 35c) corroborando com Schuarça e Martim (2014), que afirmam que baixas quantidades de álcool podem favorecer a não diluição de compostos que aumentam o teor de cinzas no biocombustível.

Para o ponto de fulgor, os fatores tipo de álcool e tempo de reação, quando analisados individualmente, apresentaram efeitos significativos (Figura 35d). O uso de etanol e tempos de reação mais prolongados favorecem o aumento do ponto de fulgor, possivelmente devido à maior conversão do biodiesel e à diminuição da quantidade de álcool não reagido, evitando o decaimento deste parâmetro (Lobo *et al.*, 2009). Essa interpretação é reforçada pela interação significativa entre tempo de reação e tipo de álcool.

Por fim, verifica-se na Figura 35e que o índice de acidez foi influenciado principalmente pelo tipo de álcool, onde o uso de etanol resultou em menores índices. O tempo de reação também se destacou como um fator significativo, com tempos mais longos contribuindo para a redução do índice de acidez. Isso reflete a preferência do biocatalisador pelo etanol como álcool de cadeia curta e a necessidade de tempos de reação maiores para promover maiores conversões de biodiesel, reduzindo, assim, a concentração de ácidos graxos no meio.

A caracterização do biodiesel também foi realizada para as amostras de biodiesel obtidas a partir do uso dos biocatalisadores imobilizados. Os resultados estão demonstrados na Tabela 22.

Tabela 22 - Caracterização do biodiesel obtido a partir da transesterificação enzimática do resíduo de óleo de fritura e etanol, utilizando biocatalisadores imobilizados em diferentes suportes. As reações foram realizadas a 40 °C, durante 360 minutos, com 3% (m/v) do biocatalisador e proporção etanol: resíduo de óleo de fritura de 3:1.

Ensaio	Condições reacionais		Características				
	Matéria-prima	Biocatalisador	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Massa específica (kg/m ³)	Cinzas (%)	Ponto de fulgor (°C)	Índice de acidez (mg KOH/g)
1	R.O	Extrato enzimático livre	3,90	892,4	0,01	132,7	4,89
2	R.O.T	Extrato enzimático livre	3,81	893,1	0,01	140,2	0,91
3	R.O	Extrato enzimático imobilizado em alginato de cálcio	3,25	885,0	0,01	143,5	3,85
4	R.O	Extrato enzimático precipitado imobilizado em alginato de cálcio	3,56	869,8	0,01	143,7	3,95
5	R.O.T	Extrato enzimático precipitado imobilizado em alginato de cálcio	3,49	871,4	0,01	144,0	0,62
6	R.O	Extrato enzimático precipitado imobilizado em nanopartículas magnéticas	3,02	855,7	0,02	118,0	4,22
7	R.O.T	Extrato enzimático precipitado imobilizado em nanopartículas magnéticas	3,03	862,1	0,01	128,1	0,89
ANP (2005)			3,0 a 5,0	850 a 900	< 0,02	>100	< 0,50

R.O = Resíduo de óleo de fritura; R.O.T = Resíduo de óleo de fritura pré-tratado com NaOH.

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que os parâmetros viscosidade cinemática, massa específica, cinzas e ponto de fulgor apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos pela ANP (2005). No entanto, o índice de acidez ainda permaneceu fora do limite estipulado. Essa mesma condição foi observada para a amostra de biodiesel produzida com o resíduo de óleo de fritura pré-tratado. Esses resultados indicam que os ácidos graxos livres na reação ainda estão elevados, evidenciando a necessidade de otimizar o processo para garantir que esses compostos sejam completamente consumidos, reduzindo, assim, o índice de acidez.

Apesar de o índice de acidez estar fora dos padrões da ANP, é importante destacar que o uso do biocatalisador imobilizado contribuiu significativamente para a redução do valor desse parâmetro em comparação ao biodiesel produzido com o biocatalisador não imobilizado. Essa tendência foi observada tanto para o biodiesel produzido com o resíduo de óleo fritura quanto para o resíduo de óleo de fritura pré-tratado. Esses dados reforçam a importância do papel do biocatalisador imobilizado em promover maiores taxas de conversão em biodiesel, corroborando seu potencial como ferramenta eficaz para a produção de biocombustível de alta qualidade.

Na Tabela 23 estão apresentados resultados obtidos por outros autores para a caracterização do biodiesel obtido a partir do resíduo de óleo de fritura.

Tabela 23 - Caracterização do biodiesel produzido com resíduo de óleo de fritura.

Parâmetros	Suherman <i>et al.</i> (2023)	Milano <i>et al.</i> (2022)	Gaio (2023)	Souza <i>et al.</i> (2013)	ANP (2005)
Catalisador	Biocatálise	Catálise química	Catálise química	Biocatálise	-
Viscosidade cinemática (mm ² /s)	41,65	49,05	5,42	6,27	3,0 a 5,0
Massa específica (kg/m ³)	916	902,70	876,18	883	850 a 900
Cinzas (%)	-	-	-		< 0,02
Ponto de fulgor (°C)	-	-	173	30,6	> 100 °C
Índice de acidez (mg KOH/g)	3,92	2,19	0,40	0,79	< 0,50

Observa-se que as amostras de biodiesel derivadas de resíduos de óleo de fritura exibem elevados índices de acidez. A comparação destes resultados com estudos de outros autores (SOUZA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2018; SUHERMAN *et al.*, 2023) revela uma

tendência consistente de elevados índices de acidez, reforçando a associação com a natureza da matéria-prima, ou seja, o resíduo de óleo de fritura. Para superar essa limitação, várias metodologias de purificação têm sido investigadas, destacando-se como soluções promissoras.

Uma das abordagens mais estudadas é o uso de adsorventes específicos, como sílica gel, carvão ativado e argilas ativadas. Esses materiais têm a capacidade de remover ácidos graxos livres e outros contaminantes residuais do biodiesel, reduzindo o índice de acidez para níveis aceitáveis (PICCIN *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Ozgul-Yucel e Türkay (2003) comparou a eficiência de dois adsorventes na remoção de ácidos graxos livres de biodiesel metílico, em batelada: sílica-gel e cinzas da casca de arroz. A sílica-gel foi mais eficiente, possivelmente devido à sua maior área superficial.

Outra metodologia amplamente aplicada é a purificação por membranas seletivas, que utiliza tecnologia de filtração para separar ácidos graxos livres, glicerol e outras impurezas do biodiesel. Essa técnica oferece vantagens em termos de eficiência e sustentabilidade, uma vez que minimiza a geração de resíduos líquidos (CAVALLARI, 2012).

A centrifugação também surge como uma solução eficiente para a separação de contaminantes densos, como glicerol e resíduos metálicos. Quando associada a métodos químicos de neutralização, pode reduzir significativamente o índice de acidez. O estudo de Gaio *et al.* (2023) destaca o papel da centrifugação no aprimoramento da qualidade final do biodiesel, especialmente em sistemas de alta escala.

Por fim, a purificação por lavagem a seco, que utiliza resinas específicas ou misturas de adsorventes, apresenta-se como uma opção prática para pequenos e médios produtores. Essa técnica reduz o índice de acidez ao remover resíduos químicos e subprodutos indesejados sem a necessidade de grandes volumes de água (PASCHOAL *et al.*, 2024).

Essas metodologias de purificação oferecem caminhos promissores para futuros estudos, visando o enquadramento do índice de acidez do biodiesel produzido nas normas vigentes. A aplicação dessas tecnologias, individualmente ou em combinação, pode garantir a conformidade com as normas da ANP e aumentar a competitividade do biocombustível no mercado.

Dessa forma, os resultados indicam que o biodiesel produzido a partir da transesterificação do resíduo de óleo de fritura mediada pelo extrato enzimático e extrato enzimático precipitado imobilizado de *E. endophytica* atende a maior parte das normas estabelecidas pela ANP (2005), mostrando-se ser uma excelente ferramenta para a obtenção do biodiesel de forma sustentável.

5 CONCLUSÃO

Os fungos endofíticos amazônicos, como o *E. endophytica* QAT_7AC isolado de *Aniba canelilla*, têm emergido como uma fonte promissora de enzimas, em particular, de lipase, que é de grande interesse para aplicações industriais. Nesse contexto, o extrato lipolítico produzido por esse fungo foi explorado na presente tese como um biocatalisador inovador, possibilitando a utilização de resíduo de óleo de fritura como matéria-prima na produção de biodiesel, utilizando etanol.

Os resultados obtidos demonstram a eficácia da lipase fúngica como biocatalisador e a identificação de parâmetros cruciais a serem considerados no processo de produção de biodiesel por meio da transesterificação enzimática. Um desses parâmetros é o tempo de reação, que desempenhou um papel fundamental na conversão eficiente dos óleos em biodiesel. Além disso, a proporção entre o álcool e o óleo mostrou-se como um fator crítico, uma vez que afeta diretamente o rendimento da transesterificação.

Outro ponto observado neste estudo foi a vantagem do uso de etanol em relação ao metanol como álcool de transesterificação. O emprego de etanol não apenas contribui para um processo mais sustentável, mas também pode resultar em um biodiesel de maior qualidade, com propriedades superiores, como menor teor de água e menor toxicidade. Isso ressalta o potencial do sistema biocatalítico investigado para uma produção de biodiesel mais amigável ao meio ambiente.

A etapa de purificação enzimática foi realizada com sucesso, iniciando-se pelo processo de precipitação em etanol, que demonstrou uma promissora atividade específica da enzima. Posteriormente, duas metodologias distintas foram empregadas, destacando-se a coluna de Sephadex pela sua eficácia, resultando em um aumento significativo na atividade específica e rendimentos mais expressivos. Contudo, apesar desses avanços, os rendimentos obtidos ainda não são satisfatórios para a aplicação na imobilização para a síntese de biodiesel. Esse desafio ressalta a necessidade contínua de aprimoramento nas estratégias de purificação, visando otimizar a eficiência do processo e tornar a enzima mais viável para aplicações práticas, como a produção de biodiesel.

A imobilização da lipase em alginato de cálcio e em nanopartículas magnéticas foi realizada com êxito, apresentando resultados distintos em termos de eficiência e reuso. A imobilização em nanopartículas magnéticas demonstrou ser eficiente, permitindo a reutilização da enzima por até três ciclos de reação. Já a imobilização em alginato de cálcio destacou-se como vantajosa tanto para o extrato enzimático quanto para o extrato precipitado, viabilizando até quatro ciclos de reação.

Contudo, a reciclagem da enzima imobilizada, em ambos os casos, mostrou-se menos eficiente em comparação a outros estudos, indicando a necessidade de ajustes no processo de imobilização. Fatores como a avaliação de diferentes concentrações de alginato de cálcio e a otimização das condições de imobilização para as nanopartículas magnéticas devem ser considerados em etapas futuras de pesquisa. Esses ajustes podem contribuir para aumentar a eficiência do processo e o número de ciclos possíveis, garantindo um melhor desempenho das enzimas imobilizadas.

O biodiesel quando produzido através dos sistemas biocatalíticos utilizados neste estudo atende a uma parte significativa das normas estabelecidas pela ANP (2005). No entanto, ressalta-se a necessidade de otimização do processo para assegurar que o biocombustível obtido esteja em plena conformidade com todos os padrões regulatórios estipulados.

Diante disso, o presente estudo destaca a potencialidade da produção de biodiesel por meio da biocatálise, ressaltando a viabilidade da obtenção de um biocombustível mais sustentável com a utilização do etanol e de enzimas imobilizadas.

REFERÊNCIAS

- ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. R.; NAJAFI, G. Current biodiesel production technologies: A comparative review. **Energy Conversion and Management on Science Direct**, v. 63, p. 138–148, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.02.027>
- ABDULLA, R.; DERMAN, E.; MATHIALAGAN, T.; YASER, A. Z.; SAMAH, M. A. A.; GANSAU, J. A.; NAJMUDDIN, S. U. F. S. Biodiesel production from waste palm cooking oil using immobilized *Candida rugosa* lipase. **Sustainability**, v. 14, p. 1-18, 2022. <https://doi.org/10.3390/su142013632>
- ABIOVE. Projeção para Soja em 2024. Disponível em: <https://abiove.org.br/projecoes-para-a-soja-em-2024-foram-atualizadas/>. Acesso em: 01/11/2024
- ABU, M.L., NOOH, H.M., OSLAN, S.N., SALLEH, A. B. Optimization of physical conditions for the production of thermostable T1 lipase in *Pichia guilliermondii* strain SO using response surface methodology. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 78, p. 78-87. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0397-7>
- ADENUGA, A.A.; OYEKUNLE, J.A.O.; IDOWU, O.O. Pathway to reduce free fatty acid formation in *Calophyllum inophyllum* kernel oil: a renewable feedstock for biodiesel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 316, p. 128222. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128222>
- ADEPOJU, T.F.; AKENS, H.A.; EKEINDE, E.B. Synthesis of biodiesel from blend of seeds oil-animal fat employing agricultural wastes as base catalyst. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 5, p. 100202. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2022.100202>
- ADETUNJI, A. I.; OLANIRAN, A. O. Immobilization and characterization of lipase from an indigenous *Bacillus aryabhattai* SE3-PB isolated from lipid-rich wastewater. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, V. 48, p. 898-905. 2018. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1514517>
- ADNAN, M.; LI, K.; XU, L.; YAN, Y. X-Shaped ZIF-8 for immobilization *Rhizomucor miehei* lipase via encapsulation and its application toward biodiesel production. **Catalysts**, v. 8, n 3, p. 96, 2018. <https://doi.org/10.3390/catal8030096>
- AGÊNCIA BRASIL. **Mistura de biodiesel ao diesel passa a ser de 12% a partir de abril**. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2023-03/mistura-de-biodiesel-ao-diesel-passa-ser-de-12-partir-de-abril>, Acesso em: 06/11/2023
- AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO – ANP. **Produtores de Biodiesel 2024**. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiOTlkODYyODctMGJjNS00MGJyLWJmMWItNGJlNDg0ZTg5NjBliiwidCI6IjQ0OTlmNGZmLTl0YTYtNGI0Mi1iN2VmLTEyNGFmY2FkYzkyZkxkMyJ9&pageName=ReportSection8aa0cee5b2b8a941e5e0%22> Acesso em: 01/11/2024.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS -ANP. **RESOLUÇÃO ANP Nº 831, DE 7 DE OUTUBRO DE 2020**. Brasília, DF, 2020.

Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-anp-n-831-de-7-de-outubro-de-2020-281791734> Acesso em: 16/11/2020.

AGHBASHLO, M.; TABATABAEI, M.; MOHAMMADI, P.; MIRZAJANZADEH, M.; ARDJMAND, M.; RASHIDI, A. Effect of an emission-reducing soluble hybrid nanocatalyst in diesel/biodiesel blends on exergetic performance of a DI diesel engine. **Renewable Energy**, v. 93, p. 353-368, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.077>

AGUIEIRAS, E. C. G.; BARROS, D. S. N.; SOUSA, H.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from *Rhizomucor miehei* grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions. **Renewable Energy**, v. 113, p. 112-118, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.05.090>

AGUIEIRAS, E. C. G.; OLIVEIRA, E. D. C.; CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 1-7, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.06.069>

AGUIEIRAS, E. C. G.; SOUZA, S. L.; LANGONE, M.P. Study of immobilized lipase Lipozyme RM IM esterification reactions for biodiesel synthesis. **Química Nova**, v. 36, p. 646-650, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000500006>

AHANCHI, M.; TABATABAEI, M. AGHBASHLO, M.; REZAEI, K.; TALEBI, A. F.; GHAFFARI, M.; KHOSHNEVISAN, B.; KHOUNANI, Z. Pistachio (*Pistachia vera*) wastes valorization: Enhancement of biodiesel oxidation stability using hull extracts of different varieties. **Journal of Cleaner Production**, v.185, n. 1, p. 852-859, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.089>

ALANIS, C.; ÁVILA CÓRDOBA, L. I.; ÁLVAREZ-ARTEAGA, G.; ROMERO, R.; PADILLA-RIVERA, A.; NATIVIDAD, R. Strategies to Improve the Sustainability of the Heterogeneous Catalysed Biodiesel Production from Waste Cooking Oil. **Journal of Cleaner Production**, v. 380, n. 1, 134970, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134970>

AL-HAMAMRE, Z.; J. YAMIN. Parametric study of the alkali catalyzed transesterification of waste frying oil for Biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 79, p. 246-54, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2013.12.027>

ALMEIDA, T. S.; ERAZO, R. G. T. P.; RAMOS, R. A. V.; DIAS FILHO, N. L. Transesterificação de Óleo de Soja e de Pinhão-Manso por Metanólise e Etanólise Empregando Diversos Catalisadores. In: **Anais do 6 Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Natal, 2016.

AL-MUHTASEB, A. H.; OSMAN, A. I.; MURPHIN KUMAR, P. S.; JAMIL, F.; AL-HAJ, L.; AL NABHANI, A.; QUIAW, H. H.; MYINT, M. T. Z.; MEHTA, N.; ROONEY, D. W. Circular economy approach of enhanced bifunctional catalytic system of CaO/CeO₂ for biodiesel production from waste loquat seed oil with life cycle assessment study. **Energy Conversion and Management**, v. 236, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.114040>

AL-SAADI, A.; MATHAN, B.; HE, Y. Biodiesel production via simultaneous transesterification and esterification reactions over SrO–ZnO/Al₂O₃ as a bifunctional catalyst

using high acidic waste cooking oil. **Chemical Engineering Research and Design**. v. 162, p. 238-248. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.08.018>

AL-SUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v.1, n. 1, p. 57-66, 2007. <https://doi.org/10.1002/bbb.2>

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, Norma ASTM D 6751, Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuels, 2002.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, Norma ASTM D 975, Standard Specification for Diesel Fuel Oils, 2005.

ANDREO-MARTÍNEZ, P.; ORTIZ-MARTÍNEZ, V.M.; SALAR-GARCÍA, M.J.; VEIGA-DEL-BAÑO, J.M.; CHICA, A.; QUESADA-MEDINA, J. Waste animal fats as feedstock for biodiesel production using non-catalytic supercritical alcohol transesterification: a perspective by the PRISMA methodology. **Energy for Sustainable Development**. v. 69, p. 150–163. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2022.06.004>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0270_22_09_2005.html, Acesso em: 12/12/2021.

ANWAR, M.; RASUL, M. G.; ASHWATH, N. A. Systematic Multivariate Analysis of Carica papaya Biodiesel Blends and Their Interactive Effect on Performance. **Energies**, v. 11, p. 1-20, 2018. <https://doi.org/10.3390/en11112931>

AOCS: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S. 1990. [A.O.C.S. Official method Cc 10a-25].

AOCS: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. Champaign, USA, AOCS, 1990. [AOCS Official method Cd 8-53].

AOCS: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. Champaign, USA. A.O.C.S., 1990. [A.O.C.S. Official method Cd 3-25].

AOCS: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. Champaign, USA. A.O.C.S., 1990. [A.O.C.S. Official method Cd 1-25].

AQUINO, I. P. **Avaliação da corrosividade do Biodiesel por técnicas Gravimétricas e Eletroquímicas**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade de São Paulo – São Paulo, 2012.

ARAUJO, A. M. M.; EVANGELISTA, J. P. C.; GOMES, A; F.; SOUZA, L. D.; MATIAS, L. G. O. Análises das cinzas sulfatadas do biodiesel produzido a partir da matéria prima extraída do RN. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 48., 2008, Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química, 2008.

ARIANSIOLA, E. F.; OJUMU, T. V.; OYEKOLA, O. O.; MADZIMBAMUTO, T. F.; IKHU-OMOREGBE, D. I. O. A review of current technology for biodiesel production: state of the art. **Biomass and Bioenergy**. v. 61, p. 276-297, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.014>

ARUMUGAM, A.; THULASIDHARAN, D.; JEGADEESAN, G. B. Process optimization of biodiesel production from *Hevea brasiliensis* oil using lipase immobilized on spherical silica aerogel. **Renewable Energy**. v. 116, p. 755-761, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.10.021>

ASRI, N. Puspa et al. Pre-treatment of waste frying oils for biodiesel production. *Modern Applied Science*, v. 9, n. 7, p. 99-106, 2015.

ATHAR, M.; ZAIDI, S. A review of the feedstocks, catalysts, and intensification techniques for sustainable biodiesel production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 6, p. 104523. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104523>

AVHAD, M. R.; MARCHETTI, J. M. A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 696-718, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.038>

AWOGBEMI, O.; ONUH, E.I.; INAMBAO, F.L. Comparative study of properties and fatty acid composition of some neat vegetable oils and waste cooking oils. **International Journal of Low-Carbon Technologies**. v. 14, n. 3, p. 417-425. 2019. <https://doi.org/10.1093/ijlct/ctz038>

AWORANTI, O.A.; AJANI, A.O.; AGARRY, S.E. Process parameter estimation of biodiesel production from waste frying oil (vegetable and palm oil) using homogeneous catalyst. **Journal of Food Processing & Technology**. v. 10, p. 1-10. <http://dx.doi.org/10.35248/2157-7110.19.10.811>

AZAHAR, W.N.A.W.; BUJANG, M.; JAYA, R.P.; HAININ, M.R.; MOHAMED, A.; NGADI, N.; JAYANTI, D.S. The potential of waste cooking oil as bio-asphalt for alternative binder - An overview. **Journal Tecnology**. v. 78, n. 4, p. 111-116. <http://dx.doi.org/10.11113/jt.v78.8007>

BADOEI-DALFARD, A.; MALEKABADI, S.; KARAMI, Z.; SARGAZI, G. Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates of Km12 Lipase: A stable nanobiocatalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil. **Renewable Energy**. V. 141, p. 874-882. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04>

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; J. H. A., P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.. 62, n. 1, p. 9-14, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.09.018>

BANCHAPATTANASAKDA, W.; ASAVATESANUPAP, C.; SANTIKUNAPORN, M. Conversion of Waste Cooking Oil into Bio-Fuel via Pyrolysis Using Activated Carbon as a Catalyst. **Molecules**, v. 28, 3590, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28083590>

BARGOLE, S.S.; SINGH, P.K.; GEORGE, S.; SAHARAN, V.K. Valorisation of low fatty acid content waste cooking oil into biodiesel through transesterification using a basic

heterogeneous calcium-based catalyst. **Biomass Bioenergy**. v. 146, p. 105984. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.105984>

BARRETO, A.; MAIA, F.; SANTIAGO, V.; RIBEIRO, V.; DENARDIN, J.; MELE, G.; CARBONE, L.; LOMONACO, D.; MAZZETTO, S.; FECHINE, P. Novel ferrofluids coated with a renewable material obtained from cashew nut shell liquid. **Microfluidics and nanofluidics**, v. 12, p. 677-686, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10404-011-0910-6>

BASTOS, R. R. C.; CORRÊA, A. P. L.; LUZ, P. T. S.; ROCHA FILHO, G. N.; ZAMIAN, J. R.; CONCEIÇÃO, L. R. V. Optimization of biodiesel production using sulfonated carbon-based catalyst from an amazon agro-industrial waste. **Energy Conversion and Management**, v. 205, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112457>

BATISTA, B. N. **Caracterização de amilases sintetizadas por fungo endofítico isolado do açaizeiro e sua aplicação na produção de xarope de glicose e na modificação de amidos**. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia. Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

BATISTA, B. N.; MATIAS, R. R.; OLIVEIRA, R. L.; ALBUQUERQUE, P. M. Hydrolytic enzyme production from açai palm (*Euterpe precatoria*) endophytic fungi and characterization of the amylolytic and cellulolytic extracts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 30, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03217-w>

BATTISTI, G.; SEABRA JUNIOR, E.; POZZO, D. M.; SANTOS, R. F. Comparação das características físico-químicas do biodiesel de citronela e eucalipto com o biodiesel da soja. In: SEMINÁRIO DE ENGENHARIA DE ENERGIA NA AGRICULTURA ACTA IGUAZU, 2., 2017, Paraná: Acta Iguazu, 2017 v. 6, n. 5, p. 173-180.

BBC RESEARCH. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. 2018 Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html> Acesso em: 26/11/2020.

BEHERA, A.R., VELUPPAL, A. & DUTTA, K. Optimization of physical parameters for enhanced production of lipase from *Staphylococcus hominis* using response surface methodology. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 26, p. 34277–34284. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04304-0>

BHUSHAN, I.; PARHAD, R.; QAZI, G. N. Immobilization of lipase by entrapment in Calcium alginate beads. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 23, n. 552., 2008. <https://doi.org/10.1177/0883911508097866>

BHUSHAN, I.; PARHAD, R.; QAZI, G. N. Immobilization of lipase by entrapment in Calcium alginate beads. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, V. 23, p. 552-562. 2008. <https://doi.org/10.1177/0883911508097866>

BI, C.; MIN, M.; NIE, Y.; XIE, Q.; LU, Q.; DENG, X.; ANDERSON, D. L.; CHEN, P.; RUAN, R. Process development for scum to biodiesel conversion. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 185-193, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.081>

BINHAYEEDUNG, N.; LOMKLAO, S.; PRASERTSAN, P.; SANGKHARAK, K. Improvement of biodiesel production using waste cooking oil and applying single and mixed

immobilized lipases on polyhydroxyalkanoate. **Renewable Energy**. v. 162, p. 1819-1827. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.009>

BIZERRA, D. A. U. B.; SILVA, D. L.; ABREU, L. P.; MALVEIRA, J. Q.; BEZERRA, C. A. D.; AGUIAR, I. R. F.; RIOS, M. A. S. Processo de Neutralização de óleos: avaliação do potencial da glicerina residual de transesterificação/KOH em comparação com solução de KOH. In: 6º

BORKAR, P. S.; BODADE, R. G.; RAO, S. R.; KHOBRADE, C. N. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 358-366, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090002000028>

BP International. **Statistical Review of World Energy 2022**. BP International: London, UK, 2022. Disponível em: <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2022-full-report.pdf> , Acesso em: 06/11/2023

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n 1-2, p. 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRANDÃO JÚNIOR, J.; ANDRADE DO NASCIMENTO, J. G.; FRANÇA SILVA, M. P.; LIMA BRANDÃO, E. D. A.; DE CASTRO BIZERRA, V.; DOS SANTOS, K. M.; SERPA, J. D. F.; SANTOS, J. C. S. D.; DA FONSECA, A. M.; VASCONCELOS DE OLIVEIRA, D. L.; *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. 571, 2023. <https://doi.org/10.3390/catal13030571>

BRASIL, LEI Nº 13.263, DE 23 DE MARÇO DE 2016. Percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Brasília, DF, 2016. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/lei/L13263.htm Acesso em: 26/11/2020.

BRITO, Y. C. **Esterificação e Transesterificação em presença de complexos de titânio e zircônio**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2008.

CAN, K., OZMEN, M. AND ERSOZ, M., Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.71, n.1, p. 154-159. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.01.021>

CANAKCI, M.; SANLI, H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. **J. Ind. Microbiology Biotechnol**, v. 35, p. 431–441, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0337-6>

CARLUCCI, C. An Overview on the Production of Biodiesel Enabled by Continuous Flow Methodologies. **Catalysts**, v. 12, n. 2, 717, 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/catal12070717>.

CARNEIRO, G. A.; SILVA, J. J.; OLIVEIRA, G. A.; PIO, F. P. B. Use of Microalgas for Biodiesel Production. **Research, Society and Development**. v. 7, n. 5, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.17648/rsd-v7i5.250>

CARPIO, L.G.T. Transmission of variations in the biodiesel mandate for Brazilian biodiesel market. **Biofuels**. v. 14, n. 4, p. 373–386. 2022 <https://doi.org/10.1080/17597269.2022.2140884>

CARVALHO NETO, F. G. M. R. **Isolamento e clonagem do gene que codifica a lipase do fungo *Endomelanconiopsis endophytica***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus 2013.

CARVALHO, L. F. F.; SOARES JUNIOR, M. S.; CASTIGLIONI, G. L. Aplicação de lipase microbiana no tratamento de resíduos oleosos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis. 2014.

CASTRO, S.V.F.; SILVA, C.V.; PREVIDI, D.; PORTELA, F.M.; GOMES, M.F. Caracterização estrutural e físico-química de biodiesel produzido a partir de óleo residual do refeitório do IF Goiano- Campus Urutaí. **Multi-Science Journal**. v. 1, n. 12, p. 47-53. 2018. <https://doi.org/10.33837/msj.v1i12.584>

CAVALARRI, P. I. **Avaliação dos Processos de Purificação do Biodiesel por via Seca**. Trabalho de conclusão de curso apresentado para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química. Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, São Paulo 2012.

CHANDRA, P.; ENESPA, S.R.; ARORA, P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 169, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**. v. 5, n. 3, p. 421-437, 2012.

CHATTOPADHYAY, S.; SEN, R. Fuel properties, engine performance and environmental benefits of biodiesel produced by a green process. **Applied Energy**, v. 105, p. 319-326. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.01.003>

CHEN, H.X.; XIA, W.; WANG, S. Biodiesel production from waste cooking oil using a waste diaper derived heterogeneous magnetic catalyst. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 40, p. 1–10. 2023. <https://doi.org/10.1007/s43153-022-00257-z>

CHUAH, L.F.; YUSUP, S.; AZIZ, A.R.A.; KLEMEŠ, J.J.; BOKHARI, A.; ABDULLAH, M.Z. Influence of fatty acids content in non-edible oil for biodiesel properties. **Clean Technologies and Environmental Policy**. v. 18, p. 473–482. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10098-015-1022-x>

CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; HENRIQUES, R. O.; MORITZ, D. E.; NINOW, J. L.; FREIRE, D. M. G.; MANOEL, E. A.; FERNADEZ-LAFUENTE, R.; OLIVEIRA, D. Nanomaterials for biocatalyst immobilization – state of the art and future trends. **RSC Advances**. v. 6, p. 104675-104692, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA22047A>

CLAEYS, C. **Used Cooking Oil (UCO) Feedstock Now Accounts for One-Fifth of All European Biofuels**. In: Proceedings of the ACI Oleofuels Conference, Marseille, France, 18–19 May 2022.

COLLA, L. M.; FICANHA, A. M. M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation. **BioMed Research International**, p 1–9, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/725959>

CORRAL-BOBADILLA, LOSTADO-LORZA, M.R.; SOMOVILLA-GÓMEZ, F.; ÍÑIGUEZ-MACEDO, S. Life cycle assessment multi-objective op-timization for eco-efficient biodiesel production using waste cooking oil. **Journal of Cleaner Production**, V. 359, 132113, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132113>.

COSTA, M. A. L.; FARINAS, C. S.; MIRANDA, E. A. Ethanol precipitation as a downstream processing step for concentration of xylanases produced by submerged and solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 477-488, 2018. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180352s20160502>

CRUZ JUNIOR, A. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B em quitosana para obtenção de biodiesel por transesterificação do óleo de mamona**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CRUZ-IZQUIERDO, Á.; PICÓ, E. A.; LÓPEZ, C.; SERRA, J. L.; LLAMA, M. J. Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* Lipase: An Efficient and Stable Biocatalyst for Biodiesel Synthesis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115202>

DANTAS, A. **Imobilização e caracterização da lipase Ns-40116 em poliestireno**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

DATA BRIDGE MARKET RESEARCH. Mercado Global de Enzimas – Tendências da Indústria e Previsão para 2029. Disponível em: https://www.databridgemarketresearch.com/pt/reports/global-enzymes-market?srsltid=AfmBOooC3CRm2fgcaps03XgXwyTFQ19C6LF--dFZpm-BCJ29lsq_PrFR. Acesso em: 30/11/2024.

DORS, G. **Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DUARTE, L. S. **Estudo de clonagem da transglutaminase de *Bacillus amyloliquefaciens* em *Escherichia coli* e sua produção em biorreatores**. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020.

DUARTE, V. H.; VALENTINI, M. H. K.; SANTOS, G. B.; NADALETTI, W. C.; VIEIRA, B. Biocombustíveis: uma revisão sobre o panorama histórico, produção e aplicações do biodiesel. **Meio Ambiente (Brasil)**, v. 4, n. 2, p. 50-68, 2022.

DUTTA, B., SHAMEKH, S., DESKA, J. BANDOPADHYAY, R.. Statistical optimization of media components for production of extracellular lipase from edible mushroom *Cantharellus*

cibarius. Biologia Futura. v. 73, n. 3, p. 315–325. 2022. <https://doi.org/10.1007/s42977-022-00131-6>

ELGHARBAWY, A. S.; ALI, R. M. Techno-economic assessment of the biodiesel production using natural minerals rocks as a heterogeneous catalyst via conventional and ultrasonic techniques. **Renewable Energy**, v. 191, p. 161-175. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.04.020>

ELGHARBAWY, ABDALLAH S.; SADIK, WAGIH. A.; SADEK, OLFAT M. Y KASABY, MOSAAD A. A review on biodiesel feedstocks and production technologies. **Journal of the Chilean Chemical Society**. v. 66, n.1. 2021.

Embrapa - **Soja**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pos-producao/agroenergia/biocombustiveis> , Acesso em: 03/05/2022.

ENCINAR, J.M.; NOGALES-DELGADO, S.; SÁNCHEZ, N. Pre-esterification of high acidity animal fats to produce biodiesel: a kinetic study. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 14, n. 4, p. 103048. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103048>

ENGUILLO GONZAGA, V.; ROMERO, R.; GÓMEZ-ESPINOSA, R.M.; ROMERO, A.; MARTÍNEZ, S.L.; NATIVIDAD, R. Biodiesel production from waste cooking oil catalyzed by a bifunctional catalyst. **ACS Omega**. v. 6, n. 37, p. 24092–24105. 2021. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03586>

FANSLAU, P. H.; VIEIRA, G. E. G.; ZAVARIZE, D. G.; SOUSA, J. F. Pirólise como rota tecnológica para aproveitamento energético de biomassas: preparo, produção e caracterização de bio-óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius). **Revista Desafios**. v.7, 2020. <https://doi.org/10.20873/uftsupl2020-8774>

FARIAS, M. Y. V. **Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na produção de ésteres**. Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2017.

FAROOQ, M.; RAMLI, A.; NAEEM, A. Biodiesel production from low FFA waste cooking oil using heterogeneously catalyst derived from chicken bones. **Renewable Energy**. v. 76, p. 362-368. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.11.042>

FERRUSCA, M.C; ROMERO, R.; MARTÍNEZ, S.L.; REMÍREZ-SERRANO, A.; NATIVIDADE, R. Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: A perspective on Catalytic Processes. **Processes**. v. 11, n.7. 2023. <https://doi.org/10.3390/pr11071952>

FONSECA, J. M.; TALEKEN, J. G.; ALMEIDA, V. C.; SILVA, C. Biodiesel from waste frying oils: Methods of production and purification. **Energy Conversion and Management**. v. 184, n. 15, p. 205-218, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.01.061>

FOROUTAN, R.; ESMAEILI, H.; MOUSAVI, S.M.; HASHEMI, S.A.; YEGANEH, G. The physical properties of biodiesel-diesel fuel produced via transesterification process from different oil sources. **Physical Chemistry Research**. v. 7, n. 2, p. 415–424. 2019. <https://doi.org/10.22036/pcr.2019.173224.1600>

FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Enzymatic Synthesis of Glyceride Esters in Solvent-Free System: Influence of the Molar Ratio, Lipase Source and Functional Activating Agent of the Support. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 18, n. 7, p. 1360-1366, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000700011>

GAIO, G. R. S. **Produção de Biodiesel a partir de óleo residual da Indústria Alimentícia pré-tratado com cinzas de caldeira**. Dissertação (Mestrado em Energia & Sustentabilidade). Universidade Federal da Integração Latino, Foz do Iguaçu, 2023.

GAIO, I.; ORO, C. E. D.; FERNADES, I. A.; VARGAS, C. E. B.; DALLAGO, R. M.; VALDUGA, E.; FURIGO JR, A. **Rendimento de imobilização de Pectinases imobilizadas em Matriz polimérica inorgânica**. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Rio Grande do Sul, 2016.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**. v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>

GAUR, A.; MISHRA, S.; CHOWDHURY, S.; BARENDAR, P.; VERMA, P. A review on factor affecting biodiesel production from waste cooking oil: An Indian perspective. **Materials Today: Proceedings**. v. 46, n. 11, p. 5594–5600. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.432>

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel from soybean oil: experimental procedure of transesterification for organic chemistry laboratories. **Química Nova**, v.30, p. 1369-1373, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500053>

GHATTAS. N.; FILICE, M.; ABIDI, F.; GUIBAN, J. M.; BEN, A. Purification and improvement of the functional properties of *Rhizopus oryzae* lipase using immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 110, p. 111-116. 2014. [10.1016/j.molcatb.2014.09.012](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.09.012)

GIRALDO, L.; GÓMEZ-GRANADOS, F.; MORENO-PIRAJÁN, J. C. Biodiesel Production Using Palm Oil with a MOF-Lipase B Biocatalyst from *Candida Antarctica*: A Kinetic and Thermodynamic Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 10741, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms241310741>

GKANIATSOU, E.; SICARD, C.; RICOUX, R.; MAHY, J.-P.; STEUNOU, N.; SERRE, C. Metal–organic frameworks: a novel host platform for enzymatic catalysis and detection. **Materials Horizons**. v. 4, n. 1, p. 55-63, 2017. <https://doi.org/10.1039/C6MH00312E>

Global Information, Inc. (GII)—Premium Market Research Reports. **Used Cooking Oil Market Size, Share, Price & Report 2023–2028**. Disponível em: <https://www.giiresearch.com/report/imarc1291431-used-cooking-oil-market-global-industry-trends.html> , Acesso em: 06/11/2023.

GOH, B. H. H.; ONG, H. C.; CHEAH, M. Y.; CHEN, W. H.; YU, K. L.; MAHLIA, T. M. I. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 107, p. 59-74, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.012>

GONG, H.; GAO, L.; NIE, K.; WANG, M.; TAN, T. A new reactor for enzymatic synthesis of biodiesel from waste cooking oil: A static-mixed reactor pilot study. **Renewable Energy**, v. 15, p. 270-277, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.086>

GRAND VIEW RESEARCH. **Biodiesel Market Size, Share & Trends Analysis Report By Feedstock (Vegetable Oils, Animal Fats), By Application (Fuel, Power Generation), By Region (Europe, APAC), And Segment Forecasts, 2022 – 2030**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biodiesel-market>. Acesso em: 04/05/2023.

GRAND VIEW RESEARCH. **Enzymes Market size share & trends Analysis report by Application (Industrial Enzymes, Specialty Enzymes), By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases), By Source, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027**. 2020. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry> . Acesso em: 26/11/2020.

GRINSVEN, A.; TOORN, E.; VEEN, R.; KAMPMAN, B. **Used Cooking Oil (UCO) as biofuel feedstock in the EU**. Holanda, CE Delft – Committed to the Environment, 2020. P. 68

GURGEL, R. S.; RODRIGUES, J. G. C.; MATIAS, R. R.; BATISTA, B. N.; OLIVEIRA, R. L.; ALBUQUERQUE, P. M. Biological activity and production of metabolites from Amazon endophytic fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 14, p. 85-93, 2020. <https://doi.org/10.5897/AJMR2019.9207>

GUZMÁN-MARTÍNEZ, B.; LIMAS-BALLESTEROS, R.; WANG, J. A.; ALAMILLA-BELTRÁN, L.; CHEN, L.; NOREÑA, L. E. Microencapsulation of Lipases Produced by Dripping and Jet Break-Up for Biodiesel Production. **Energies**, v. 15, p. 9411, 2023. <https://doi.org/10.3390/en15249411>

HAAS, M. J.; MCALOON, A. J.; YEE, W. C.; FOGLIA, T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 4, p. 671–678, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.039>

HAFEEZ, S.; AL-SALEM, S.M.; MANOS, G.; CONSTANTINOU, A. Fuel production using membrane reactors: A review. **Environmental Chemistry Letters**. v. 18, p. 1477–1490. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01024-7>

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Purification and characterization of a mesophilic lipase from *Bacillus subtilis* FH5 stable at high temperature and pH. **Acta Biologica Hungarica**, v. 58, n. 1, p. 115-132, 2007. <https://doi.org/10.1556/ABiol.58.2007.1.11>.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: A very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide. **Process Biochemistry**. v. 46, n. 4, p. 873-878, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.12.007>

HIDALGO, P.; TORO, C.; CIUDAD, G.; SCHÖBER, S.; MITTELBACH, M.; NAVIA, R. Evaluation of Different Operational Strategies for Biodiesel Production by Direct Transesterification of Microalgal Biomass. **Energy Fuels**, v. 28, p. 3814–3820, 2014. <https://doi.org/10.1021/ef500259z>.

HOCHSCHEIDT, B. D.; POSSAMAI, E. S.; SILVA, M. P. M.; DIETER, J.; SILVA, F. R.; SEQUINEL, R. Neutralização ou Esterificação como técnicas de melhoria dos insumos para produção de biodiesel. **Revista Virtual de Química**. v. 12, n. 2, p 325-334. 2020.

HSIAO, M. C.; LIAO, P. H.; LAN, N. V.; HOU, S. S. Enhancement of Biodiesel Production from High-Acid-Value Waste Cooking Oil via a Microwave Reactor Using a Homogeneous Alkaline Catalyst. **Energies**, v. 14, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.3390/en14020437>

HUSAIN, I. A.; ALKHATIB, M. F.; JAMMI, M. S.; MIRGHANI, M. E.; BIN ZAINUDIN, Z.; HODA, A. Problems, control and treatment of fat, oil, and grease (FOG): a review. **Journal of Oleo Science**. v. 63, n 8, p. 747-752, 2014. <https://doi.org/10.5650/jos.ess13182>

IGC – International Grains Council. Grain Market Reports. Disponível em: <https://www.igc.int/en/default.aspx>, Acesso em: 01/11/2024.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008

ISTA Mielke GmbH. **Oil World Annual**. Disponível em: <https://www.oilworld.biz/t/publications/annual> , Acesso em: 06/11/2023.

JALILIAN, N.; NAJAFPOUR, G.D.; KHAJOUEI, M. Macro and micro algae in pollution control and biofuel production - A review. **ChemBioEng Reviews**. v. 7, n. 1, p. 18–33. 2020. <https://doi.org/10.1002/cben.201900014>

JAMBULINGAM, R.; SHALMA, M.; SHANKAR, V. Biodiesel production using Lipase Immobilized Functionalized Magnetic Nanocatalyst from Oleaginous Fungal Lipid. **Journal of Cleaner Production**. V. 215, p. 245-258. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.1>

JAMIL, N.; ZAIRI, M.N.M.; NASIM, N.A.M.; PA'EE, F. Influences of enviromental conditions to phytoconstituents in clitoria ternatea (butterfly pea flower) – A review. **Journal of Science and Technology**. v. 10, p. 208-228. <http://dx.doi.org/10.30880/jst.2018.10.02.029>

JOSÉ, C.; BONETTO, R. D.; GAMBARO, L. A.; TORRES, M. P. G.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. J.; BIRAND, L. R. Investigation of the causes of deactivation degradation of the commercial biocatalyst Novozym 432 in ethanol and ethanol-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 95-107, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.004>

KAMANKI, A. M. B. **Purificação de lipases fúngicas visando aplicação em tratamento de óleo residual de fritura**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal da Fronteira do Sul, Chapecó, 2017.

KAREEM, S. O.; FALOKUN, E. I.; BALOGUN, S. A.; AKINLOYE, O. A.; OMEIKE, D. O. Improved biodiesel from palm oil using lipase immobilized calcium alginate and Irvingia gabonensis matrices. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 59. 2020. <https://doi.org/10.1186/s43088-020-00084-6>

KASIRAJAN, R. Biodiesel production by two step process from an energy source of Chrysophyllum albidum oil using homogeneous catalyst. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 37, p. 161–166, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.05.011>

- KHAN, H.M.; IQBAL, T.; ALI, C.H.; YASIN, S.; JAMIL, F. Waste quail beaks as renewable source for synthesizing novel catalysts for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 154, p. 1035–1043, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.03.079>
- KNEZEVIC, Z.; BOBIC, S.; MILUTINOVIC, A.; OBRADOVIC, B.; MOJOVIC, L.; BUGARSKI, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 313–318, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00085-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00085-7).
- KULKARNI, M. G.; DALAI, A. K. Waste Cooking Oil—An Economic Source for Biodiesel: A Review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 2901–2913, 2006. <https://doi.org/10.1021/ie0510526>
- KUMAR, M., SUN, Y., RATHOUR, R., PANDEY, A., THAKUR, I. S., TSANG, D. C. W. Algae as potential feedstock for the production of biofuels and value-added products: Opportunities and challenges. **Science of the Total Environment**, 716, 137116, 2020.
- LAMPI, A.M.; YANG, Z.; MUSTONEN, O.; PIIRONEN, V. Potential of faba bean lipase and lipoxygenase to promote formation of volatile lipid oxidation products in food models. **Food Chemistry**, v. 311, p. 125982, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125982>
- LEE, J.H.; LEE, J.H.; KIM, D.S.; YOO, H.Y.; PARK, C.; KIM, S. W. Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbon. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100248, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100248>
- LEUNG, D.Y.C., GUO, Y. Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production. **Fuel Processing Technology**, v. 87, p. 883–890, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2006.06.003>.
- LI, W.; CHEN, B.; TAN, T. Esterification Synthesis of Ethyl Oleate in Solvent-Free System Catalyzed by Lipase Membrane from Fermentation Broth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 102–111, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9020-2>
- LI, Y.; LIU, T.; ZHAO, M.; ZHANG, H.; FENG, F. Screening, purification, and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* isolated from stuffed buns steamers. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 20, n. 4, 2019. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1800213>
- LIN, Y.; AMESHO, K. T. T.; CHEN, C.; CHENG, P.; CHOU, F. A cleaner process for green biodiesel synthesis from waste cooking oil using recycled waste oyster shells as a sustainable base heterogeneous catalyst under the microwave heating system. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, 100310, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100310>.
- LOBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: quality parameters and analítica methods. **Química Nova**, v. 32, n. 6, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600044>
- LOPES, L. F.; SANTOS, C. M. A.; FOLLY, T. S. Estudo da viscosidade cinemática de biodiesel a partir de óleo in natura e residual. In: 9º Simpósio de Gestão Ambiental e Biodiversidade. **Resumo**. SIGAPI: 9º Simpósio de Gestão Ambiental e Biodiversidade, Rio de Janeiro, 2020.

MALDONADO, R. R. **Aplicação da lipase de *Geotrichum candidum* para a biocatálise de óleos vegetais com vistas à produção de biodiesel**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

MANDARI, V.; DEVARAI, S. K. Biodiesel Production Using Homogeneous, Heterogeneous, and Enzyme Catalysts via Transesterification and Esterification Reactions: a Critical Review. **BioEnergia**, v. 15, p. 935–961, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10333-w>

MANERA, A. P.; MEINHARDT, S.; KALIL, S. J. Purificação de amiloglicosidase de *Aspergillus niger*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 651-658, 2011. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n2p651>

MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. MM. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 71, p. 53-57, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.001>

MARDER, F.; CELIN, M. M.; MAZUIM, M. S.; SCNEIDER, R. C. S.; MACGANAN, M. T.; CORBELLINI, V. A. Produção de biodiesel por biocatálise utilizando método alternativo de imobilização da lipase em hidrogel. **TECNO-LÓGICA**, v. 12, n. 2, p.56-64, 2008.

Market Research Future. **Biodiesel Market Research Report Information by Application (Fuel, Power Generation, Others), by type (Methanol, Biohidrogen and Cellulosic Ethanol), and by Region (North America, Europe, Asia-Pacific and resto of the World) – Market Forecast till 2030**. Disponível em: https://www.marketresearchfuture.com/reports/biodiesel-market-1521?utm_term=&utm_campaign=&utm_source=adwords&utm_medium=ppc&hsa_acc=2893753364&hsa_cam=20513425143&hsa_grp=151528861085&hsa_ad=672765151113&hsa_src=g&hsa_tgt=dsa-2189427800041&hsa_kw=&hsa_mt=&hsa_net=adwords&hsa_ver=3&gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAuqKqBhDxARIsAFZELmK1FA1hcOlS7Y7bvGBD56bC8RcyzQ7bsbCW3TgRZ2rZUVu3o6bJP4UaApoZEALw_wcB Acesso em: 06/11/2023.

MAROTTI, B. S.; CORTEZ, D. V.; GONÇALVES, D. B.; CASTRO, H. F. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**, v. 40, n. 4, p. 427-435, 2017. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170033>

MARTINEZ-KLIMOVA E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**. v. 134, p. 1–17. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.010>

MARTINS, P. A.; ALMEIDA, K. C.; COSTA, P. P. K. G.; PACHECO, T. F.; MARCO, J. L.; SALUM, T. F. C. **Produção de lipases bacterianas e aplicação à síntese de biodiesel**. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 4., Brasília, DF. Anais [...] Brasília,DF: Embrapa, 2017.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos.

Química Nova, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800005>

MATHEW, G. M.; RAINA, D.; NARISSETTY, V.; KUMAR, V.; SARAN, S.; PUGAZHENDI, A.; SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Recent advances in biodiesel production: Challenges and solutions. **Science of the Total Environment**, v. 794, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148751>

MATIAS, R. R.; SEPÚLVEDA, A. M. G.; BATISTA, B. N.; LUCENA, J. M. V. M.; ALBUQUERQUE, P. M. Degradation of *Staphylococcus aureus* biofilm using hydrolytic enzymes produced by amazonian endophytic fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 2145-2161, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03542-8>

MATIAS, R.R.; RODRIGUES, J.G.C.; PROCÓPIO, R.E.L.; MATTE, C.R.; DUVOISIN JUNIOR, S.; SOARES, R.M.D.; ALBUQUERQUE, P.M. Lipase production from *Aniba canelilla* endophytic fungi, characterization and application of the enzymatic extract. **Research, Society and Development**. v. 11, n. 12, p. 1-15, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34326>

MATIAS, R. R. **Bioprospecção de fungos endofíticos de *Aniba canelilla* e avaliação do seu potencial na degradação do polietileno tereftalato**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 2020.

MEHDE, A. A.; MEHDI, W. A.; SEVERGUN, O.; ÇAKAR, S.; OZACAR, M. Lipase-based on starch material as a development matrix with magnetite cross-linked enzyme aggregates and its application. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 120, n. B, p. 1533-1543, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.141>

MELO, M. A. R. **Avaliação dos parâmetros de biodiesel e blendas durante o armazenamento**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

MELO, P. G. **Produção e caracterização de biodieseis obtidos a partir da oleaginosa Macaúba (*Acrocomia aculeata*)**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

MENDES, A. A.; GIORDIANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 68, n 1, p 109-115, 2011.

MENONCIN, S. **Concentração, Imobilização e Caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2007.

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Revista Ciências Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 440-443, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000200033>

MERCK, 2021. Amicon Ultra Centrifugal Filters. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-concentrationand-buffer-exchange/amicon-ultra-centrifugal-filters>. Acesso em: 27/02/2022

MIAO, C.; YANG, L.; WANG, Z.; LUO, W.; LI, H.; LV, P.; YUAN, Z. Lipase immobilization on amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. **Fuel**. V. 224, p. 774–782. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02>

MILANO, J.; SHAMSUDDIN, A. H.; SILITONGA, A.; SEBAYANG, A.; SIREGAR, M. A.; MASJUKI, H.; PULUNGAN, M. A.; CHIA, S. R.; ZAMRI, M. Tribological study on the biodiesel produced from waste cooking oil, waste cooking oil blend with Calophyllum inophyllum and its diesel blends on lubricant oil. *Energy Rep.* v. 8, p. 1578-1590, **2022**. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.005>

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

MOHIDDIN, M.N.B.; TAN, Y.H.; SEOW, Y.X.; KANSEDO, J.; MUBARAK, N.M.; ABDULLAH, M.O.; CHAN, Y.S.; KHALID, M. Evaluation on feedstock, technologies, catalyst and reactor for sustainable biodiesel production: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 98, p. 60–81. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.03.036>

MORAIS, V.S.; CASTRO, E.V.R.; CARNEIRO, M.T.W.D.; BRANDÃO, G. P.; FABRI JUNIOR, R.; SENA, D.R. ASTM color: a simple and fast method for determining quality of biodiesel produced from used cooking oils. **Química Nova**. v. 36, n. 4, p. 587–592. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000400018>

Mordor Intelligence. **Análise do tamanho e participação do mercado de biocombustíveis no Brasil – Tendências e previsões de crescimento (2023-2028)**. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/brazil-biofuel-market>. Acesso em: 06/11/2023

Mordor Intelligence. **Tamanho do Mercado de Lipase e análise de ações – Tendências e Previsões de crescimento (2024 - 2029)**. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/lipase-market>. Acesso em: 30/11/2024.

MOREIRA FILHO, R. N. F. **Caracterização e avaliação de membranas de alginato de calcio com papaína imobilizada para o uso como curativo biotivo**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2019.

MUANRUKSA, P.; KAEWKANNETRA, P. Combination of fatty acids extraction and enzymatic esterification for biodiesel production using sludge palm oil as a low-cost substrate. **Renewable Energy**, v. 146, p. 901-906, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.07.027>

MUCIÑO, G.G.; ROMERO, R.; RAMÍREZ, A.; MARTÍNEZ, S.L.; BAEZA-JIMÉNEZ, R.; NATIVIDAD, R. Biodiesel production from used cooking oil and sea sand as heterogeneous catalyst. **Fuel**. v. 138, p. 143–148. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.07.053>

MUNIR, M.; AHMAD, M.; REHAN, M.; SAEED, M.; LAM, S.S.; NIZAMI, A.S.; WASEEM, A.; SULTANA, S.; ZAFAR, M. Production of high-quality biodiesel from novel non-edible *Raphnus raphanistrum* L. seed oil using copper modified montmorillonite clay catalyst. **Environmental Research**, v. 193, p. 110398. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110398>

MUSA, I.A. The effects of alcohol to oil molar ratios and the type of alcohol on biodiesel production using transesterification process. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 21–31, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.06.007>

NASCIMENTO, R. **Caracterização funcional de uma lipase/esterase secretada por *Xylella fastidiosa* como fator de virulência chave na patogênese de Pierce**. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

NASER, J.; AVBENAKE, O.P.; DABAI, F.N.; JIBRIL, B.Y. Regeneration os spent bleaching earth and conversion of recovered oil to biodiesel. **Waste Menagement**. v. 126, p. 258-265. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.03.024>

NAYLOR, R. L.; HIGGINS, M. M.. The rise in global biodiesel production: Implications for food security. **Global Food Security**. v.16, p.75–84, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.10.004>

NG, C. H.; YANG, K. L. Lipase in biphasic alginate beads as a biocatalyst for esterification of butyric acid and butanol in aqueous media. **Enzyme Microb. Technol.** V. 82, p. 173-179. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.10.005>

NIELSEN, M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 100, p. 692-700, 2008. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800064>

NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFIA, A.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p.50-59, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.04.001>

NORJANNAH, B.; ONG, H.C.; MASJUKI, H.H.; JUAN, J.C.; CHONG, W.T. Enzymatic transesterification for biodiesel production: A comprehensive review. **RSC Advances**. v. 2016, n. 6, p. 60034–60055. 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA08062F>

NOUREDDINI, H.; HARKEY, D.; MEDIKONDURU, V. A. J. Kinetics of transesterification of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 74, p. 1457-1463, 1997. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0254-2>

OLIVEIRA, E.J.; SANTOS, F.; LOPES, J.E.F.; NEVES, O.F.; LIMA, L.C.; FERREIRA FILHO, N.; OLIVEIRA, V.A. **Processos Químicos e Biotecnológicos**, 1 ed. Belo Horizonte, Poisson, 2020, Volume 5, p 2-45. cap.05.

OLIVEIRA, G. F. **Produção por cultivo submerso e parcial caracterização de uma nova lipase do fungo endofítico *Preussia africana***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2021.

OLIVEIRA, G.F.; SILVA, M.R.L.; HIRATA, D.B. Production of new lipase from *Preussia africana* and a partial characterization. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**. v. 52, n. 8, p. 942-949. 2022. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.2012684>

OUTILI, N. et al. Comparative study of frying oil pre-treatments for biodiesel production using green chemistry metrics. **Algerian Journal of Engineering Research**, v. 5, n. 1, p. 29-32, 2021.

OUANJI, F.; KACIMI, M.; ZIYAD, M.; PULEO, F.; LIOTTA, L. F. Production of Biodiesel at Small-Scale (10 L) for Local Power Generation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 13, p. 8914–8921, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.182>

ÖZGÜL-YÜCEL S.; TÜRKAY S. Purification of FAME by rice hull ash adsorption. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 4, p. 373-376, 2003.

PARANDI, E.; SAFARIPOUR, M.; ABDELLATIF, M. H.; SAIDI, M.; BOZORGIAN, A.; NODEH, H. R.; REZANIA, S. Biodiesel production from waste cooking oil using a novel biocatalyst of lipase enzyme immobilized magnetic nanocomposite. **Fuel**. v. 313, p. 123057. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.123057>

PASCHOAL, S. M.; GHELLER, M. B.; GOMES, M. C. S.; SGORLON, J. G.; ANDRADE, M. Métodos de Separação e Purificação De Biodiesel: Uma Revisão. **Evidência**, v. 24, p. 1-10, 2024. <https://doi.org/10.18593/evind.34125>.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linha de *Rhizopus* sp. **Revista de Ciência da Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000200006>

PAULINE, J. M. N.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; PUGAZHENDHI, A.; ANBARASAN, T.; ACHARY, A. Transesterification Kinetics of Waste Cooking Oil and Its Diesel Engine Performance. **Fuel**, v. 285, n. 1, 119108, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119108>

PENG, Y.-P.; AMESHO, K. T. T.; CHEN, C.-E.; JHANG, S.-R.; CHOU, F.-C.; LIN, Y.-C. Optimization of Biodiesel Production from Waste Cooking Oil Using Waste Eggshell as a Base Catalyst under a Microwave Heating System. **Catalysts**, v. 8, n. 81, 2018. <https://doi.org/10.3390/catal8020081>

PEREIRA, A. S.; DINIZ, M. M.; JONG, G.; GAMA FILHO, H. S.; DOS ANJOS, M. J.; FINOTELLI, P. V.; FONTES-SANT'ANA, G. C.; AMARAL, P. F. F. Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: Morphological, physico-chemical and kinetic characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 621-630. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.009>

PEREIRA, A. S.; MIRANDA, S. M.; LOPES, M.; BELO, I. Factors affecting microbial lipids production by *Yarrowia lipolytica* strains from volatile fatty acids: Effect of co-substrates, operation mode and oxygen. **Journal of Biotechnology**, V. 331, p. 37-47. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.02.014>.

PEREIRA, G. A.; RODRIGUES, E. P.; BARCELLOS, F. G. **Quantificação da atividade lipolítica de *Aureobasidium pullulans* isolados a partir da planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae).** In: Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, 5. Londrina, 2015.

PICCIN, Jeferson Steffanello; MAGRO, Francisco Gerhardt; BRIÃO, Vandrê Barbosa; COLLA, Luciane Maria. Purificação de biodiesel por adsorventes: uma revisão. **Revista Evidência**, v. 25, n. 2, p. 68-75, 2015.

PIKULA, K.; ZAKHARENKO, A.; STRATIDAKIS, A.; RAZGONOVA, M.; NOSYREV, A.; MEZHUEV, Y.; TSATSAKIS, A.; GOLOKHAVAST, K. The advances and limitations in biodiesel production: feedstocks, oil extraction methods, production, and environmental life cycle assessment. **Green Chemistry Letters and Reviews**. v. 13, n. 4, p. 11–30. 2020. <https://doi.org/10.1080/17518253.2020.1829099>

PLATA, V.; FERREIRA-BELTRÁN, D.; GAUTHIER-MARADEI, P. Effect of cooking conditions on selected properties of biodiesel produced from Palm-Based waste cooking oil. **Energies**. v. 15, n. 3, p. 908. 2022. <https://doi.org/10.3390/en15030908>

POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; PERALBA, M. C. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M.A.Z. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 490, p. 50–56. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.10.050>

PRADO, E. R. A.; LEMOS, F. L.; LARA, I.; CLARO, E; O.; JORGE, L. M. M. Refino de óleos vegetais utilizando lavagem ácida com recirculação. **Engevista**. V. 16, n. 3, p. 384-391. 2014

QUEIROZ, D. S., PARREIRA, J. M.; BASTOS, C. M.; ET, A. L. Efeito do solvente na atividade enzimática de lipases comerciais imobilizadas. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, 2014.

RAITA, M.; LAOTHANACHAREON. T.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N. Biocatalytic esterification of palm oil fatty acids for biodiesel production using glycine-based cross-linked protein coated microcrystalline lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 73, p. 74-79, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.07.020>

RAMOS, L. P.; KOTHE, V.; APARECIDA, M.; MUNIZ-WYPYCH, A. S.; NAKAGAKI, S.; KRIEGER, N.; WYPYCH, F. CORDEIRA, C. Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. **Revista Virtual de Química**. v. 9, n. 1, p. 317-369, 2016.

RANA Q.U.A.; IRFAN, M.; AHMED, S.; HASAN, F.; SHAH, A.A.; KHAN, S.; REHMAN, F.U.; KHAN, H.; JU, M.; LI, W.; BADSHAH, M. Bio-catalytic transesterification of mustard oil for biodiesel production. **Biofuels**. v. 13, n. 1, p. 69-76. 2022. <https://doi.org/10.1080/17597269.2019.1655907>

REN, H.; LI, Y.; LIU, D. Free Lipase-Catalyzed Esterification of Oleic Acid Fatty Acid Ethyl Ester Preparation with response surface optimization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, p. 73-79, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2146-3>

RESEARCH AND MARKETS. **Biodiesel Market by blend, Feedstock, Application and Geography – global Forecast to 2029.** Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/report/biodiesel#reld0-5682249>. Acesso em: 06/11/2023.

REZANIA, S.; ORYANI, B.; PARK, J.; HASHEMI, B.; YADAV, K.K.; KWON, E.E.; HUR, J.; CHO, J. Review on transesterification of non-edible sources for biodiesel production with a focus on economic aspects, fuel properties and by-product applications. **Energy Conversion and Management**. v. 201, p. 112155. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112155>

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M. D.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 16, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/615803>

ROCHA, K.S.C.; QUEIROZ, M.S.R.; GOMES, B.S.; DALLAGO, R.; SOUZA, R.O.M.A.; GUIMARÃES, D.O.; ITABAIANA JR., I.; LEAL, I.C.R. Lipases of Endophytic Fungi *Stemphylium lycopersici* and *Sordaria sp.*: Application in the synthesis of solketal derived Monoacylglycerols. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 142, p. 109664. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109664>

RODRIGUES, J. G. C.; CARDOSO, F. V.; SANTOS, C. C. D.; MATIAS, R. R.; MACHADO, N. T.; DUVOISIN JUNIOR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. Biocatalyzed Transesterification of Waste Cooking Oil for Biodiesel Production Using Lipase from the Amazonian Fungus *Endomelanconiopsis endophytica*. **Energies**, v. 16, 6937, 2023. <https://doi.org/10.3390/en16196937>

ROJAS, E. I.; HERRE, E. A.; MEJÍA, L. C.; ARNOLD, A. E.; CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Endomelanconiopsis*: a new anamorph genus in the Botryosphaeriaceae. **Mycologia**. v. 100, n. 5, p. 760-770, 2008. <https://doi.org/10.3852/07-207>

ROMDHANE, I. B.; ROMDHANE, Z. B.; BOUZID, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Application of a chitosan-immobilized *Talaromyces thermophilus* lipase to a batch biodiesel production from waste frying oils. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 171, p. 1986-2002, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0449-y>

ROSSET, D.V.; WANCURA, J.H.C.; MAZUTTI, M.A.; JAHN, S.L. Produção de biodiesel catalisada por lipases solúveis: influência do excesso de metanol e da concentração de água na reação. **Anais do XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, São Carlos, 2017.

ROVERE, B.O.; RODRIGUES, J.H.; TELEKEN, J.G. Reduction of the acidity index through neutralization and esterification for bio-diesel production. **Brazilian Journal of Development**. v. 6, n. 5, p. 24678-24686. 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-064>

SAHAR, S.S.; IQBAL, J.; ULLAH, I.; BHATTI, H.N.; NOUREN, S.; REHMAN, H.; NISAR, J.; IQBAL, M. Biodiesel production from waste cooking oil: An efficient Technique to convert waste into biodiesel. **Sustainable Cities and Society**. v. 41, p. 220-226. <https://doi.org/10.1016/j.scs.2018.05.037>

SAINI, R.; DAHIYA, A.; MEHTA, S. Extraction, partial purification and characterization of amylase from apple (*Malus pumila*). **International Journal of Food and Nutritional Science**. v. 5, n. 3, p. 176-181. 2016.

SALIHU, A.; ALAM, Md. Z.; ABDULKARIM, M.; SALLEH, H. M. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.10.007>

SALTARIN, M. N. **Produção de biodiesel em laboratório a partir de gordura residual e etílica com hidróxido de sódio**. 2016. Monografia (Graduação em Engenharia Química) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

SALUM, T. F. C.; PIGHINELLI, A. L. M. T.; DAMASO, M. C. T. **Produção de biodiesel por catálise enzimática: Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 257-276.

SARI, A. N. M.; KOENTJORO, M. P.; PRASETYO, E. N. Lipase Immobilization based on biopolymer. In: Surabaya International Health Conference, 2019, Surabaya. **Resumo [...]** Empowering Community For Health Status Improvement, Surabaya, 2019.

SARNO, B.; IULIANO, M. Biodiesel production from waste cooking oil. **Green Processing and Synthesis**. v. 8, n. 1, p. 828-836. <https://doi.org/10.1515/gps-2019-0053>

SCOPES, R.K. Protein Purification: Principles and Practice, 3 ed. Reino Unido: Springer, 1994. p. 406

SENA, I.S.; FERREIRA, A.M.; MARINHO, V.H.; HOLANDA, F.H.; BORGES, S.F.; SOUZA, A.A.; KOGA, R.C.R.; LIMA, A.L.; FLORENTINO, A.C.; FERREIRA, I.M. *Euterpe oleracea* Mart (Açaizeiro) from the Brazilian Amazon: A Novel Font of Fungi for Lipase Production. **Microorganisms**. v. 10, n. 12, p. 2394. 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122394>

SHELDON, R. A.; PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**. v. 15, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>

SHETTY, P. Glucoamylase from the precious fungus *Arthrobotrys conoides*: a cationic enzyme with high debranching activity and raw starch digestibility. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 176-182, 2016. <https://doi.org/10.1134/S0003683816020150>

SHUARÇA, R. L.; MARTIM, E. Caracterização físico-química de biodiesel por análises elementares. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Resumo**. Chemical Engineering Proceedings: XX COBEQ, Florianópolis, 2014.

SILVA, A.; RESENDE, R. J.; COSTA, T. C.; SOUSA, B. V. O.; SANTOS, A. K.; MAROTTI, B. S.; SILVA, S. L.; CANCELIER, A.; GONÇALVES, D. B. Análise do potencial biocatalítico de lipase de *Candida rugosa* imobilizada em diferentes suportes. **Acta Ambiental**, v. 18, p. 10-23, 2021. <https://doi.org/10.24021/raac.v18i1.5505>

SILVA, D. A.; SANTOS, A. A.; BETTENCOURT, G. M.; ZANDONÁ FILHO, A.; RODRIGUES, M. L. F. **Aplicação de lipases fúngicas para a redução de óleos e graxas de efluentes de um abatedouro da região metropolitana de Curitiba**. Monografia (Tecnólogo em Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2016.

SILVA, F.A. **Estudo da produção de biodiesel utilizando etanol e óleo de soja ou de macaúba, catalisada por lipase de mamona e de *Thermomyces lanuginosus***. Dissertação (Mestrado em). Universidade de São Carlos, São Carlos, 2015.

SILVA, S. S. **Produção, caracterização e aplicação de lipase de *Aspergillus niger* ATCC 1004 produzida a partir de óleo de soja**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2017.

SILVA, S. S.; COSTA, M. B. S.; SOUZA, A. Q. L.; CARNEIRO, W. S.; OLIVEIRA, C. M. Isolation and identification of endophytic fungi of *Passovia stelis* (Loranthaceae). **Brazilian Applied Science Review**. v. 4, n. 3, p. 1262-1270, 2020. <https://doi.org/10.34115/basrv4n3-041>

SILVEIRA, E. A. **Produção, caracterização e imobilização de lipases e sua aplicação na síntese de ésteres alquílicos de ácidos graxos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

SINDHU, R.; SUPRABHA, G. N.; SHASHIDHAR, S. Purification and characterization of α -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) and its application in detergent industry. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, v. 1, n. 1, p. 25-32, 2011.

SIQUEIRA, A.F.; VIDIGAL, I.G.; MELO, M.P.; GIORDANI, D.S.; BATISTA, P.S.; FERREIRA, A.L.G. Assessing waste cooking oils for the production of quality biodiesel using an electronic nose and a stochastic model. **Energy & Fuels**. v. 33, n. 4, p. 3221-3226. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b04230>

SOARES, D. A.; PIMENTA, R. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de pigmentos extracelulares produzidos por fungos endofíticos. **Journal of Bioenergy and Food Science**. v. 2, n. 4, p. 152-155, 2015.

SOJI-ADEKUNLE, A.R.; ASERE, A.A.; ISHOLA, N.B.; OLOKO-OBA, I.M.; BETIKU, E. Modelling of synthesis of waste cooking oil methyl esters by artificial neural network and response surface methodology. **International Journal of Ambient Energy**. v. 40, n. 7, p. 716-725. <https://doi.org/10.1080/01430750.2017.1423378>

SOPALUN, K.; LAOSRIPAIBOON, W.; WACHIRACHAIKARN, A.; IAMTHAM, S. Biological potential and chemical composition of bioactive compounds from endophytic fungi associated with Thai mangrove plants. **South African Journal of Botany**. v. 141, p. 66-76. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.031>

SOUZA, L. T. A.; MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Selection of Lipase for the Synthesis of Biodiesel from Jatropha Oil and Potential of Microwave Irradiation to Enhance the Reaction Rate. **BioMed Research International**, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1404567>.

SOUZA, V. H.; PACHECO, S. M. V.; CRUZ JUNIOR, A.; FURIGO JUNIOR, A. **Produção de biodiesel utilizando catalisador comercial enzimático e óleo residual em frituras**. In: 2º Simpósio de Integração Científica e Tecnológica do Sul Catarinense, Araranguá, 2013. Anais [...] Revista Técnico-Científica do IF-SC (Impresso), 2013.

SRINIVASAN, G.R.; JAMBULINGAM, R. Comprehensive study on biodiesel produced from waste animal fats - A review. **Journal of Environmental Science and Technology**. v. 11, n. 3, p. 157-166. 2018. <https://doi.org/10.3923/jest.2018.157.166>

STACHIW, R.; RIBEIRO, S. B.; JARDIM, M. A. G.; POSSIMOSER, D.; ALVES, W. C.; CAVALHEIRO, W. C. S. Potencial de produção de biodiesel com espécies oleaginosas nativas de Rondônia Brasil. **Acta Amazonia**, v. 46, n.1, p. 81-90, 2016. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201501151>

SUDHA, V.; GOVINDARAJ, R.; BASKAR, K.; AL-DHABI, K.; DURAIPANDIYAN, V. Biological properties of endophytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.59, p. 1-5, 2016. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150436>

SUHERMAN, S.; ABDULLAH, I.; SABRI, M.; SILITONGA, A. S. Evaluation of Physicochemical Properties Composite Biodiesel from Waste Cooking Oil and Schleicher oleosa Oil. **Energies**, v. 16, p.5771, 2023. <https://doi.org/10.3390/en16155771>

SUN, B.; CHEN, A. J.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; WU, W.; WEI, H.; ZHOU, Y.; JIANG, X.; SAMSON, R. A. New section and species in *Talaromyces*. **Mycokeys**. v. 68, p. 75-113. 2020. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.68.52092>

SUN, Z. H.; LIANG, F.; CHEN, Y. LAU, H. X.; LI, H. H.; SHANG, W.A. Two new xyloketal from the endophytic fungus *Endomelaconiopsis endophytica* derived from medicinal plant *Ficus hira*. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 18, n. 11, p. 1036-1041. 2016. <https://doi.org/10.1080/10286020.2016.1188084>

SUZIHAQUE, M.U.H.; ALWI, H.; KALTHUM IBRAHIM, U.; ABDULLAH, S.; HARON, N. Biodiesel production from waste cooking oil: A brief review. **Materials Today: Proceedings**. v. 63, n. 1, p. S490–S495. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.527>

SZYMCZAK, T.; CYBULSKA, J.; PODLE'SNY, M.; FRAC, M. Various Perspectives on Microbial Lipase Production Using Agri-Food Waste and Renewable Products. *Agriculture*. v. 11, n. 6, p. 540-561. 20. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060540>

TABATABAEI, M.; AGHBASHLO, M.; DEHHAGHI, M.; PANAHI, H. K. S.; MOLLAHOSSEINI, A.; HOSSEINI, M.; SOUFIYAN, M. M. Reactor technologies for biodiesel production and processing: A review. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 74, p. 239-303, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2019.06.001>

TAHER, H.; NASHEF, E.; ANVAR, N.; AL-ZUHAIR, S. Enzymatic Production of Biodiesel from Waste Oil in Ionic Liquid Medium. **Biofuels**, v. 10, p. 463-472, 2017. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1316145>

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 207-212, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.015>

TAMBOR, J. H. M.; CWEJGORN, F. V.; SANTOS, A. G.; LOPES, G. C.; LESCANO, V. P. Produção de biodiesel a partir do óleo de cozinha usado: uma alternativa sustentável. **Revista Caleidoscópio**. v. 11, n. 1, p. 545-548, 2019.

TAN, C. H.; SHOW, P. L.; OOI, C. W.; NG, E.; LAN, J. C.; LING, T. C. Novel lipase purification methods – a review of the latest developments. **Biotechnology Journal**, v. 10, p. 1 – 14, 2015. <https://doi.org/10.1002/biot.201400301>

TEXEIRA, V. F. T. **Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel**. 2011. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro. 2011.

THANGARAJ, B.; JIA, Z.; DAI, L.; LIU, D.; DU, W. Effect of silica coating on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for lipase immobilization and their application for biodiesel production. **Arabian Journal of Chemistry**. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09>.

THANH, L. T.; OKITSU, K.; VAN BOI, L.; MAEDA, Y. Catalytic Technologies for Biodiesel Fuel Production and Utilization of Glycerol: A Review. **Catalysts**, v. 2, p. 191–222, 2012. <https://doi.org/10.3390/catal2010191>

THILAKARATHNE, D.; MIYURANGA, K.A.V.; ARACHCHIGE, U.S.P.R.; WEERASEKARA, N. A.; JAYASINGHE. Production of biodiesel from Waste Cooking Oil Laboratory Scale: A Review. **International Journal of Scientific Engineering and Science**. v. 5, n. 6, p. 28-34. 2021.

TIONG, A.N.T.; KHAN, Z.; CHIN, Z.; WAHID, O. A.; WACHIRA, R.M.; KUNG, S.M. Plant design of biodiesel production from waste cooking oil in Malaysia. **Biofuels**. v. 14, n. 4, p. 353–364. <https://doi.org/10.1080/17597269.2022.2138127>

TOMBINI, J. **Produção de lipase fúngica a partir de subprodutos do processamento de soja**. 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

VAZ, M.; CHOUPINA, A. Lipases: biocatalizadores da hidrólise de triacilgliceróis. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 5, n. 3, p. 42-58, 2012.

VAZQUEZ, V. A.; AGUILERA FLORES, M. M.; HERNÁNDEZ CASAS, L. F.; MEDELLÍN CASTILLO, N. A.; ROCHA URIBE, A.; CORREA AGUADO, H. C. Biodiesel Production Catalyzed by Lipase Extract Powder of *Leonotis nepetifolia* (Christmas Candlestick) Seed. **Energies**, v.16, p. 2848-2860, 2023. <https://doi.org/10.3390/en16062848>

VETRANO, A.; GABRIELE, F.; GERMANI, R.; SPRETI, N. Characterization of lipase from *Candida rugosa* entrapped in alginate beads to enhance its thermal stability and recyclability. **New Journal of Chemistry**, v. 46, 2022. <https://doi.org/10.1039/D2NJ01160C>

WINKLER, U. K. STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979. <https://doi.org/10.1128/jb.138.3.663-670.1979>

XIE, W.; HUANG, M. Enzymatic Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase on Core-Shell Structured Fe₃O₄@MIL-100(Fe) Composites. **Catalysts**. v. 9, n. 10, p.850, 2019. <https://doi.org/10.3390/catal9100850>

XIA, S.; LIN, J.; SAYANJALI, S.; SHEN, C.; CHEONG, L. Z. Lipase-catalyzed production of biodiesel: a critical review on feedstock, enzyme carrier and process factors. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 18, n. 1, p. 291-309, 2024. <https://doi.org/10.1002/bbb.2561>

XIE, W.; MA, N. Immobilized Lipase on Fe₃O₄ Nanoparticles as Biocatalyst for Biodiesel Production. **Energy Fuels**. V.23, n. 3, p. 1347–1353. 2009. <https://doi.org/10.1021/ef800648y>

YAMASAKI, Y.; SUZUKI, Y.; OZAWA, J. Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 5, p. 755-762. 1977. <https://doi.org/10.1080/00021369.1977.10862579>

YAN, J.; YAN, Y.; LIU, S.; HU, L. J.; WANG, G. Praparation of cross-linked lipase-coated micro-crystals for biodiesel production from waste cooking oil. **Bioresource Technology**., v. 102, p 4755-4758. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.006>

ZAMBARE, V.; PATANKAR, R.; BHUSARE, B.; CHRISTOPHER, L. Recents Advances in Feedstock and Lipase Research and Development towards Commecialization of Enzymatic Biodiesel. **Processes**. v. 9, n. 10. 2021. <https://doi.org/10.3390/pr9101743>

ZANOTTO, S. P.; ROMANO, I. P.; LISBOA, L. U. S.; DUVOISIN JR., S.; MARTINS, M. K.; LIMA, F. A.; ALBUQUERQUE, P. M. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1046-1059, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000600008>

ZHAO, J.; MA, M.; ZENG, Z.; YU, P.; GONG, D.; DENG, S. Production, purification and biochemical characterisation of a novel lipase from a newly identified lipolytic bacterium *Staphylococcus caprae* NCU S6. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 248-256, 2021. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1861607>

ZHONG, L.; FENG, Y.; WANG, G.; WANG, Z.; BILAL, M.; LV, H.; JIA, S.; CUI, J. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 207-222, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.258>

ANEXOS

ANEXO A – 1º produto gerado pela Tese - Artigo publicado na revista Energies em 2023.



Article

Biocatalyzed Transesterification of Waste Cooking Oil for Biodiesel Production Using Lipase from the Amazonian Fungus *Endomelanconiopsis endophytica*

Juliana Gisele Corrêa Rodrigues ^{1,2}, Fernanda Veras Cardoso ², Celine Campos dos Santos ², Rosiane Rodrigues Matias ², Nêlio Teixeira Machado ³, Sergio Duvoisin Junior ² and Patricia Melchionna Albuquerque ^{1,2,*}

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus 69050-010, Brazil; juliana.gcr@gmail.com
- ² Grupo de Pesquisa Química Aplicada à Tecnologia, Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus 69050-020, Brazil; fvc.gpq20@uea.edu.br (F.V.C.); ccds.gpq20@uea.edu.br (C.C.d.S.); rosiane.matias128@gmail.com (R.R.M.); sjunior@uea.edu.br (S.D.J.)
- ³ Faculdade de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-930, Brazil; machado@ufpa.br
- * Correspondence: palbuquerque@uea.edu.br



Citation: Rodrigues, J.G.C.; Cardoso, F.V.; Santos, C.C.d.; Matias, R.R.; Machado, N.T.; Duvoisin Junior, S.; Albuquerque, P.M. Biocatalyzed Transesterification of Waste Cooking Oil for Biodiesel Production Using Lipase from the Amazonian Fungus *Endomelanconiopsis endophytica*. *Energies* **2023**, *16*, 6937. <https://doi.org/10.3390/en16196937>

Academic Editors: Carmen Otília Rosalesco and Nicoleta Unguraru

Received: 1 September 2023
Revised: 29 September 2023
Accepted: 1 October 2023
Published: 3 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The demand for biodiesel worldwide is skyrocketing as the need to replace fossil diesel with renewable energy sources becomes increasingly pressing. In this context, biocatalysis is emerging as an environmentally friendly and highly efficient alternative to chemical catalysis. When combined with the utilization of waste materials, it has the potential to make the process of biodiesel production sustainable. In the study, the potential of an extract rich in lipase produced by an Amazonian endophytic fungus as a biocatalyst in the transesterification of waste cooking oil for biodiesel production has been systematically investigated. The fungus *Endomelanconiopsis endophytica* exhibited an enzyme production of 11,262 U/mL after 120 h of cultivation. The lipolytic extract demonstrated its highest catalytic activity at 40 °C and a pH of 5.5. Using soybean oil and frying residue as raw materials, biodiesel was produced through biocatalytic transesterification, and yields of 91% and 89% (wt.), respectively, were achieved. By evaluating the process parameters, a maximum biodiesel yield of 90% was achieved using ethanol at a ratio of 3:1 ratio within 120 min. The experimental results demonstrate the feasibility and sustainability of applying a fungal enzymatic extract as a biocatalyst in the production of ethyl esters using waste cooking oil as a raw material.

Keywords: biocatalysis; *Endomelanconiopsis endophytica*; ethanol; transesterification; biodiesel

1. Introduction

Fossil diesel is a non-renewable energy source that generates pollutants and is directly associated with global warming, climate change and even some incurable diseases [1]. Biodiesel, being a renewable fuel, has become an attractive alternative to replace diesel or be blended with it in order to mitigate pollution problems [2]. The advantages of biofuel over diesel include the fact that it is safe, non-toxic and biodegradable; contains no sulfur; and is a better lubricant. In addition, the global demand for biodiesel has been increasing considerably in recent years due to public policies that demand increased incorporation of biodiesel in diesel [3]. The global biodiesel market is estimated to be worth around US \$54.8 billion in 2028, with a compound expected annual growth of around 5.8% between 2021 and 2028 [4].

In Brazil, soybean oil is the main raw material used to produce biodiesel and, as such, represents 70 to 80% of the total cost of the production of the biofuel [5]. In addition, soybean oil is a widely used product in the food industry, which fuels the debate regarding

the need to prioritize its use for food rather than fuel [6,7]. One solution to decrease this cost and the impasse over the use of food oils is to replace the soybean oil used in fuel production with waste cooking oil [7–11].

Waste cooking oil is a valuable source of raw materials that have considerable potential for biodiesel production and stand out for their lower cost when compared to refined vegetable oils [12–16]. These waste oils constitute one of the main categories of organic waste generated in commercial establishments in the food sector and in households and are a widely available raw material. In addition, waste cooking oil represents an environmental threat, since it contributes to soil and water pollution and causes clogging in sewage systems [14,17].

By virtue of its remarkable energy density, waste cooking oil can play a key role in the production of biodiesel [7,18]. Therefore, the use of cooking oil as a raw material in the manufacture of biodiesel can be considered an environmentally responsible and sustainable approach to the management of such waste [7,19]. Additionally, approximately 20% of all biofuels used in Europe currently originate from waste cooking oil, the use of which has grown when compared to other biomass-based feedstocks [20]. This finding reinforces the need to explore and improve new processes for biodiesel production.

The main method for commercial biodiesel production is alkaline catalysis, which involves base-catalyzed transesterification (such as NaOH or KOH) to convert long-chain fatty acids to esters [17,21]. However, this process generates a highly alkaline effluent, requires significant water consumption in the purification steps and faces challenges in the recovery of glycerol [22]. In addition, when waste cooking oil is used as a raw material, preliminary treatment is required, which increases the costs of biodiesel production [16,17,20]. Therefore, alternatives are actively sought to optimize this process, such as the adoption of biocatalysis with the use of lipases [17,23,24].

Lipases are enzymes whose biological function is to catalyze the hydrolysis of fats and oils, releasing free fatty acids, diacylglycerols, monoacylglycerols and glycerol [25]. Nonetheless, depending on the reaction conditions, these enzymes can also act as catalysts for transesterification reactions (acidolysis, aminolysis and alcoholysis), esterification and interesterification [26]. These enzymes generated 1.94 billion US dollars in 2019, with an estimated market increase of 5.9% per year until 2026 [27]. Lipases demonstrate considerable levels of activity and stability in non-aqueous environments, which favors the catalysis of reactions such as esterification and transesterification [28].

Lipases of microbial origin have numerous industrial applications, such as in the pharmaceutical, food and chemical industries [29,30]. Some studies have shown that endophytic fungi are promising sources of these enzymes [31–34], and microorganisms associated with tropical hosts are still little explored for this application.

The transesterification process for conversion of the oily feedstock into long-chain fatty acid esters is a kinetically controlled reaction, and therefore, the biodiesel yield depends on the catalyst [35]. The performance of lipase, in turn, depends on several factors, including adsorption characteristics of the active center of the enzyme, specificity, and inhibitors of the reaction, among others [26]. As a result, the search for new sources of obtaining this enzyme becomes interesting [4].

The choice of the biocatalytic approach in this study aims to improve biodiesel production by using waste cooking oil as a raw material, making it more efficient and ecologically responsible. This is possible thanks to the use of an extract enriched with lipase obtained from an Amazonian endophytic fungus. This fungus is recognized as a promising source of enzymes of industrial interest and offers a valuable alternative to traditional sources of lipolytic enzymes. Specifically, this research uses the fungus *Endomelaconiopsis endophytica* as a catalyst in the production of biodiesel from waste cooking oil in order to evaluate its viability. This approach not only contributes to the sustainable and efficient production of biodiesel but also strengthens the industry by diversifying the sources of raw materials and offering an additional source of industrial enzymes.

2. Materials and Methods

The present study was conducted following the steps described in the flowchart shown in Figure 1. Initially, the enzyme extract was produced from the Amazonian endophytic fungus *E. endophytica* QAT_7AC in submerged culture. The lipase produced was characterized in terms of optimal pH and temperature ranges. Simultaneously, the waste cooking oil was collected, filtered and characterized in terms of density, acidity index, saponification index and peroxide index. Enzymatic transesterification of the waste cooking oil was performed in the presence of alcohol (ethanol or methanol) and lipase, resulting in biodiesel that was purified and then analyzed using GC-MS. The process was studied using comparative evaluations, and with the aid of an experimental design, the influence of alcohol type, reaction time and alcohol:oil ratio on biodiesel yield was evaluated.

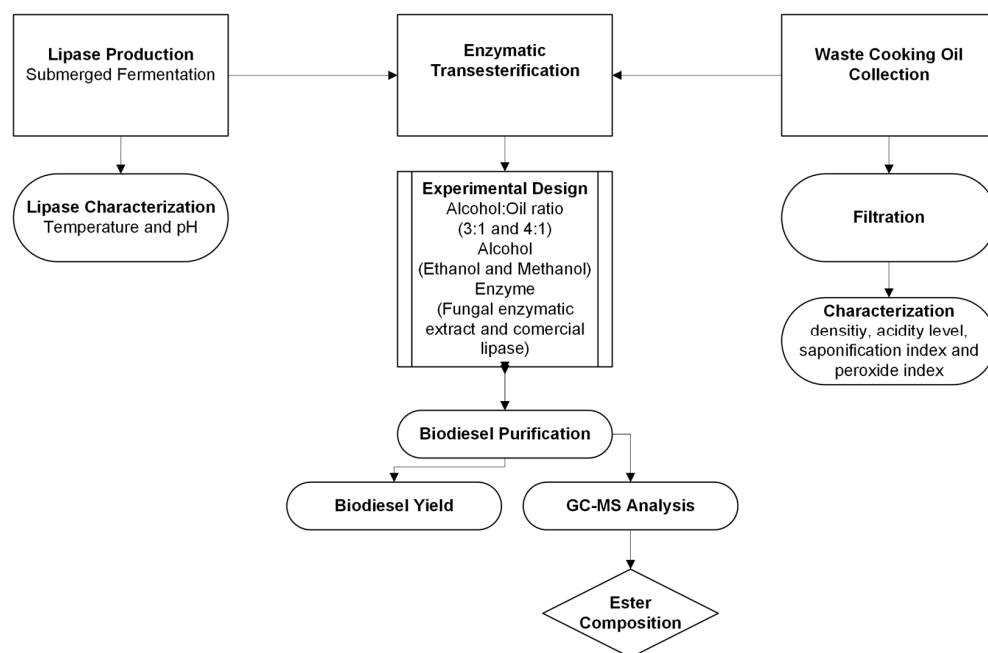


Figure 1. Flowchart of the steps taken to obtain biodiesel via enzymatic transesterification.

2.1. Waste Cooking Oil and Soybean Oil

The waste cooking oil was provided by a restaurant located in the city of Manaus. The waste oil was collected in a sufficient quantity to perform all the experiments. After filtration, it was stored in bottles at room temperature. Unused soybean oil, used for comparison purposes, was purchased in a local supermarket.

2.2. Physicochemical Characterization of Waste Cooking Oil

Density was determined according to the AOCS [36], using a 5 mL pycnometer. For the determination of the acidity index, the methodology described by the Instituto Adolfo Lutz [37] was followed; 5 g of residue were homogenized in an ether:alcohol solution (2:1) *v/v* and titrated with 0.1 M of potassium hydroxide solution (previously standardized). The peroxide index was defined by the ability of the residue to oxidize potassium iodide, as described by the AOCS [38], as well as the saponification index, which was determined by the KOH mass required to neutralize the free fatty acids obtained from the hydrolysis of 1 g of the residue [39].

2.3. Microorganism

The endophytic fungus *Endomelaconiopsis endophytica* QAT_7AC, isolated from *Aniba canelilla* (Lauraceae), was used in the present study for lipase production. The fungus is part of the Central Microbiological Collection (CMC) of the Universidade do

Estado do Amazonas (UEA) and was previously selected as a good producer of the enzyme [33]. Its reactivation was carried out in a potato dextrose agar (PDA) medium, in a BOD chamber (Tecnal, TE-39I, Piracicaba, Brazil) at 30 °C for 11 days.

2.4. Lipase Production

The fungus was cultured in Erlenmeyer flasks containing 100 mL of liquid medium composed of NH_2NO_3 (1.0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.6 g/L), KH_2PO_4 (1.0 g/L), peptone (20 g/L) and olive oil (1.0%), pH 6.0 [40]. The fungus *E. endophytica* was inoculated with three mycelial discs (5 mm in diameter) taken from the edge of the colony grown in PDA. The vials were incubated in a shaker (Tecnal, TE-4200, Piracicaba, Brazil) for 7 days at 28 °C under 160 rpm agitation. The experiments were conducted in triplicate. Every 24 h, 1 mL aliquots were taken and filtered for further measurement of enzymatic activity. From the determination of the enzymatic activity during the cultivation time, the time to obtain the enzyme was defined, which was later used in the production of the biodiesel.

2.5. Determination of Lipase Enzyme Activity

The lipolytic activity was quantified according to the methodology of Winkler and Stuckmann [41], whereby a *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) emulsion was prepared by adding (dropwise) 1 mL of solution A (30 mg of *p*NPP dissolved in 10 mL of isopropanol) in 9 mL of solution B (0.4 g of Triton X-100; 0.1 g of gum arabic and 90 mL of 50 mM tris HCl buffer, pH 7.0) under intense agitation. The emulsion obtained and the previously filtered enzyme extract samples were stabilized for 5 min at 37 °C. An aliquot of 0.2 mL of the supernatant was added to 1.8 mL of the substrate emulsion and the mixture was incubated for 15 min at 40 °C. The absorbance of the mixtures was measured in a spectrophotometer (Shimadzu, UV-1800, Kyoto, Japan) at 410 nm [42]. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to release 1.0 μmol of *p*-nitrophenol per minute under assay conditions.

2.6. Characterization of Enzyme Extract

To determine the pH that best favors the highest enzymatic activity, the extract of the fungal enzyme was incubated in a 50 mM citrate buffer (pH 5.5 and 6.0) and sodium phosphate buffer (pH 7.0, 8.0 and 8.5). The determination of the optimal temperature for the lipolytic extract was carried out via its incubation at 35, 37, 40, 45 and 50 °C [33,43].

2.7. Determination of Protein Concentration

The dosage of proteins present in the enzyme extract was determined by using the Bradford method [44], in which 100 μL of enzyme extract was mixed with 1.0 mL of Bradford reagent, followed by the reading of the absorbance in a spectrophotometer at 595 nm. Bovine serine albumin (BSA) was used as the reference standard.

2.8. Enzymatic Transesterification—Biodiesel Production

Initially, enzymatic transesterification was performed with two different raw materials: unused soybean oil (used as a control for comparison purposes) and waste cooking oil, in order to verify the feasibility of using the waste oil via the biocatalytic route. The reaction time was 360 min and the ethanol:oil ratio was 3:1. The enzyme extract was added to the reaction medium at a concentration of 3% (*m/v*) [45,46]. The reactions were carried out in an adapted bench reactor, with constant stirring at 150 rpm and at a temperature of 40 °C, ideal conditions for the enzyme to act [47,48]. The adaptation of the reactor was carried out as follows: raw materials totaling 100 mL were added to 250 mL sealable borosilicate glass Erlenmeyer flasks. The flasks were placed in a shaker (Tecnal, TE-4200, Piracicaba, Brazil), with precise control of temperature and agitation. Figure 2 schematically illustrates the procedure used in the assay.

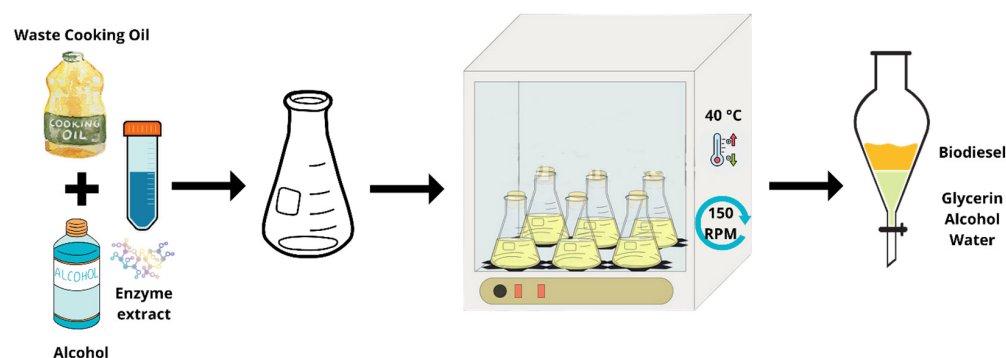


Figure 2. Illustration of the procedure used in the enzymatic transesterification reaction to obtain biodiesel.

After this, the ethanol:oil ratios of 2:1 and 3:1 were evaluated, using the waste oil and the enzyme extract. The commercial enzyme *Candida rugosa* lipase (Sigma-Aldrich, L1754, St. Louis, MI, USA) was used for comparison with the fungal extract. The biocatalytic reaction of the waste oil was also evaluated from a 2^3 experimental design, in which the influence of the reaction time (120 and 360 min), the type of short-chain alcohol (methanol and ethanol) and the alcohol:oil ratio (3:1 and 4:1) were determined. The reaction time was chosen based on the reaction time used to produce biodiesel under alkaline or acid catalysis [49,50]. The alcohol:waste cooking oil ratio was set considering amounts of alcohol that would not denature the enzyme [48,51]. The tests were performed in triplicate.

2.9. Purification of the Biodiesel

At the end of the reaction, the mixture obtained was transferred to a separation funnel and allowed to stand for 24 h. After phase separation, the biodiesel was washed with 50 mL water [52] (approximately 1 mL of water to 2 mL of biodiesel) and then subjected to gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis. The mass of biodiesel obtained after purification was used in the calculation of the yield.

2.10. Chromatographic Analysis

To confirm the production of biodiesel, the methodology described by Naser et al. [53] with adaptations was used. One mL of acetone was added to 100 μ L of the sample obtained after the purification process. The sample was then analyzed on a chromatograph (Agilent Technologies, CG-7890B, Santa Clara, CA, USA) coupled to a mass spectrometer (Agilent Technologies, MS-5977a, Santa Clara, CA, USA). The column used was a Carboxen 1010 (30 m $\times$ 0.53 mm). The carrier gas was H_2 with a flow of 1.2 mL/min. The initial temperature of the column was 100 $^{\circ}$ C, maintained for 1 min, with a heating rate of 5 $^{\circ}$ C/min up to 290 $^{\circ}$ C, maintained at this temperature for another 21 min. The temperatures of the injector and detector remained at 300 $^{\circ}$ C. The amount of sample injected was 3 μ L. The resulting mass spectra were compared with those of the NIST Standard Reference Database 1A library. This comparison allowed the identification of the compounds present in the biodiesel samples.

2.11. Biodiesel Yield

The yield of biodiesel produced was calculated from the mass of biodiesel obtained after the transesterification reaction ($m_{\text{biodiesel}}$), as a function of the mass of oil or waste oil (m_{oil}) used in the reaction (Equation (1)) [21,54,55].

$$\text{Yield (\%)} = \frac{m_{\text{biodiesel}}}{m_{\text{oil}}} \times 100 \quad (1)$$

2.12. Statistical Analysis

The results were expressed as mean and standard deviations and submitted to the analysis of normality and homogeneity of data, analysis of variance (ANOVA) and Student's t and Tukey tests ($p < 0.05$). The data from the experimental design were analyzed with the aid of Statistica 10.0 software ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of the Waste Oil

The results obtained for the characterization of the waste cooking oil, used as raw material for biodiesel production, are presented in Table 1, which also shows results found by other authors for the characterization of this type of oil.

Table 1. Characterization of waste cooking oil used for biodiesel production.

Density at 25 °C (g/cm ³)	Acidity Index (mgKOH/g)	Peroxide Index (meq/kg)	Saponification Index (mgKOH/g)	Reference
0.922	1.45	25.98	172.77	Castro et al., 2018 [56]
0.908	28.50	-	175.87	Aworanti et al., 2019 [57]
0.916	35.40	-	234.71	Al-Saadi et al., 2020 [58]
-	1.86	-	181.25	Farooq et al., 2015 [59]
0.917	1.78	18.36	-	Siqueira et al., 2019 [60]
0.917	5.75	19.38	175.70	This study

High values are observed for the acidity and peroxide indices when compared to the specific values for refined oil, which is the main raw material used for biodiesel production in Brazil [61]. However, these values are in accordance with those obtained for waste cooking oil, as can be seen in Table 1. According to Castro et al. [56] and Plata et al. [62], the high values of the acidity index and peroxide index indicate the thermal and oxidative degradation of the oil, caused by the high temperature of the frying process in contact with atmospheric oxygen. The low saponification index value may be associated with the occurrence of hydrolysis during the frying process, releasing unsaponifiable impurities. It is also observed that the residue presented a density that is close to that of commercial soybean oil (0.9205 g/cm³) [63], which, according to Castro et al. [56], may be an indication that there are no significant amounts of water or impurities in the waste oil.

The parameters analyzed presented values similar to those of other studies [56–60,64,65], in which waste oil was used for biodiesel production. This indicates that the waste oil used in this study also presents adequate characteristics for the lipase-catalyzed transesterification reaction. However, it is important to note that, unlike other studies [56,59,66], the waste oil used in our research did not undergo any type of treatment; it was only filtered and used directly in the enzymatic transesterification reaction.

3.2. Enzyme Production

Lipase enzyme activity was evaluated daily during submersed culture of the endophytic fungus *E. endophytica* QAT_7AC (Figure 3). It can be observed that the highest lipase production, of 11,262 U/mL, occurred after 120 h of fungal culture. The enzymatic extract presented a protein concentration of 1.85 mg/mL, which means that the extract has a high specific enzymatic activity of 6087 U/mg.

From the adjustment of the experimental data, it was possible to draw a polynomial curve and, from this, generate an equation that could mathematically describe the enzymatic production of *E. endophytica*, which is presented in Equation (2) ($R^2 = 0.9538$):

$$y = -1.0135x^2 + 270.47x - 7069.7 \quad (2)$$

Y = enzyme activity (%)

X = growing time in hours

Abu et al. [67], as well as Dutta et al. [68] and Behera et al. [69], also used mathematical models to describe the production of microbial lipase. The equation derived from the polynomial curve provides a quantitative and modeled approach to understand the performance of enzyme production over time. This approach not only helps to identify the point of maximum enzymatic activity but also provides a tool for optimizing the time to obtain the enzyme. Using the equation, it is possible to anticipate and predict enzyme production over time [67–69].

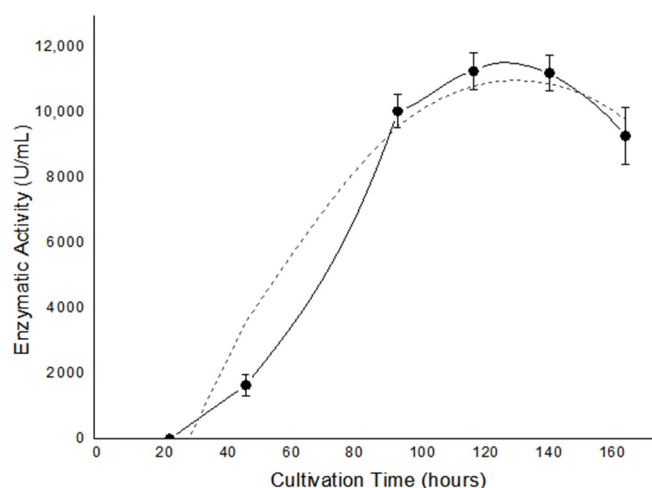


Figure 3. Lipase production of the Amazonian fungus *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC in submerged culture (●) and polynomial curve (–).

The results of enzyme production can be considered promising. When compared to the result obtained by Carvalho Neto [70], who used the same fungal species, it is noted that *E. endophytica* isolated from *A. canelilla* presents greater enzymatic activity. In addition, when compared to other endophytic fungi [71,72] and even bacteria [35], *E. endophytica* QA7_AC demonstrates excellent potential as a source of lipase, with high extracellular enzyme production.

However, when evaluating the time taken to obtain the highest lipolytic activity, it is noted that QAT_7AC begins enzymatic production only after 24 h of culture, with a peak at 120 h. In the study by Sopalan et al. [71], the enzyme extract with the highest activity (82.22 U/mL) was obtained in 72 h using the endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* X mL-02. Oliveira, Silva and Hirata [72] obtained an enzyme extract rich in lipase (28 U/mL), which was produced using the fungus *Preussia africana* in only 48 h. Rocha et al. [73] obtained the highest lipolytic activity in 96 h using the endophytic fungi *Stemphylium lycopersici* (397 U/mL) and *Sordaria* sp. (286 U/mL). On the other hand, Sena et al. [74] obtained their extract with the highest lipase activity in 144 h using the endophytic fungus *Aspergillus* sp., which is closer in time taken to that obtained using *E. endophytica* QAT_7AC, although it presented lower enzyme activity.

Thus, in order to reduce the cultivation time, there is a need to optimize the production of the fungal enzyme. Factors such as culture temperature and pH of the medium are crucial for lipolytic production [74] and were previously evaluated in the study by Matias et al. [33]. However, other factors should be studied, such as agitation, components of the medium and inoculum concentration, in order to reduce the bioprocess time [33,75].

3.3. Characterization of the Enzyme Extract

The enzymatic extract obtained after 120 h of culture of *E. endophytica* QT_7AC was characterized regarding the temperature and pH ranges in which it presents the highest enzymatic activity. The results obtained are shown in Table 2.

Table 2. Effect of temperature and pH on lipase activity of the enzyme extract produced by the fungus *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC.

Temperature (°C)	EA (U/mL)	pH	EA (U/mL)
35	8611 ^c ± 29	5.5	8840 ^a ± 17
37	8559 ^c ± 10	6.0	8703 ^b ± 10
40	9100 ^a ± 6	7.0	8729 ^b ± 5
45	8445 ^c ± 4	8.0	8618 ^c ± 3
50	8849 ^b ± 5	8.5	8579 ^d ± 4

EA = Enzymatic activity of lipase. Different letters indicate that there is a statistical difference according to the Tukey test ($p < 0.05$). The highest values of enzyme activity are in bold.

The enzyme extract of *E. endophytica* QAT_7AC showed the maximum lipase activity when incubated at 40 °C. Although the enzyme extract showed high activity throughout the evaluated temperature range, there was a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the analyzed temperatures. Therefore, the temperature of 40 °C was considered the optimal temperature for obtaining lipase using *E. endophytica* QAT_7AC. These results are in agreement with the study by Colla et al. [76], for which the temperature between 30 and 40 °C was reported as the optimal range for the activity of lipase produced by *Aspergillus niger*. As for the pH, a significant difference ($p < 0.05$) was also observed between the analyzed samples, and it was determined that pH 5.5 was the best among those evaluated for the performance of the lipase obtained using *E. endophytica* QAT_7AC.

The conditions for the lipase produced by *E. endophytica* QAT_7AC are optimal for the production of biodiesel using enzymatic transesterification, especially when the raw materials have a high acidity index, as in the case of waste cooking oil. The acidity value is a limiting factor for producing biodiesel using the transesterification method in the presence of homogeneous alkaline catalysts (NaOH, KOH), since acid values lower than 0.5 mg NaOH/g prevent the conversion process [77], and the use of lipase for these raw materials may be a promising alternative for the production of the biofuel [78,79].

3.4. Biodiesel Production

The formation of ethyl esters was observed in the samples from the biocatalytic reactions using soybean oil and waste cooking oil as raw materials. The linoleic acid ester (retention time = 19.920 min) was produced in greater quantity, followed by oleic acid ester (retention time = 23.512 min) (Figure 4). Esters of palmitic acid and stearic acid were identified in smaller proportions. The yields obtained were 92% and 89% for the enzymatic transesterification of soybean oil and waste cooking oil, respectively.

The biodiesel yield obtained from the waste cooking oil was comparable to that obtained with the unused soybean oil. This suggests that both the biocatalytic system (lipase from *E. endophytica* QAT_7AC) and the use of the waste cooking oil are viable for obtaining ethyl esters. This finding highlights not only the effectiveness of the process, but also the possibility of contributing to the reuse of resources that have no further use.

The biodiesel yields obtained using the enzymatic extract of the fungus *E. endophytica* QAT_7AC are comparable to those of other studies that used lipase-mediated biocatalytic transesterification reactions [80–85]. Table 3 shows the biodiesel yields obtained via the transesterification of different oily raw materials under different reaction conditions.

3.5. Biodiesel Production—Evaluation of the Parameters Involved in the Reaction

The biocatalytic reaction was evaluated for the ethanol:waste oil ratio, using the commercial lipase for comparison with the fungal biocatalytic system. The chromatograms of Figure 5 demonstrate the production of ethyl esters under all the reaction conditions evaluated. The fatty acid ethyl ester (FAEE) composition of the raw material and of the biodiesel samples produced by enzymatic transesterification using *Candida rugosa* lipase (CRL) and *Endomelanconiopsis endophytica* lipase (EEL), determined using GC-MS, can be found in Table S1.

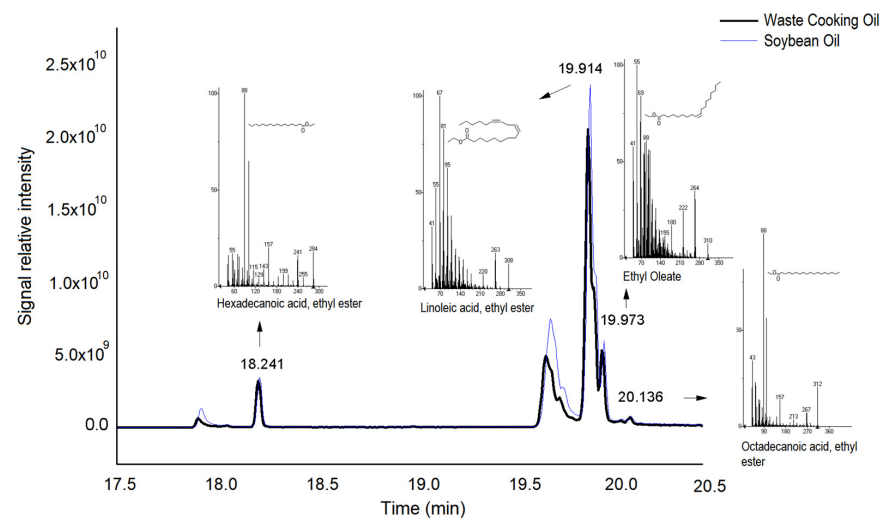


Figure 4. Chromatogram of biodiesel sample produced by enzymatic transesterification of unused soybean oil and waste cooking oil. The reactions were performed for 360 min, with 3% (*w/v*) of the fungal enzyme extract, at 40 °C, with an ethanol:oil ratio of 3:1.

Table 3. Biodiesel yields obtained by biocatalytic transesterification under different reaction conditions.

Raw Material	Reaction Conditions (T; A:O; t; A)	Biocatalyst	Yield (%)	Reference
Soybean oil	37 °C; 1:1; 2 h; EtOH	Lipase from <i>Thermomyces lanuginosus</i>	85.0	Silva [80]
Macauba oil	37 °C; 1:1; 2 h; EtOH	Lipase from <i>Thermomyces lanuginosus</i>	71.0	Silva [80]
Soybean oil	45 °C; 3:1; 6 h; EtOH	Lipase from <i>Rhizomucor miehei</i>	74.0	Aguieras et al. [81]
Macauba oil	40 °C; 2:1; 8 h; EtOH	Lipase from <i>Rhizomucor miehei</i>	91.0	Aguieras et al. [82]
Olive oil	30 °C; 1:1; 3 h; EtOH	<i>Candida</i> Lipase sp.	80.0	Li et al. [83]
Palm oil	50 °C; 4:1; 6 h; EtOH	Commercial lipase Novozyme® 435	87.2	Raita et al. [84]
Soybean oil	34 °C; 3:1; 8 h; MetOH	Lipase from <i>Leonotis nepetifolia</i>	74.5	Vazquez et al. [85]
Waste cooking oil	40 °C; 3:1; 6 h; EtOH	Lipolytic extract of <i>E. endophytica</i>	89.0	This study
Soybean oil	40 °C; 3:1; 6 h; EtOH	Lipolytic extract of <i>E. endophytica</i>	92.0	This study

T = Reaction temperature, A:O = alcohol:oil ratio; t = reaction time; A = alcohol.

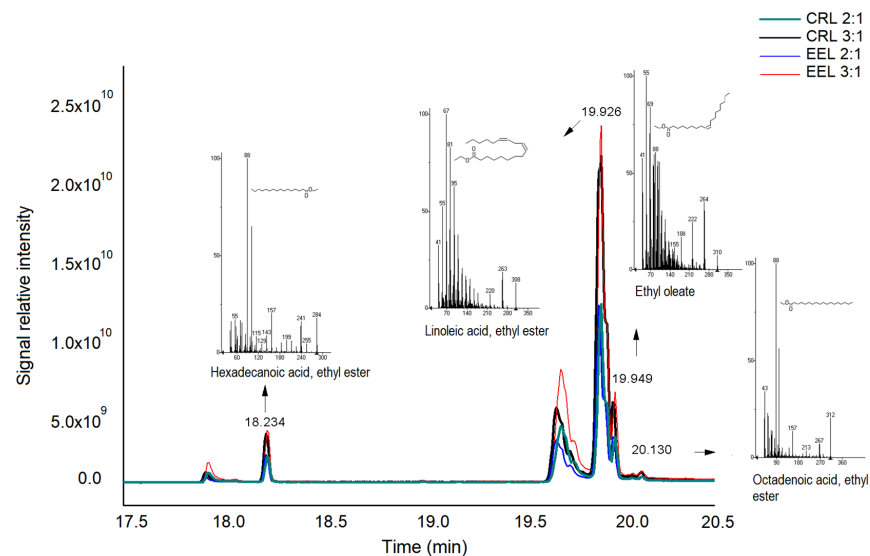


Figure 5. Chromatogram of biodiesel samples obtained in the transesterification reactions of waste cooking oil catalyzed using commercial *Candida rugosa* lipase (CRL) and using the enzymatic extract produced using the fungus *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC (EEL), with ethanol:waste cooking oil ratios of 2:1 and 3:1. The reactions were carried out for 360 min, with 3% (*w/v*) of fungal enzyme extract, at 40 °C.

The biodiesel yields obtained in the transesterification reactions with 2:1 and 3:1 ratios of ethanol:waste cooking oil, using the enzymatic extract and the commercial enzyme, are shown in Figure 6. The enzymatic extract produced by the Amazonian endophytic fungus made it possible to obtain yields comparable to those obtained with the commercial lipase of *Candida rugosa*, an enzyme that underwent a purification process. It is also noted that the increase in the proportion of ethanol in relation to the residue promoted the increase in biodiesel yield. According to Cavalcante et al. [86], regarding the production of biodiesel, it is necessary to use between three and six times the amount of alcohol to that of soybean oil in order to guarantee the conversion to product in the transesterification reaction.

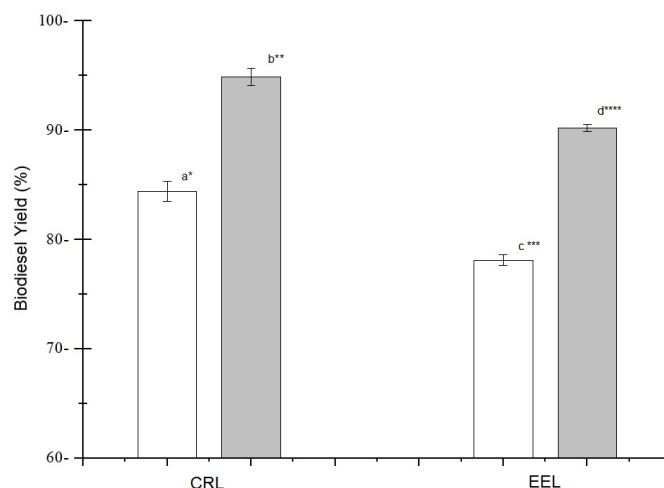


Figure 6. Biodiesel yield obtained from the transesterification of the waste cooking oil catalyzed using the commercial enzyme (*Candida rugosa* lipase—CRL) and using the enzymatic extract produced by the endophytic fungus *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC (EEL), with an ethanol:waste cooking oil ratio of (□) 2:1 and (■) 3:1. The reaction was carried out for 360 min at 40 °C. Experiments that do not share the same letter and symbol (*) are significantly different according to the Tukey test ($p < 0.05$).

The biodiesel yields obtained in the present study are comparable to those of other studies that used lipase-mediated biocatalytic transesterification reactions. Table 4 shows the biodiesel yields obtained for the transesterification of the waste cooking oil under different reaction conditions.

Table 4. Biodiesel yields obtained by biocatalytic transesterification of the waste cooking oil under different reaction conditions.

Reaction Conditions (T; A:O; t; A)	Biocatalyst	Yield (%)	Reference
40 °C; 4:1; 30 h; MetOH	Lipase B from <i>Candida antarctica</i> immobilized	96.0	Parandi et al. [54]
40 °C; 4:1; 4 h; MetOH	Lipase from <i>Geotrichum</i> sp.	85.0	Yan et al. [87]
42.5 °C; 4:1; 36 h; MetOH	Lipase from <i>Pseudomonas cepacia</i> immobilized	76.3	Kuan et al. [88]
40 °C; 10:1; 32 h; EtOH	Lipase from <i>Candida rugosa</i> immobilized	85.7	Abdulla et al. [89]
50 °C; 6:1; 4 h; MetOH	Commercial lipase Novozyme® 435	72.0	Taher et al. [90]
40 °C; 6:1; 9 h; MetOH	Lipase from <i>Candida</i> sp.	80.0	Gong et al. [91]
40 °C; 3:1; 6 h; EtOH	Lipolytic extract of <i>E. endophytica</i>	90.0	This study

T = Reaction temperature, A:O = alcohol:oil ratio; t = reaction time; A = alcohol.

When compared with the results obtained by other authors, the yield values observed here are promising, since 90% was obtained using the fungal enzyme extract, a result which is similar to that achieved in studies that used purified enzymes for the biocatalytic reaction [54,82,88,89].

According to Geris et al. [92], for a stoichiometrically complete transesterification, a molar ratio of 3:1 alcohol:triacylglyceride is required. However, due to the reversible character of the reaction, the transesterifying agent (alcohol) is usually added in excess in these reactions, thus contributing to increasing the yield of the ester, as well as allowing its separation from the glycerol formed. However, excess alcohol can impair enzymatic activity, as it can destabilize the enzyme structure, compromising its three-dimensional conformation and, consequently, its catalytic function [92]. In addition, alcohol can act as a non-competitive inhibitor of the enzyme; in other words, it binds to sites other than the active site of the enzyme, interfering with its ability to bind to the substrate and carry out catalysis. These unwanted interactions between alcohol and the enzyme can result in a significant reduction of enzymatic activity [93,94]. Therefore, it is essential to avoid excess alcohol in the biocatalytic reaction in order to preserve the correct structure and functioning of the enzyme, thus ensuring efficiency in the transesterification process [95].

Considering the promising performance of the fungal biocatalyst system in the production of biodiesel from the transesterification of waste cooking oil, via an experimental design, we evaluated the influence of the parameters that affect the yield of the reaction: reaction time, alcohol type and alcohol:waste oil ratio. The results obtained in each assay are shown in Table 5.

Table 5. Biodiesel yields obtained from the transesterification of the waste cooking oil catalyzed using the enzymatic extract produced by the endophytic fungus *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC under different reaction conditions.

Assay	Parameters *			Yield (%)
	Time (min)	Alcohol:Waste Cooking Oil	Alcohol	
1	120 (−1)	3:1 (−1)	Methanol (−1)	86.50 ^b ± 0.19
2	360 (+1)	3:1 (−1)	Methanol (−1)	89.57 ^a ± 0.60
3	120 (−1)	4:1 (+1)	Methanol (−1)	83.83 ^c ± 0.55
4	360 (+1)	4:1 (+1)	Methanol (−1)	81.43 ^d ± 0.49
5	120 (−1)	3:1 (−1)	Ethanol (+1)	85.15 ^{b,c} ± 0.95
6	360 (+1)	3:1 (−1)	Ethanol (+1)	89.29 ^a ± 0.22
7	120 (−1)	4:1 (+1)	Ethanol (+1)	89.19 ^a ± 0.53
8	360 (+1)	4:1 (+1)	Ethanol (+1)	89.50 ^a ± 0.60

* Demonstrated as real variables and codified variables of the 2³ experimental design. Experiments that do not share the same letter are significantly different according to the Tukey test ($p < 0.05$).

The biodiesel yields varied between 81.43% and 89.53%, which confirms the satisfactory performance of the fungal biocatalytic system used in the transesterification reactions. When analyzing Table 5, it is observed that there is no significant difference between experiments 2, 6, 7 and 8 in terms of yield. Of these, only experiment 2 was performed with methanol. Methanol is widely employed as a solvent and reagent in the production of biodiesel using enzymatic transesterification. Its high reactivity allows the rapid conversion of triglycerides into methyl esters, resulting in an efficient and fast execution process [96,97]. In a study conducted by Muanruksa and Kaewkannetra [48], the authors obtained a yield of 91.3% of biodiesel using the ratio of 3:1 methanol:sludge palm oil at 40 °C in just 4 h of reaction using a commercial lipase.

The variables studied via the experimental design had a significant influence ($p < 0.05$) on biodiesel yield, with the reaction time being the independent factor with the greatest effect (Figure 7). In other words, the longer reaction times were favorable for obtaining higher biodiesel yields. These results corroborate the conclusions of the study conducted by Bessa et al. [98]. However, when using an ethanol ratio of 4:1, both in a reaction time of 120 and 360 min, equivalent yields were obtained. These results indicate, therefore, that the increase in reaction time is not necessary for the biocatalytic system employed.

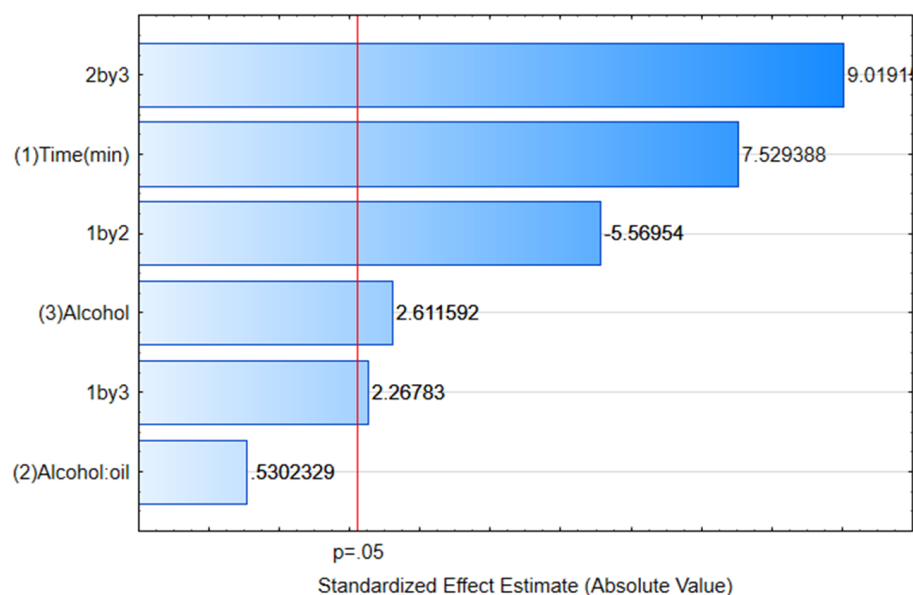


Figure 7. Pareto plot for biodiesel yield obtained from transesterification of waste cooking oil catalyzed by the enzyme extract produced by the endophytic fungus *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC.

The reaction time is an important variable that should be evaluated in order to ensure the conversion of triglycerides into methyl or ethyl esters. An insufficient reaction time can lead to a low conversion of esters, while a prolonged reaction time can lead to the formation of unwanted byproducts, which can reduce the quality of the biodiesel produced [87]. Parandi et al. [54] used methanol in the production of biodiesel and evaluated the reaction time (between 12 and 36 h), with the highest yield occurring after 30 h (1800 min).

The type of alcohol also significantly ($p < 0.05$) influenced the biodiesel yield, and ethanol is preferable to methanol. The use of the ethyl route to replace the use of methanol in biodiesel production is important, because ethyl esters have several advantages over methyl esters, such as their higher cetane number, higher oxidative stability, lower iodine number and better lubrication properties; in addition, the ethyl route produces 100% renewable biodiesel and gives a better energy balance because it is a fuel synthesized from biomass fermentation, in addition to having the advantages of non-toxicity and biodegradability [99].

The proportion of alcohol, i.e., the amount of methanol or ethanol used in relation to the waste cooking oil, is also an important factor to be considered in the production of biodiesel. However, this factor, individually, did not present statistical significance (Figure 7). On the other hand, the interactions between the studied variables showed a significant effect, and their behavior can be visualized in the response surface graphs (Figure 8).

The interaction between the alcohol:waste cooking oil ratio and the type of alcohol has the greatest influence on biodiesel yield (Figure 8a). The correct proportion of the alcohol to be used can ensure the high efficiency of the reaction and minimize the formation of unwanted by-products. However, it is important to evaluate the influence of the alcohol ratio under these different experimental conditions. For methanol, in higher proportions, it is possible to observe a decrease in biodiesel yield, a result that corroborates those obtained by Rosset et al. [51]. This behavior can be attributed to an inhibitory effect of methanol on lipase, accelerating the denaturation of the enzyme and, consequently, impairing the yield of the process. Ren, Li and Liu [93] demonstrated that the ethanol:oil ratio for biodiesel conversion using lipase as biocatalyser can be increased to 4:5.

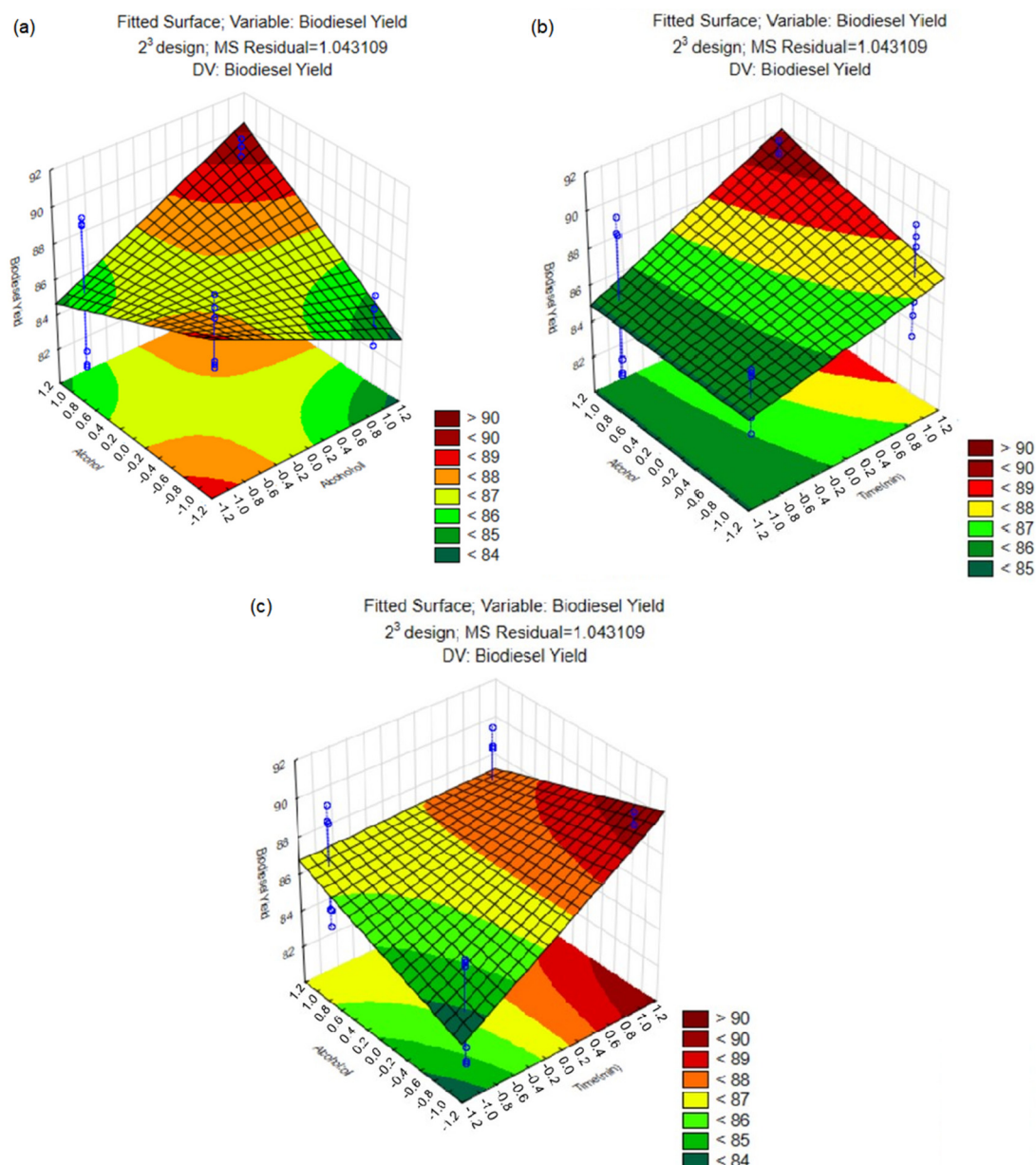


Figure 8. Response surface graphs for biodiesel yield as a function of: (a) alcohol:waste oil ratio and alcohol type; (b) reaction time and alcohol type; and (c) reaction time and alcohol:waste oil ratio. Blue circles indicate the tested conditions.

In addition, when comparing the results obtained in this study with other methodologies that used cooking oil residue for biodiesel production, similar or higher yields are observed. For example, Corral-Bobadilha et al. [21] achieved a maximum yield of 92.7% using alkaline catalysis. Lin et al. [7] and Peng et al. [16] obtained maximum yields of 87.3% and 87.8%, respectively, when adopting CaO as a catalyst in a microwave heating system. Additionally, Banchapattanasakda et al. [100] achieved a maximum yield of 81.7% with direct pyrolysis and 83.5% when using activated carbon as a catalyst. These results reinforce the effectiveness of the biocatalysis methodology used in this study and demonstrate that it provides yields comparable to those obtained with classical methodologies.

From the statistical analysis, it was possible to observe that, in this study, the use of ethanol resulted in a significant increase in biodiesel yield (Figure 7). The multivariate function that describes the biodiesel yield for the transesterification of the waste oil

with ethanol, considering the reaction time and the alcohol:waste oil ratio is presented in Equation (3) ($R^2 = 0.98167$).

$$Y = 42.93 + 0.12x_1 + 11.52x_2 - 0.03x_1x_2 \quad (3)$$

Y = biodiesel yield (%).

X_1 = time in minutes (ranging from 120 to 360 min).

X_2 = number of moles of alcohol in the alcohol:waste oil ratio (ranging between 3 and 4 moles).

Anwar et al. [101] conducted a study on the production of biodiesel from *Carica papaya* oil and investigated the relationship between the percentage of biodiesel in blends, the load and the engine speed. The authors developed a multivariate function that provided important answers in engine tests. Thus, the multivariate function developed in this study represents a useful tool to predict the performance of the transesterification process. By simultaneously considering the reaction time and the alcohol:waste oil ratio, the model allows us to understand the complex interactions between these variables and their impact on the final result. The reaction time is a critical factor that influences the formation of ethyl esters, while the ratio between alcohol and residual oil has a fundamental role in determining the amount of biodiesel produced and in the enzymatic performance. By synthesizing these elements into a conjoint function, researchers and engineers can more accurately predict the yield of the transesterification process under different experimental conditions.

The results obtained via the experimental design highlight the importance of this step in the evaluation of the efficiency of biodiesel production and in determining the optimal reaction conditions to ensure higher yields of the biofuel. In addition, the results indicate that the use of ethanol for biodiesel production is more appropriate, which is an advantage when considering the environmental benefits associated with the choice of ethanol, and it contributes to the reduction of the dependence on fossil fuels and the reduction of greenhouse gas emissions, thus strengthening the sustainability of the biodiesel production process. Therefore, the results show not only the efficiency of biodiesel production using the enzyme produced by the endophytic fungus but also the possibility of achieving a sustainable process.

4. Conclusions

The Amazonian endophytic fungus *E. endophytica* is a promising source of lipase, an enzyme of great interest for industrial applications. The lipolytic extract derived from this fungus was used as a biocatalyst, enabling the use of waste cooking oil as raw material in the production of biodiesel, with yields between 81.43 and 90.00%. The study also revealed the identification of important parameters to be considered in biodiesel production, such as reaction time and the alcohol:waste oil ratio. In addition, it was found that the use of ethanol presented advantages when compared to methanol, highlighting the potential of the investigated biocatalytic system for a sustainable production of biodiesel.

These findings underline the potential of the biocatalytic system studied for enabling sustainable biodiesel production, since the biocatalysis methodology used in this study demonstrated the achievement of yields comparable to those obtained with classical methodologies. However, it is critical to recognize that this process still faces challenges and limitations that require additional considerations. Some of these obstacles include the continuous need for process optimization, covering variables such as temperature, reactant concentration and reaction time, in order to achieve higher yields in shorter reaction times. In addition, variability in the composition and quality of the waste cooking oil can impact the efficiency of transesterification, thus requiring a detailed analysis on how this variability affects the process. Considerations related to the cost and availability of the lipolytic enzyme produced by the fungus *E. endophytica* should also be weighed, given that large-scale production may be costly and logistically challenging.

In summary, while the results of this study are promising and represent an innovative approach to sustainable biodiesel production, it is imperative to recognize that significant

challenges and limitations persist. Continuous progress and dedicated research are crucial in order to overcome these barriers and maximize the benefits of this method. Thus, this work not only contributes to the advancement of the biodiesel industry by offering a more effective and ecologically conscious solution but also emphasizes the importance of continuing to investigate new approaches to the production of sustainable energy.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/en16196937/s1>, Table S1: Fatty acid ethyl ester (FAEE) composition of raw material and of biodiesel samples produced by enzymatic transesterification using *Candida rugosa* lipase (CRL) and *Endomelanconopsis endophytica* lipase (EEL), determined using GC-MS.

Author Contributions: Conceptualization, P.M.A., J.G.C.R. and S.D.J.; investigation, J.G.C.R., F.V.C., C.C.d.S. and R.R.M.; methodology, J.G.C.R., P.M.A. and S.D.J.; formal analysis, P.M.A., N.T.M. and S.D.J.; data curation, J.G.C.R.; validation, J.G.C.R.; writing—original draft preparation, J.G.C.R.; writing—review and editing, P.M.A., N.T.M.; project administration, P.M.A. and S.D.J.; resources: P.M.A. and S.D.J.; funding acquisition, P.M.A. and S.D.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (grant number 01.02.016301.00568/2021-05 and 062.00165/2020), by POSGRAD/FAPEAM 2022 and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (finance code 001 and grant number 88881.510151/2020-01—PDGP Amazônia Legal). The article processing charge was funded by Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge Universidade do Estado do Amazonas—UEA, FAPEAM and CAPES for supporting this research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Aransiola, E.F.; Ojumu, T.V.; Oyekola, O.O.; Madzimbamuto, T.F.; Ikhu-Omogbe, D.I.O. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. *Biomass Bioenergy* **2014**, *61*, 276–297. [CrossRef]
2. Tiong, A.N.T.; Khan, Z.; Chin, Z.; Wahid, O.A.; Wachira, R.M.; Kung, S.M. Plant design of biodiesel production from waste cooking oil in Malaysia. *Biofuels* **2023**, *14*, 353–364. [CrossRef]
3. Carpio, L.G.T. Transmission of variations in the biodiesel mandate for Brazilian biodiesel market. *Biofuels* **2023**, *14*, 373–386. [CrossRef]
4. Grand View Research: Biodiesel Market Size, Share & Trends Analysis Report by Feedstock (Vegetable Oils, Animal Fats), By Application (Fuel, Power Generation), by Region (Europe, APAC), and Segment Forecasts, 2022–2030. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biodiesel-market> (accessed on 4 May 2023).
5. Naylor, R.L.; Higgins, M.M. The rise in global biodiesel production: Implications for food security. *Glob. Food Secur.* **2018**, *16*, 75–84. [CrossRef]
6. Ávila, M.T.; Gazzoni, D.L. Biocombustível: Embrapa—Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Soja. 8 December 2021. Available online: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pos-producao/agroenergia/biocombustiveis> (accessed on 3 May 2022).
7. Lin, Y.; Amesho, K.T.T.; Chen, C.; Cheng, P.; Chou, F. A cleaner process for green biodiesel synthesis from waste cooking oil using recycled waste oyster shells as a sustainable base heterogeneous catalyst under the microwave heating system. *Sustain. Chem. Pharm.* **2020**, *17*, 100310. [CrossRef]
8. Sahar, S.S.; Iqbal, J.; Ullah, I.; Bhatti, H.N.; Nouren, S.; Rehman, H.; Nisar, J.; Iqbal, M. Biodiesel production from waste cooking oil: An efficient Technique to convert waste into biodiesel. *Sustain. Cities Soc.* **2018**, *41*, 220–226. [CrossRef]
9. Tambor, J.H.M.; Cwejgorn, F.V.; Santos, A.G.; Lopes, G.C.; Lescano, V.P. Biodiesel production from the used kitchen oil: A sustainable alternative. *Rev. Caleidosc.* **2019**, *11*, 545–548.
10. Sarno, B.; Iuliano, M. Biodiesel production from waste cooking oil. *Green Process. Synth.* **2019**, *8*, 828–836. [CrossRef]
11. Thilakarathne, D.; Miyuranga, K.A.V.; Arachchige, U.S.P.R.; Weerasekara, N.A.; Jayasinghe, R.A. Production of biodiesel from Waste Cooking Oil Laboratory Scale: A Review. *Int. J. Sci. Eng. Sci.* **2021**, *5*, 28–34.
12. Fonseca, J.M.; Taleken, J.G.; Almeida, V.C.; Silva, C. Biodiesel from waste frying oils: Methods of production and purification. *Energy Convers. Manag.* **2019**, *184*, 205–218. [CrossRef]

13. Kasirajan, R. Biodiesel production by two step process from an energy source of Chrysophyllum albidum oil using homogeneous catalyst. *S. Afr. J. Chem. Eng.* **2021**, *37*, 161–166. [\[CrossRef\]](#)
14. Chen, H.X.; Xia, W.; Wang, S. Biodiesel production from waste cooking oil using a waste diaper derived heterogeneous magnetic catalyst. *Braz. J. Chem. Eng.* **2022**, *40*, 511–520. [\[CrossRef\]](#)
15. Khan, H.M.; Iqbal, T.; Ali, C.H.; Yasin, S.; Jamil, F. Waste quail beaks as renewable source for synthesizing novel catalysts for biodiesel production. *Renew. Energy* **2020**, *154*, 1035–1043. [\[CrossRef\]](#)
16. Peng, Y.-P.; Amesho, K.T.T.; Chen, C.-E.; Jhang, S.-R.; Chou, F.-C.; Lin, Y.-C. Optimization of Biodiesel Production from Waste Cooking Oil Using Waste Eggshell as a Base Catalyst under a Microwave Heating System. *Catalysts* **2018**, *8*, 81. [\[CrossRef\]](#)
17. Ferrusca, M.C.; Romero, r.; Martínez, S.L.; Remírez-Serrano, A.; Natividade, R. Biodiesel production from waste cooking oil: A perspective on catalytic processes. *Processes* **2023**, *11*, 1952. [\[CrossRef\]](#)
18. Husain, I.A.; Alkhatib, M.F.; Jammi, M.S.; Mirghani, M.E.; Bin Zainudin, Z.; Hoda, A. Problems, control and treatment of fat, oil and grease (FOG): A review. *J. Oleo Sci.* **2014**, *36*, 747–752. [\[CrossRef\]](#)
19. Gaur, A.; Mishra, S.; Chowdhury, S.; Baredar, P.; Verma, P. A review on factor affecting biodiesel production from waste cooking oil: An Indian perspective. *Mater. Today Proc.* **2021**, *46*, 5594–5600. [\[CrossRef\]](#)
20. Al-Muhtaseb, A.H.; Osman, A.I.; Murphin Kumar, P.S.; Jamil, F.; Al-Haj, L.; Al Nabhani, A.; Kyaw, H.H.; Myint, M.T.Z.; Mehta, N.; Rooney, D.W. Circular economy approach of enhanced bifunctional catalytic system of CaO/CeO₂ for biodiesel production from waste loquat seed oil with life cycle assessment study. *Energy Convers. Manag.* **2021**, *236*, 114040. [\[CrossRef\]](#)
21. Corral-Bobadilla, M.; Lostado-Lorza, R.; Somovilla-Gómez, F.; Íñiguez-Macedo, S. Life cycle assessment multi-objective optimization for eco-efficient biodiesel production using waste cooking oil. *J. Clean. Prod.* **2022**, *359*, 132113. [\[CrossRef\]](#)
22. Claeys, C. Used Cooking Oil (UCO) feedstock now accounts for one-fifth of all european biofuels. In Proceedings of the ACI Oleofuels Conference, Marseille, France, 18–19 May 2022.
23. Mandari, V.; Devarai, S.K. Biodiesel production using homogeneous, heterogeneous, and enzyme catalysts via transesterification and esterification reactions: A critical review. *Bioenergy Res.* **2021**, *15*, 935–961. [\[CrossRef\]](#)
24. Avhad, M.R.; Marchetti, J.M. Uses of Enzymes for Biodiesel Production. In *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts*; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2019; pp. 135–152. [\[CrossRef\]](#)
25. Ramos, L.P.; Kothe, V.; Aparecida, M.; Muniz-Wypych, A.S.; Nakagaki, S.; Krieger, N.; Wypych, F.; Cordeira, C. Biodiesel: Raw materials, production technologies and fuel properties. *Rev. Virtual Quím.* **2017**, *9*, 317–369. [\[CrossRef\]](#)
26. Norjannah, B.; Ong, H.C.; Masjuki, H.H.; Juan, J.C.; Chong, W.T. Enzymatic transesterification for biodiesel production: A comprehensive review. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 60034–60055. [\[CrossRef\]](#)
27. Oliveira, N.M.L.; Vieira-Almeida, E.C.; Silva, L.P.; Paula, C.B.C.; Bastos, A.C.M.; Santos, I.L.; Paula-Elias, F.C.; Almeida, A.F. Processos Químicos e Biotecnológicos—Lipases microbianas. In *Bioprocessos e Aplicações Industriais*, 1st ed.; Andrade, D.F., Souza, A.A., Andrade, D.E., Oliveira, E.J., Santos, F., Lopes, J.E.F., Neves, O.F., Lima, L.C., Ferreira Filho, N., Oliveira, V.A., Eds.; Poisson: Belo Horizonte, Brazil, 2020; Volume 5, pp. 2–45. [\[CrossRef\]](#)
28. Marotti, B.S.; Cortez, D.V.; Gonçalves, D.B.; Castro, H.F. Screening of species from the genus *Penicillium* producing cell bound lipases to be applied in the vegetable oil hydrolysis. *Quím. Nova* **2017**, *40*, 427–430. [\[CrossRef\]](#)
29. Chandra, P.; Enespa, S.R.; Arora, P.K. Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microb. Cell Fact.* **2020**, *9*, 169. [\[CrossRef\]](#)
30. Zambare, V.; Patankar, R.; Bhusare, B.; Christopher, L. Recent advances in feedstock and lipase research and development towards commercialization of enzymatic biodiesel. *Processes* **2021**, *9*, 1743. [\[CrossRef\]](#)
31. Martínez-Klimova, E.; Rodríguez-Peña, K.; Sánchez, S. Endophytes as sources of antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *134*, 1–17. [\[CrossRef\]](#)
32. Matias, R.R.; Sepúlveda, A.M.G.; Batista, B.N.; Lucena, J.M.V.M.; Albuquerque, P.M. Degradation of *Staphylococcus aureus* biofilm using hydrolytic enzymes produced by amazonian endophytic fungi. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2021**, *193*, 2145–2161. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Matias, R.R.; Rodrigues, J.G.C.; Procópio, R.E.L.; Matte, C.R.; Duvoisin Junior, S.; Soares, R.M.D.; Albuquerque, P.M. Lipase production from *Aniba canelilla* endophytic fungi, characterization, and application of the enzymatic extract. *Res. Soc. Dev.* **2022**, *11*, e180111234326. [\[CrossRef\]](#)
34. Batista, B.N.; Matias, R.R.; Oliveira, R.L.; Albuquerque, P.M. Hydrolytic enzyme production from açai palm (*Euterpe precatoria*) endophytic fungi and characterization of the amylolytic and cellulolytic extracts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *38*, 30–45. [\[CrossRef\]](#)
35. Rana, Q.U.A.; Irfan, M.; Ahmed, S.; Hasan, F.; Shah, A.A.; Khan, S.; Rehman, F.U.; Khan, H.; Ju, M.; Li, W.; et al. Bio-catalytic transesterification of mustard oil for biodiesel production. *Biofuels* **2019**, *13*, 69–76. [\[CrossRef\]](#)
36. AOCS: American Oil Chemists' Society. A.O.C.S. Official Method Cc 10a-25. In *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, 4th ed.; AOCS: Champaign, IL, USA, 1990.
37. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*; Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, Brazil, 2008.
38. AOCS: American Oil Chemists' Society. AOCS Official Method Cd 8-53. In *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, 4th ed.; AOCS: Champaign, IL, USA, 1990.
39. AOCS: American Oil Chemists' Society. A.O.C.S. Official Method Cd 3-25. In *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, 4th ed.; AOCS: Champaign, IL, USA, 1990.

40. Gurgel, R.S.; Rodrigues, J.G.C.; Matias, R.R.; Batista, B.N.; Oliveira, R.L.; Albuquerque, P.M. Biological activity and production of metabolites from Amazon endophytic fungi. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2020**, *14*, 85–93. [\[CrossRef\]](#)
41. Winkler, U.K.; Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **1979**, *138*, 663–670. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Tombini, J. Selection of Lipolytic Microorganisms and Lipase Production from Soy Processing by Products. Master's Thesis, Federal Technological University of Paraná, Pato Branco, Brazil, 29 May 2015.
43. Dantas, A. Imobilização e Caracterização da Lipase Ns-40116 em Poliestireno. Master's Thesis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 24 February 2017.
44. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248. [\[CrossRef\]](#)
45. Cruz Junior, A. Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Mamona. Master's Thesis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 18 July 2007.
46. Marder, F.; Celin, M.M.; Mazuim, M.S.; Schneider, R.C.S.; Macgagan, M.T.; Carbellini, V.A. Produção de biodiesel por biocatálise utilizando método alternativo de imobilização da lipase em hidrogel. *Tecno-Lógica* **2008**, *12*, 56–64.
47. Parawira, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2009**, *29*, 82–93. [\[CrossRef\]](#)
48. Muanruksa, P.; Kaewkannetra, P. Combination of fatty acids extraction and enzymatic esterification for biodiesel production using sludge palm oil as a low-cost substrate. *Renew. Energy* **2020**, *146*, 901–906. [\[CrossRef\]](#)
49. Burmana, A.D.; Tambun, R.; Haarynato, B.; Alexander, V. Effect of reaction time on biodiesel production from palm fatty acid distillate by, using PTSA as a catalyst. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2020**, *1003*, 12134. [\[CrossRef\]](#)
50. Pedro, K.C.N.R.; Parreira, J.M.; Correia, I.N.; Henriques, C.A.; Langone, M.A.P. Enzymatic biodiesel synthesis from acid oil using a lipase mixture. *Quim. Nova* **2018**, *41*, 284–291. [\[CrossRef\]](#)
51. Rosset, D.V.; Wancura, J.H.C.; Mazutti, M.A.; Jahn, S.L. Produção de biodiesel catalisada por lipases solúveis: Influência do excesso de metanol e da concentração de água na reação. In Proceedings of the Anais do XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, São Carlos, Brazil, 16–19 July 2017.
52. Aquino, I.P. Evaluation of Biodiesel Corrosiveness by Gravimetric and Eletrochemical Techniques. Doctoral Thesis, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil, 20 March 2012.
53. Naser, J.; Avbenake, O.P.; Dabai, F.N.; Jibril, B.Y. Regeneration os spent bleaching earth and conversion of recovered oil to biodiesel. *Waste Manag.* **2021**, *126*, 258–265. [\[CrossRef\]](#)
54. Parandi, E.; Safaripour, M.; Abdellatif, M.H.; Saidi, M.; Bozorgian, A.; Nodeh, H.R.; Rezanian, S. Biodiesel production from waste cooking oil using a novel biocatalyst of lipase enzyme immobilized magnetic nanocomposite. *Fuel* **2022**, *313*, 123057. [\[CrossRef\]](#)
55. Jamil, N.; Zairi, M.N.M.; Nasim, N.A.M.; Pa'ee, F. Influences of Enviromental Conditions to Phytoconstituents in *Clitoria ternatea* (Butterfly Pea Flower)—A review. *J. Sci. Technol.* **2018**, *10*, 208–228. [\[CrossRef\]](#)
56. Castro, S.V.F.; Silva, C.V.; Previdi, D.; Portela, F.M.; Gomes, M.F. Caracterização Estrututal e físico-química de biodiesel produzido a partir de óleo residual do refeitório do IF Goiano—Campus Urutaí. *Multi-Sci. J.* **2018**, *1*, 47–53. [\[CrossRef\]](#)
57. Aworanti, O.A.; Ajani, A.O.; Agarry, S.E. Process parameter estimation of biodiesel production from waste frying oil (vegetable and palm oil) using homogeneous catalyst. *J. Food Process. Technol.* **2019**, *10*, 811. [\[CrossRef\]](#)
58. Al-Saadi, A.; Mathan, B.; He, Y. Biodiesel production via simultaneous transesterification and esterification reactions over SrO–ZnO/Al₂O₃ as a bifunctional catalyst using high acidic waste cooking oil. *Chem. Eng. Res. Des.* **2020**, *162*, 238–248. [\[CrossRef\]](#)
59. Farooq, M.; Ramli, A.; Naeem, A. Biodiesel production from low FFA waste cooking oil using geterogeneous catalyst derived from chicken bones. *Renew. Energy* **2015**, *76*, 362–368. [\[CrossRef\]](#)
60. Siqueira, A.F.; Vidigal, I.G.; Melo, M.P.; Giordani, D.S.; Batista, P.S.; Ferreira, A.L.G. assessing waste cooking oils for the production of quality biodiesel using na eletronic nose and a stochastic model. *Energy Fuels* **2019**, *33*, 3221–3226. [\[CrossRef\]](#)
61. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n° 270, de 22 de Setembro de 2005. 2005. Available online: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> (accessed on 12 December 2021).
62. Plata, V.; Ferreira-Beltrán, D.; Gauthier-Maradei, P. Effect of cooking conditions on selected properties of biodiesel produced from Palm-Based waste cooking oil. *Energies* **2022**, *15*, 908. [\[CrossRef\]](#)
63. Moraes, V.S.; Castro, E.V.R.; Carneiro, M.T.W.D.; Brandão, G.P.; Fabri Junior, R.; Sena, D.R. ASTM color: A simple and fast method for determining quality of biodiesel produced from used cooking oils. *Quim. Nova* **2013**, *36*, 587–592. [\[CrossRef\]](#)
64. Lee, J.H.; Lee, J.H.; Kim, D.S.; Yoo, H.Y.; Park, C.; Kim, S.W. Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbon. *Bioresour. Technol. Rep.* **2019**, *7*, 100248. [\[CrossRef\]](#)
65. Binhayeedung, N.; Lomkiao, S.; Prasertsan, P.; Sangkharak, K. Improvement of biodiesel production using waste cooking oil and applying single and mixed immobilized lipases on polyhydroxyalkanoate. *Renew. Energy* **2020**, *162*, 1819–1827. [\[CrossRef\]](#)
66. Rovere, B.O.; Rodrigues, J.H.; Teleken, J.G. Reduction of the acidity index through neutralization and esterification for biodiesel production. *Braz. J. Dev.* **2020**, *6*, 24678–24686. [\[CrossRef\]](#)
67. Abu, M.L.; Nooh, H.M.; Oslan, S.N.; Salleh, A.B. Optimization of physical conditions for the production of thermostable T1 lipase in *Pichia guilliermondii* strain SO using response surface methodology. *BMC Biotechnol.* **2017**, *17*, 78–87. [\[CrossRef\]](#)

68. Dutta, B.; Shamekh, S.; Deska, J.; Bandopadhyay, R. Statistical optimization of media components for production of extracellular lipase from edible mushroom *Cantharellus cibarius*. *Biol. Futur.* **2022**, *73*, 315–325. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Behera, A.R.; Veluppai, A.; Dutta, K. Optimization of physical parameters for enhanced production of lipase from *Staphylococcus hominis* using response surface methodology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *26*, 34277–34284. [\[CrossRef\]](#)
70. Carvalho Neto, F.G.M.R. Isolamento e Clonagem do Gene que Codifica a Lipase do Fungo *Endomelanconiosis Endophytica*. Master's Thesis, Amazonas State University, Manaus, Brazil, 25 October 2013.
71. Sopalun, K.; Laosripaiboon, W.; Wachirachaiarn, A.; Iamtham, S. Biological potential and chemical composition of bioactive compounds from endophytic fungi associated with thai mangrove plants. *S. Afr. J. Bot.* **2021**, *141*, 66–76. [\[CrossRef\]](#)
72. Oliveira, G.F.; Silva, M.R.L.; Hirata, D.B. Production of new lipase from *Preussia africana* and a partial characterization. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2021**, *52*, 942–949. [\[CrossRef\]](#)
73. Rocha, K.S.C.; Queiroz, M.S.R.; Gomes, B.S.; Dallago, R.; Souza, R.O.M.A.; Guimarães, D.O.; Itabaiana, I., Jr.; Leal, I.C.R. Lipases of Endophytic Fungi *Stemphylium lycopersici* and *Sordaria* sp.: Application in the synthesis of solketal derived monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* **2020**, *142*, 109664. [\[CrossRef\]](#)
74. Sena, I.S.; Ferreira, A.M.; Marinho, V.H.; Holanda, F.H.; Borges, S.F.; Souza, A.A.; Koga, R.C.R.; Lima, A.L.; Florentino, A.C.; Ferreira, I.M. *Euterpe oleracea* Mart (Açaizeiro) from the Brazilian Amazon: A Novel Font of Fungi for Lipase Production. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2394. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Szymczak, T.; Cybulska, J.; Podlesny, M.; Frac, M. Various Perspectives on Microbial Lipase Production Using Agri-Food Waste and Renewable Products. *Agriculture* **2021**, *11*, 540. [\[CrossRef\]](#)
76. Colla, L.M.; Ficanha, A.M.M.; Rizzardi, J.; Bertolin, T.E.; Reinehr, C.O.; Costa, J.A.V. Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 725959. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Hsiao, M.C.; Liao, P.H.; Lan, N.V.; Hou, S.S. Enhancement of biodiesel production from high-acid-value waste cooking oil via a microwave reactor using a homogeneous alkaline catalyst. *Energies* **2021**, *14*, 437. [\[CrossRef\]](#)
78. Talukder, M.M.R.; Wu, J.C.; Fen, N.M.; Melissa, Y.L.S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *49*, 207–212. [\[CrossRef\]](#)
79. Lampi, A.M.; Yang, Z.; Mustonen, O.; Piironen, V. Potential of faba bean lipase and lipoxygenase to promote formation of volatile lipid oxidation products in food models. *Food Chem.* **2020**, *311*, 125982. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Silva, F.A. Estudo da Produção de Biodiesel Utilizando Etanol e Óleo de Soja ou De macaúba, Catalisada por Lipase de *Mamona* e de *Thermomyces lanuginosus*. Master's Thesis, São Carlos Federal University, São Carlos, Brazil, 25 February 2015.
81. Aguiéiras, E.C.G.; Barros, D.S.N.; Sousa, H.; Fernandez-Lafuente, R.; Freire, D.M.G. Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from *Rhizomucor miehei* grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions. *Renew. Energy* **2017**, *113*, 112–118. [\[CrossRef\]](#)
82. Aguiéiras, E.C.G.; Oliveira, E.D.C.; Castro, A.M.; Langone, M.A.P.; Freire, D.M.G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel* **2014**, *135*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
83. Li, W.; Chen, B.; Tan, T. Esterification synthesis of ethyl oleate in solvent-free system catalyzed by lipase mebrane from fermentation broth. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *163*, 102–111. [\[CrossRef\]](#)
84. Raita, M.; Laathanachareon, T.; Champreda, V.; Laosiripojana, N. Biocatalytic esterification of palm oil fatty acids for biodiesel production using glycine-based cross-linked protein coated microcrystalline lipase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *73*, 74–79. [\[CrossRef\]](#)
85. Ávila Vázquez, V.; Aguilera Flores, M.M.; Hernández Casas, L.F.; Medellín Castillo, N.A.; Rocha Uribe, A.; Correa Aguado, H.C. Biodiesel production catalyzed by lipase extract powder of *Leonotis nepetifolia* (Christmas Candlestick) seed. *Energies* **2023**, *16*, 2848. [\[CrossRef\]](#)
86. Cavalcanti, F.T.T.; Simao Neto, F.; Falcao, I.R.A.; Souza, J.E.S.; Moura Junior, L.S.; Sousa, P.S.; Rocha, T.G.; Sousa, I.G.; Gomes, P.H.L.; Souza, M.C.M.; et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. *Fuel* **2020**, *288*, 119577. [\[CrossRef\]](#)
87. Yan, J.; Yan, Y.; Liu, S.; Hu, L.J.; Wang, G. Preparation of cross-linked lipase-coated micro-crystals for biodiesel production from waste cooking oil. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 4755–4758. [\[CrossRef\]](#)
88. Abdulla, R.; Derman, E.; Mathialagan, T.; Yaser, A.Z.; Samah, M.A.A.; Gansau, J.A.; Najmuddin, S.U.F.S. Biodiesel production from waste palm cooking oil using immobilized *Candida rugosa* lipase. *Sustainability* **2022**, *14*, 13632. [\[CrossRef\]](#)
89. Taher, H.; Nashef, E.; Anvar, N.; Al-Zuhair, S. Enzymatic production of biodiesel from waste oil in ionic liquid medium. *Biofuels* **2017**, *10*, 463–472. [\[CrossRef\]](#)
90. Gong, H.; Gao, L.; Nie, K.; Wang, M.; Tan, T. A new reactor for enzymatic synthesis of biodiesel from waste cooking oil: A static-mixed reactor pilot study. *Renew. Energy* **2020**, *15*, 270–277. [\[CrossRef\]](#)
91. Geris, R.; Santos, N.A.C.; Amaral, B.A.; Maia, I.S.; Castro, V.D.; Carvalho, J.R.M. Biodiesel from soybean oil: Experimental procedure of transesterification for organic chemistry laboratories. *Quím. Nova* **2007**, *30*, 1369–1373. [\[CrossRef\]](#)
92. Ren, H.; Li, Y.; Liu, D. Free lipase-catalyzed esterification of oleic acid fatty acid ethyl ester preparation with response surface optimization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2013**, *90*, 73–79. [\[CrossRef\]](#)

93. José, C.; Bonetto, R.D.; Gambaro, L.A.; Torres, M.P.G.; Foresti, M.L.; Ferreira, M.J.; Birand, L.R. Investigation of the causes of deactivation degradation of the commercial biocatalyst Novozym 432 in ethanol and ethanol-aqueous media. *J. Mol. Catal. B Enzymat.* **2011**, *71*, 95–107. [[CrossRef](#)]
94. Aguiéiras, E.C.G.; Souza, S.L.; Langone, M.P. Study of immobilized lipase Lipozyme RM IM esterification reactions for biodiesel synthesis. *Quím. Nova* **2013**, *36*, 646–650. [[CrossRef](#)]
95. Queiroz, D.S.; Parreira, J.M.; Bastos, C.M. Efeito do solvente na atividade enzimática de lipases comerciais imobilizadas. In Proceedings of the Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, Brazil, 19–22 October 2014.
96. Nielsen, M.; Brask, J.; Fjerbaek, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *100*, 692–700. [[CrossRef](#)]
97. Silva, A.; Resende, R.J.; Costa, T.C.; Sousa, B.V.O.; Santos, A.K.; Marotti, B.S.; Silva, S.L.; Cancelier, A.; Gonçalves, D.B. Análise do potencial biocatalítico de lipase de *Candida rugosa* imobilizada em diferentes suportes. *Rev. Acta Ambient. Catarin.* **2021**, *18*, 10–23. [[CrossRef](#)]
98. Bessa, D.H.R.F.; Flumignan, D.L.; Souza, A.O.; Gonçalves, M.C.M.; Castro, C.F.S. Crude enzymatic broth from lipolytic fungi for the production of methyl esters. *Rev. Agronegócio Meio Ambiente* **2022**, *15*, e9279. [[CrossRef](#)]
99. Almeida, T.S.; Erazo, R.G.T.P.; Ramos, R.A.V.; Dias Filho, N.L. Transesterificação de óleo de soja e de pinhão-mansão por metanólise e etanólise empregando diversos catalisadores. In Proceedings of the 6th Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Natal, Brazil, 22–25 November 2016.
100. Banchapattanasakda, W.; Asavatesanupap, C.; Santikunaporn, M. Conversion of waste cooking oil into bio-fuel via pyrolysis using activated carbon as a catalyst. *Molecules* **2023**, *28*, 3590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Anwar, M.; Rasul, M.G.; Ashwath, N. A Systematic multivariate analysis of Carica papaya biodiesel blends and their interactive effect on performance. *Energies* **2018**, *11*, 2931. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

Endomelanconiopsis endophytica Lipase Immobilized in Calcium Alginate for Production of Biodiesel from Waste Cooking Oil

Juliana Gisele Corrêa Rodrigues ^{1,2}, Fernanda Veras Cardoso ², Sergio Duvoisin Junior ²,
Nêlio Teixeira Machado ³ and Patricia Melchionna Albuquerque ^{1,2,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus 69050-010, Brazil; juliana.gr@gmail.com

² Grupo de Pesquisa Química Aplicada à Tecnologia, Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus 69050-020, Brazil; fvc.gpq20@uea.edu.br (F.V.C.); sjunior@uea.edu.br (S.D.J.)

³ Faculdade de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-910, Brazil; machado@ufpa.br

* Correspondence: palbuquerque@uea.edu.br

Abstract: The increasing global demand for biodiesel is due to the urgent need to replace fossil diesel with a fuel based on renewable energy sources. Although chemical catalysis is widely used to produce biodiesel, it uses harsh operating conditions, has high energy consumption, and generates unwanted byproducts. In this scenario, biocatalysis stands out as an efficient and environmentally friendly alternative to chemical catalysis. In biocatalysis, the use of immobilized enzymes plays an important role in the reduction in costs. In this sense, we investigated the use of the lipase produced by an Amazonian endophytic fungus in an immobilized form in the transesterification of waste cooking oil for biodiesel production. The fungus *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC demonstrated a high production of lipase. The lipolytic extract was precipitated in ethanol, which increased the specific enzyme activity. The lipolytic extract and the precipitated lipolytic extract were immobilized in calcium alginate beads. Immobilization efficiency was over 89%. The immobilized biocatalysts showed thermal stability and were used in the production of biodiesel using waste cooking oil and ethanol. It was possible to reuse them for up to four reaction cycles, with yields greater than 70%. These results prove the efficiency of immobilized biocatalysts in the production of biodiesel from waste oils.

Keywords: biocatalysis; enzyme; ethanol; biofuel



Citation: Rodrigues, J.G.C.; Cardoso, F.V.; Duvoisin Junior, S.; Machado, N.T.; Albuquerque, P.M.

Endomelanconiopsis endophytica Lipase Immobilized in Calcium Alginate for Production of Biodiesel from Waste Cooking Oil. *Energies* **2024**, *17*, 5520. <https://doi.org/10.3390/en17225520>

Academic Editor: Diego Luna

Received: 26 September 2024

Revised: 14 October 2024

Accepted: 25 October 2024

Published: 5 November 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The environmental problems caused by the consumption of energy obtained from fossil fuels have generated growing global concerns. These fuels produce gases that contribute significantly to the worsening of the greenhouse effect, which highlights the urgent need to seek cleaner and more sustainable alternatives [1–3]. In addition, the finite nature of fossil reserves reinforces the urgency of transitioning to renewable sources, which is essential in order to guarantee energy security and environmental protection [4–6].

Biodiesel, as a renewable fuel, is an attractive alternative for replacing or complementing diesel and can reduce pollution [4–6]. Global demand for biodiesel has increased in recent decades as a result of public policies that encourage its incorporation into diesel [7]. As a direct consequence of this encouragement, the global biodiesel market is projected to reach USD 54.8 billion by 2028, with an annual growth rate of 5.8% [8].

The most widely used method for commercial biodiesel production is alkaline catalysis, which involves transesterification with NaOH or KOH to convert long-chain fatty acids into esters [9,10]. However, this process generates highly alkaline effluents, requires high water consumption in the purification stages, and presents difficulties in glycerol recovery [11]. In this scenario, enzymatic transesterification stands out for its ability to generate renewable,

biodegradable, and non-toxic fuel from triglycerides, with lower emissions of exhaust gasses [12–14].

The use of lipases in the catalysis of the transesterification has shown itself to be especially promising, offering significant advantages over traditional chemical methods [15–18]. Unlike chemical catalysts, lipases offer milder reaction conditions, higher selectivity, substrate specificity, and an absence of unwanted byproducts [19–24]. These characteristics make biocatalysis an attractive option due to their eco-efficiency and the reduction in the environmental impacts associated with the biodiesel production process [14,20,21]. In addition, the use of lipases in transesterification allows the use of alternative raw materials, such as waste cooking oils, thereby contributing to a reduction in waste and the circular economy [25–28]. This approach not only minimizes competition with food sources, but also proves to be economically viable, since waste cooking oils are generally more affordable in terms of cost [29,30].

Globally, more than 15 million tons of cooking oil are produced each year, and reusing this waste to produce biodiesel offers a significant opportunity to reduce the environmental impact associated with its disposal [31,32]. Although the collection of waste cooking oil presents logistical challenges, such as establishing an efficient collection network and ensuring consistent quality control of the residue, leveraging this abundant resource provides substantial ecological benefits [33]. It not only reduces pollution but also supports the circular economy by converting waste into valuable fuel, thus contributing to a more sustainable and environmentally friendly energy future [34]. Therefore, the use of waste cooking oil, allied to biocatalysis, can be considered an interesting approach for producing biodiesel in a sustainable manner.

Although there are still challenges to overcome when it comes to biocatalysis, such as the high cost of commercial enzymes and the need to optimize reaction conditions, immobilized lipases emerge as a viable technological solution for sustainable biodiesel production at an industrial scale [26,35]. Enzymatic immobilization allows lipases to be reused, which reduces operating costs and improves several enzymatic properties such as stability, selectivity, and resistance to inhibitors [36,37].

There have been many studies in the field of enzyme immobilization applied to biodiesel production. Shao et al. [38] obtained a conversion of 63.6% of methyl esters under ideal conditions for the immobilization of lipases from *Candida rugosa* in chitosan, while Bergamasco obtained a yield of 66.3% using a PVA support in the immobilization of lipases from *Rhizomucor miehei* [39].

Several immobilization techniques can be used, such as adsorption, covalent bonding, encapsulation, and cross-linking [36,37]. Among them, encapsulation stands out for its potential by confining enzymatic molecules in microcapsules [40]. These microcapsules protect enzymes against adverse conditions and allow controlled release, thus increasing catalytic efficiency [40]. Despite challenges such as the development of compatible materials, encapsulation is highly advantageous for the production of biodiesel with immobilized lipases and improves the stability and efficiency of enzymes, especially at a large scale [40,41].

Based on the above, this study aimed to use an extract rich in lipase produced by an Amazonian endophytic fungus, an unexplored and non-commercial enzyme source, in contrast to the conventional use of commercial lipases, to produce biodiesel. The enzymatic extract was immobilized in calcium alginate and used as the catalyst in the transesterification of waste cooking oil with ethanol, instead of the traditionally used methanol. This choice aligns the process with the principles of green chemistry, making it more sustainable and significantly reducing its environmental impact. The lipolytic extract presented catalytic potential similar to that of industrial lipases, allowed the reuse of the biocatalyst, and increased the efficiency of the process. In addition, the use of waste cooking oil promotes the circular economy, transforming waste into valuable products, and presents itself as a sustainable, ecological, and viable solution for the production of biodiesel.

2. Materials and Methods

The present study was conducted following the steps described in the flowchart shown in Figure 1.

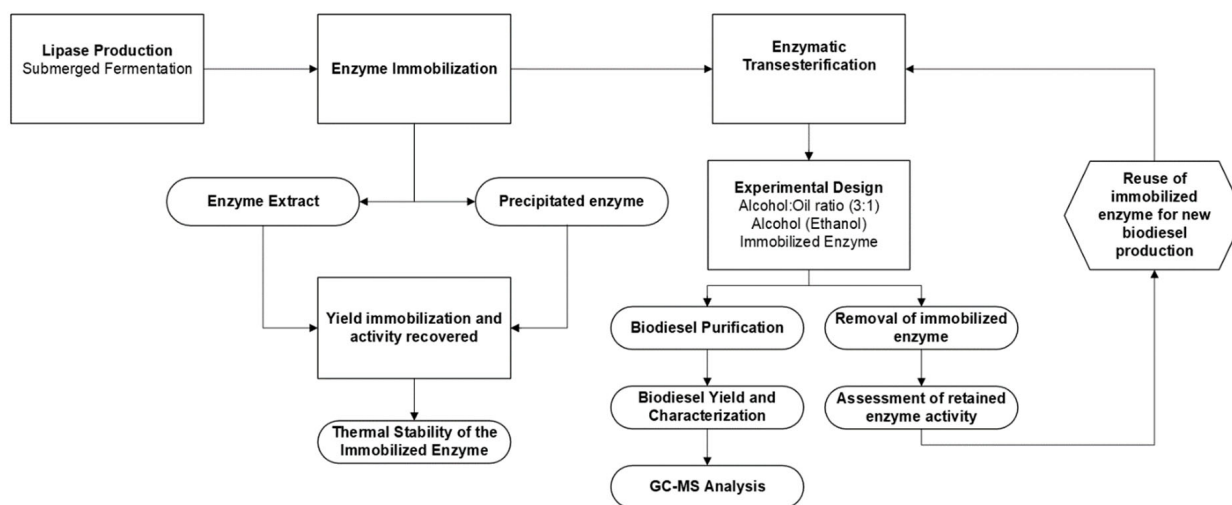


Figure 1. Flowchart of steps used to obtain biodiesel via enzymatic transesterification of waste cooking oil with ethanol.

2.1. Microorganism

In the present study, the endophytic fungus *Endomelanconiopsis endophytica* QAT_7AC isolated from *Aniba canelilla* (Lauraceae) was used for the production of lipase. The fungus belongs to the Central Microbiological Collections (CCMs) of the Amazonas State University (UEA) and was previously identified as an outstanding lipase producer [42]. Its reactivation was performed on potato dextrose agar (PDA) in a BOD incubator (TE-39I, Tecnal, Piracicaba, Brazil) at 30 °C for 11 days.

2.2. Lipase Production

The fungus was cultivated in Erlenmeyer flasks containing 100 mL of a liquid medium composed of NH_2NO_3 (1.0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.6 g/L), KH_2PO_4 (1.0 g/L), peptone (20 g/L), and olive oil (1%), with pH adjusted to 6.0 [43]. Three mycelial disks (5 mm diameter) taken from the edge of the *E. endophytica* colony grown in PDA were inoculated. The flasks were incubated in a shaker (TE-4200, Tecnal, Piracicaba, Brazil) for five days at 28 °C under constant agitation at 160 rpm. The experiments were carried out in triplicate. At the end of the 5th day, the lipolytic extract (LE) was filtered and used in the subsequent steps.

2.3. Determination of Lipase Enzyme Activity

The lipolytic activity was determined according to the methodology described by Winkler and Stuckmann [44]. An emulsion of *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) was prepared by adding, dropwise, 10% by volume of solution A (30 mg of pNPP dissolved in 10 mL of isopropanol) in 90% by volume of solution B (0.4 g of Triton X-100; 0.1 g of gum arabic, and 90 mL of Tris buffer 50 mM HCL, PH 7.0) under vigorous agitation. The emulsion obtained and the previously filtered LE samples were stabilized for 5 min at 37 °C. An aliquot of 0.2 mL of the samples was added to 1.8 mL of the substrate emulsion and the mixture was incubated for 15 min at 40 °C. The absorbance of the mixtures was measured in a spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan) at 410 nm [45]. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required for the release of 1.0 μmol of *p*-nitrophenol per minute under assay conditions.

The protein concentration present in the enzyme extract was determined using the Bradford method [46]. A 100 μL enzyme extract was mixed with 1000 μL of a Bradford

reagent, followed by reading the absorbance in a spectrophotometer at 595 nm. A standard curve was constructed using bovine serine albumin (BSA).

2.4. Enzyme Extract Precipitation

Ethanol was used for enzymatic precipitation, according to the methodology of Costa et al. [47]. With the aid of a burette, 90 mL of 99% ethanol was added at 2 mL/min to 10 mL of the enzyme extract in an ice bath. After the addition of ethanol, the mixture was placed in a freezer at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h and centrifuged at 4000 rpm for 15 min. Subsequently, the precipitate was resuspended in a 0.05 M sodium acetate buffer, pH 6.0, and the precipitated lipolytic extract (PLE) was used in the subsequent steps.

2.5. Calculation of Specific Activity, Recovery Percentage, and Purification Factor

The PLE was evaluated for the specific activity (SA), the percentage of recovery (R), and the purification factor (PF), in relation to the specific enzymatic activities before and after precipitation, using the equations below [48]:

$$AE = \frac{Ap}{C_{pp}} \quad (1)$$

$$R = \frac{Ap}{Aa} \times 100 \quad (2)$$

$$FP = \frac{AE}{\frac{Aa}{Cp}} \quad (3)$$

where

Ap—activity after precipitation (U/mL);

C_{pp}—protein concentration after precipitation (g);

Aa—enzyme activity before precipitation (U/mL);

C_p—protein concentration before precipitation (g).

2.6. Immobilization in Calcium Alginate

For the immobilization in calcium alginate, the lipolytic extracts LE and PLE were added separately to 50 mL of a 5% sodium alginate solution. After homogenization, the particles were formed by dripping the aqueous solution of sodium alginate into a gelling solution of calcium chloride at 0.1 M. This process occurred with a flow rate of 3.0 mL/min, with a drop height of 24 cm and a particle immersion time of 1 h (Figure 2) [49].

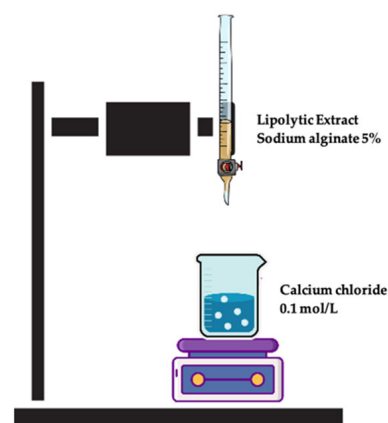


Figure 2. An illustration of the system used for the immobilization of the lipase-rich enzyme extract of the endophytic fungus *Endomelanconiopsis endophytica* in calcium alginate spheres.

2.7. Immobilization Yield

The immobilization yield (η) was calculated based on the enzymatic activity obtained and the residual enzymatic activity present in the reaction medium after the immobilization process. The immobilization yield was calculated using Equation (4) [50].

$$\eta (\%) = \frac{U_0 - U_f}{U_0} \times 100 \quad (4)$$

where

U_0 : enzymatic activity obtained at the beginning of immobilization (U/g);

U_f : residual enzyme activity present in the supernatant after immobilization (U/g).

2.8. Enzyme Activity Recovered

The calculation of the recovered activity was determined by the relationship between the enzymatic activity of immobilized biocatalysts and the initial and final activities present in the supernatant, according to Equation (5) [49].

$$AR (\%) = \frac{U_s}{U_0 - U_f} \times 100 \quad (5)$$

where

U_s : enzyme activity of immobilized lipolytic extract (U/g);

U_0 : enzymatic activity obtained at the beginning of immobilization (U/g);

U_f : residual enzyme activity present in the supernatant after immobilization (U/g).

2.9. Thermal Stability of Immobilized Enzyme Extracts

Thermal stability was evaluated by incubating immobilized lipolytic extracts (ILE and IPLE) in a 0.1 M sodium acetate buffer (pH 7.0). The immobilized extracts were incubated for 24 h at different temperatures, ranging from 20 to 70 °C. For this, 5 mL of the buffer was added to tubes containing 0.1 g of ILE or IPLE and kept under constant agitation (20 rpm) in an orbital shaker at study temperatures for 24 h. After the contact time, the tubes were centrifuged, and the supernatant was filtered. Enzyme activity was measured, and the proteins were quantified in the supernatant [51]. The thermal stability of the non-immobilized lipolytic extract (LE) was also evaluated for the purpose of comparison.

2.10. Enzymatic Transesterification—Biodiesel Production

Enzymatic transesterification was performed using the previously filtered waste cooking oil and ethanol. The reaction time was 360 min and the ethanol/oil ratio used was 3:1 [14]. The immobilized biocatalyst was added to the reaction medium at a concentration of 3% (w/v) [52,53]. The reactions were conducted in an adapted bench reactor, with constant agitation at 150 rpm and a temperature of 40 °C. To adapt the reactor, the reagents were added to 250 mL borosilicate glass Erlenmeyer flasks and sealed. These bottles were then placed in a shaker incubator (TE-4200, Tecnal, Piracicaba, Brazil) to control the temperature and agitation. Figure 3 schematically illustrates the test procedure. Biodiesel production was also carried out with LE for the purpose of comparison.

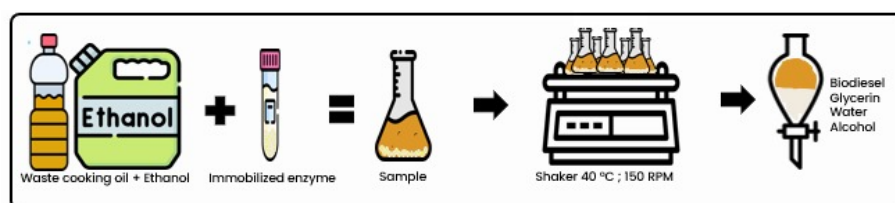


Figure 3. An illustration of the procedure used in the enzymatic transesterification reaction to obtain biodiesel.

For the purification of the biodiesel, at the end of the reaction, the mixture obtained was transferred to a separation funnel and allowed to stand for 24 h. After the separation of the phases, the biodiesel was washed with water [54] and used in the calculation of the yield and in the analysis via gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

2.11. Chromatographic Analysis

For the confirmation of the production of biodiesel, the methodology described by Naser et al. [55] was used (with adaptations). An aliquot of 1.0 mL of acetone was added to 100 μ L of the sample obtained after the purification process. The sample was then analyzed on a chromatograph (GCMS-TQ8050 NX, Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled to a mass spectrometer. The column used was an SH-I-5Sil MS (30 m $\times$ 0.25 mm). The drag gas was H₂ with a flow of 1.0 mL/min. The initial temperature of the column was 80 °C, maintained for 3 min, with a ramp rate of 5 °C/min up to 290 °C, and then it remained at this temperature for another 20 min. The temperature of the injector and detector remained at 300 °C. The amount of sample injected was 3 μ L. The resulting mass spectra were compared with those of the Smart Database Series. This comparison allowed the identification of the ethyl esters that were produced.

2.12. Biodiesel Yield

The yield of the biodiesel that was produced was calculated from the mass of biodiesel obtained after the transesterification reaction ($m_{\text{biodiesel}}$) as a function of the mass of waste cooking oil (m_{oil}) used in the reaction (Equation (6)) [56,57].

$$\text{Yield (\%)} = \frac{m_{\text{biodiesel}}}{m_{\text{oil}}} \times 100 \quad (6)$$

2.13. Reuse of Immobilized Biocatalyst

The reuse of the immobilized biocatalyst was evaluated through consecutive reactions of the biodiesel synthesis, reusing the IPLE and calculating the enzymatic activity at the end of each cycle, according to the aforementioned methodology [58,59]. The retained enzyme activity was calculated according to Equation (6) [58–60].

After each reaction cycle, the calcium alginate beads containing the biocatalyst were recovered by filtration and washed thoroughly with a Tris-HCl buffer solution and ultrapure water in order to remove any residues of the reagent [59,60]. The biocatalyst was then reapplied in subsequent cycles under the same reaction conditions, and its performance was monitored via the biodiesel yield. This procedure allowed us to evaluate the ability of the immobilized enzyme to sustain multiple reaction cycles while maintaining the desired catalytic efficiency [53].

2.14. Physical–Chemical Characterization of Biodiesel

The biodiesel was characterized following the standards provided by ANP (Brazilian National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels) for the evaluation of quality parameters [61]. The specific mass was determined using a 10 mL volumetric flask and an analytical balance [50]. The kinematic viscosity was determined using a viscometer (0860R24, Quimis, Diadema, Brazil) at 40 °C with the results expressed in mm²/s [62].

The flash point was obtained based on the ASTM D92 method [63], in which biodiesel samples were placed in a porcelain crucible positioned over an asbestos screen that was heated using a Bunsen burner. The increase in the temperature of the biodiesel was monitored with the aid of a mercury thermometer, while a flame was passed over at every 1 °C increase in the temperature of the fuel. The determination of the acid index consisted of weighing 5 g of the sample, followed by homogenization in an ether/alcohol (2:1) *v/v* solution and titration, using a 0.1 M sodium hydroxide solution that was previously standardized [64].

2.15. Statistical Analysis

The statistical analysis was used to evaluate the biodiesel yields obtained in the biocatalytic reactions, as well as to evaluate the results of thermal stability of the LE and PLE, both in their immobilized and non-immobilized forms. The results were expressed as the mean and standard deviation and submitted to the analysis of normality and homogeneity of data, the analysis of variance (ANOVA), and Student's T and Tukey tests ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

3.1. Lipase Production and Precipitation of Enzymatic Extract

After 5 days of the cultivation of the fungus *E. endophytica* QAT_7AC, an enzyme production of 11,262 U/mL and a protein concentration of 1.72 mg/mL were obtained [14]. This result is remarkable when compared to other studies [65–69] and highlights the potential of this endophytic fungus as a source of lipase.

The precipitation of the LE using ethanol resulted in an increase in specific activity by 28%, with a recovery of 73.8% (Table 1). Ethanol precipitation has previously been employed as an initial method of lipase purification. Zhu et al. [70] employed this method in the first step of purifying the lipase produced by *Burkholderia gladioli* and reported a 6.6% increase in specific enzyme activity. On the other hand, Preczeski et al. [71] observed a 90% increase in specific activity and a purification factor of 9.82 for a lipase produced by *Aspergillus niger* after the addition of salt and precipitation with ethanol. Therefore, ethanol precipitation proves to be effective in terms of increasing lipase enzymatic activity and stands out as a simple and efficient approach for the pre-purification of this enzyme.

Table 1. Enzymatic activity of the lipolytic extract produced by the endophytic fungus *Endomelanconopsis endophytica* QAT_7AC, after ethanol precipitation.

Sample	EA (U/mL)	PC (mg/mL)	SEA (U/mg)	RE (%)	PF
LE	11,262.0	1.72	6434.5	-	-
PLE	8146.0	0.99	8228.9	73.8	1.3

LE = Lipolytic extract. PLE = Precipitated lipolytic extract. EA = Enzyme activity. PC = Protein concentration. SEA = Specific enzyme activity. RE = Recovery. PF = Purification factor.

3.2. Enzyme Immobilization

Enzyme immobilization is an important strategy to enable the stability and reuse of biocatalysts [38,39]. With the immobilization of the LE, approximately 520 calcium alginate beads were produced. Each sphere weighed 30 mg on average and had a diameter of 6 mm. After 24 h of the production of the beads, it was possible to observe that the immobilization efficiency reached 89.7%, with retention of 67% of its initial enzymatic activity. When the PLE was immobilized in calcium alginate, 848 beads were produced, each with an average weight of 15 mg and a diameter of 7 mm. The immobilization yield was 92.26%, with 100% recovery of the initial lipase activity. These results are in line with other studies that used calcium alginate in lipase immobilization (Table 2).

Table 2. Efficiency of lipase immobilization in calcium alginate in different studies.

Calcium Alginate Concentration	Enzyme	Immobilization Efficiency	Retained Activity	Reference
2.0%	Lipase from <i>Rhizopus oryzae</i>	37.0%	60.0%	Ghattas et al. [72]
2.0%	Lipase from <i>Candida rugosa</i>	100%	94.0%	Vetrano et al. [73]
2.5%	Lipase from <i>Bacillus</i> sp.	69.4%	9.0%	Sari et al. [74]
3.7%	Lipolytic extract from <i>Yarrowia lipolytica</i>	100%	50.0%	Pereira et al. [75]
4.0%	Lipase from <i>Candida rugosa</i>	99.0%	57.6%	Knezevic et al. [76]
6.0%	Lipase from <i>Candida rugosa</i>	98.7%	53.5%	Knezevic et al. [76]

Table 2. Cont.

Calcium Alginate Concentration	Enzyme	Immobilization Efficiency	Retained Activity	Reference
5.0%	Lipolytic extract from <i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	89.7%	67.0%	This study
5.0%	Precipitated lipolytic extract from <i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	92.3%	100%	This study

It is worth mentioning that the LE presented a 33% reduction in the enzymatic activity after immobilization, while the PLE retained the total lipolytic activity (Table 2). Impurities in the lipolytic extract can interfere in the immobilization process, directly affecting the performance of the immobilized enzyme. These impurities compete with the enzymatic molecules for the binding sites in the alginate matrix, resulting in lower retention and reduced catalytic efficiency of the biocatalyst [77]. The purification of the enzymatic extract prior to immobilization significantly improves the binding efficiency and the enzymatic activity, minimizing the interference of non-enzymatic components that may compromise the structural integrity and performance of the biocatalyst [77,78]. On the other hand, the pre-purification step used here, precipitating the LE with ethanol, was sufficiently effective to retain 100% of the enzymatic activity.

3.3. Thermal Stability of the Biocatalysts

The thermal stabilities of the lipolytic extract (LE) and immobilized extracts (ILE and IPLE) are shown in Figure 4. When evaluating the thermal stability of lipolytic extracts produced by *E. endophytica*, an increase in lipase activity is observed as the temperature increases, with maximum enzymatic activity recorded between 40 and 50 °C (Figure 4).

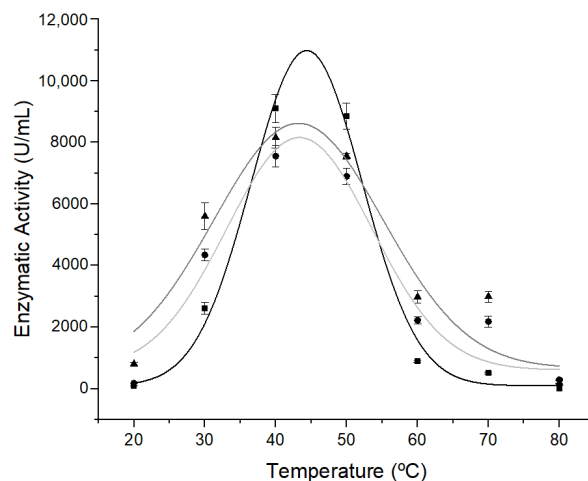


Figure 4. Thermal stability of lipolytic extracts of *Endomelanconiopsis endophytica*: (■) non-immobilized lipolytic extract; (●) lipolytic extract immobilized in calcium alginate; (▲) precipitated lipolytic extract immobilized in calcium alginate.

This result corroborates those of other studies that also report an ideal temperature of 40–60 °C for free and immobilized lipase in different supports [59,79–81]. The immobilized extracts (ILE and EPLE) maintained the enzymatic activity at a higher temperature range, between 30 and 50 °C, when compared to LE. Therefore, greater resistance of the enzyme to thermal denaturation is observed after its immobilization in alginate beads. In contrast, the further increase in temperature to over 55 °C resulted in a marked decrease in lipase activity. At 80 °C, none of the extracts showed enzymatic activity.

The use of the Gaussian model made it possible to construct a curve and formulate an equation that describes the enzymatic behavior at different temperatures. Mathematical

models, such as the Gaussian model, are essential tools for predicting enzyme performance, as they provide a detailed representation of how enzyme activity varies in response to temperature changes. Through the equation used, it was possible not only to confirm the enzyme's stability, but also identify the specific temperature at which each of the lipolytic extracts reached their highest enzymatic activity. This information is crucial for optimizing operating conditions and improving the control of enzymatic reactions in industrial applications. The derived equations are presented below. Equations (7)–(9) describe the mathematical adjustment for the thermal stability of LE, ILE, and IPLE, respectively:

$$y = 100.19 + 10,881.03 \cdot e(-0.5 \cdot (\frac{x - 44.36}{7.82})^2) \quad (7)$$

$$y = 610.92 + 7546.87 \cdot e(-0.5 \cdot (\frac{x - 43.33}{10.27})^2) \quad (8)$$

$$y = 668.58 + 7952.01 \cdot e(-0.5 \cdot (\frac{x - 43.20}{11.92})^2) \quad (9)$$

3.4. Biodiesel Production

The parameters used for the production of biodiesel were defined from the experimental design carried out in a previous study [14], in which we analyzed the influence of different experimental conditions on the yield of biodiesel produced by the enzymatic esterification of waste cooking oil. The yields obtained to produce biodiesel with the ILE and with the IPLE, after four reaction cycles, are shown in Figure 5.

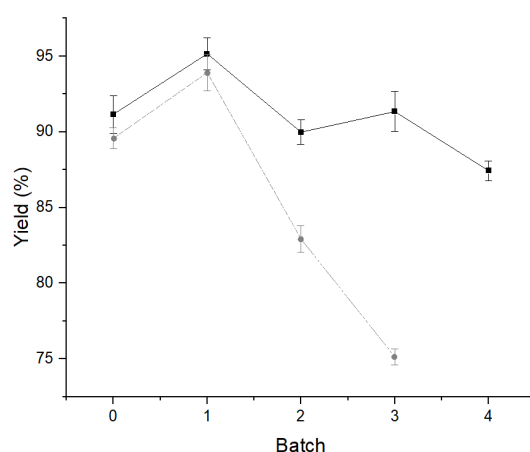


Figure 5. Biodiesel yield obtained from the transesterification of waste cooking oil with ethanol, catalyzed by the enzyme extract from *Endomelanconopsis endophytica* QAT_7AC (●) and by the precipitated enzyme extract (■), both immobilized in calcium alginate. The immobilized biocatalysts were reused for four reaction cycles and compared with the yield obtained with the use of the non-immobilized enzyme extract (Batch 0).

As shown in Figure 5, the first aspect to be pointed out is the increase in biodiesel yield when employing immobilized biocatalysts, compared to lipolytic extracts used in a free form. A biodiesel yield of 93.91% was obtained when using ILE and 95.15% was obtained when IPLE was used. Other studies have also proven the increase in biodiesel yield when using the immobilized enzyme compared to the free enzyme, highlighting the advantage of immobilization for biodiesel production processes [19,76,82].

Yields remained above 75% in three reaction cycles when using the ILE, with a decrease in efficiency of around 20% compared to the first cycle. When using the IPLE, the yield remained above 87% after four cycles, reducing less than 10% when compared to the first reaction cycle. However, the enzymatic activity of the IPLE decreased by about 90% in the last reaction cycle, leading to the termination of the use of the biocatalyst. This drop in the enzyme activity was also observed by Knezevic et al. [76], who used lipase from

Candida rugosa that was immobilized in calcium alginate for six cycles for the production of biodiesel, with a reduction in enzyme activity of 83.3% at the end of the sixth cycle.

On the other hand, Bhushan et al. [82] immobilized the lipase produced by *Arthrobacter* sp. in calcium alginate and reused it for 10 cycles in the hydrolysis of triacylglycerides. The immobilized enzyme showed an increase in thermal, pH, and storage stability when compared to the free enzyme. Vetrano et al. [73] demonstrated excellent recyclability of lipase from *C. rugosa* immobilized in alginate, with a residual enzymatic activity of greater than 80% in the tenth reaction cycle. Zhong et al. [19] investigated the use of the enzyme immobilized in alginate in up to six cycles in hydrolysis reactions, while Kareem et al. [83] reported that the lipase from *Aspergillus niger* immobilized in calcium alginate achieved a biodiesel yield of 96.9% and could be reused for 12 cycles. Therefore, it can be observed that the reuse of immobilized lipolytic extracts of *E. endophytica* can still be improved and new studies are necessary.

An alternative for improving the reusability of *E. endophytica* lipolytic extracts is the combination of immobilization with stabilization techniques, such as the use of hybrid supports and co-immobilizing agents, as described by Zhao et al. [84]. The addition of polyethylene glycol (PEG), for example, creates a dense network, protecting the enzyme, minimizing leaching, and allowing more cycles with high efficiency. This approach is promising since it improves the performance and longevity of biocatalysts [84].

In addition, it is important to highlight that we used the crude extract and the precipitated extract in immobilization, which possibly influenced the results, especially when compared to other studies that used the immobilized purified enzyme [85–87]. Despite this, the methodology shows great potential, showing that the enzyme from the Amazonian endophytic fungus can achieve yields comparable to those of commercial enzymes. The use of ethanol as a short-chain alcohol also stands out in our methodology, making the reaction more sustainable and innovative, reinforcing the positive ecological impact and relevance of the study.

In Figures 6 and 7, it is possible to observe the chromatograms of the biodiesel samples obtained from the enzymatic transesterification of the waste cooking oil with ethanol, using the ILE and IPLE, respectively.

In both the biocatalysts, linoleic acid ester (retention time = 33.48 min) was produced in greater quantity, followed by oleic acid ester (retention time = 33.60 min). It was also possible to identify the palmitic acid ester (retention time = 30.20) and, to a lesser extent, the stearic acid ester (retention time = 34.12 min). These results are in line with those obtained in a previous study, where the LE of *E. endophytica* was used in the production of biodiesel in a free form [14].

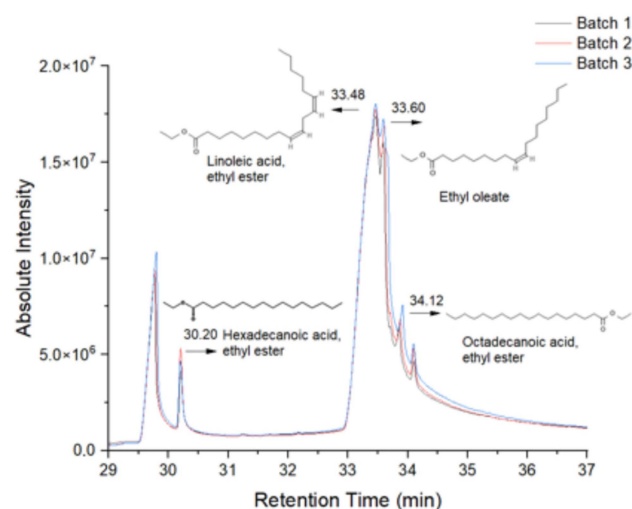


Figure 6. Chromatograms of biodiesel samples produced by enzymatic transesterification of waste cooking oil with ethanol, with recycling of crude lipolytic extract from *Endomelanconiopsis endophytica* immobilized in calcium alginate for three reaction cycles.

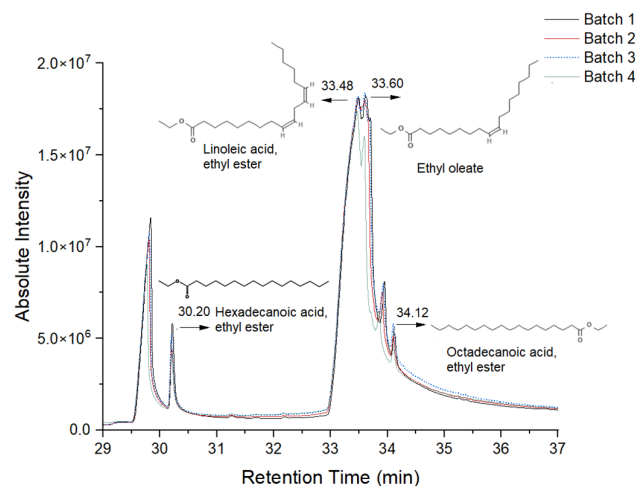


Figure 7. Chromatograms of the biodiesel samples produced via the enzymatic transesterification of waste cooking oil with ethanol, with recycling of the precipitated lipolytic extract from *Endomelanconopsis endophytica* immobilized in calcium alginate for four reaction cycles.

3.5. Physical–Chemical Characterization of Biodiesel

Table 3 presents the properties of the biodiesel produced with the LE, ILE, or IPLE, and the respective specifications of the ANP [61]. It is observed that the biodiesel produced via the enzymatic transesterification process with the LE is within the limits established by the standards for most of the properties. The values of specific gravity and kinematic viscosity indicate good lubricating properties for the biodiesel produced. The high flash point (143 °C) ensures safer storage and transport of the fuel. However, the ester content was below that specified by the ANP, indicating the need to increase the reaction time, since there are still free fatty acids to be converted into product. The excess of free fatty acids was also confirmed by the high acidity index, which also did not meet the standard stipulated by the norm. Thus, further studies should be carried out so that the parameters outside the established limits are within what is set out by the legislation, thereby guaranteeing a high-quality biodiesel that is suitable for use in diesel engines [88].

Table 3. The physicochemical characterization of biodiesel samples produced from the enzymatic transesterification of waste cooking oil with ethanol using the lipolytic extract (LE) of *Endomelanconopsis endophytica* QAT 7AC; the lipolytic extract immobilized in calcium alginate (ILE); and the precipitated lipolytic extract immobilized in calcium alginate (IPLE).

Properties of Biodiesel	Biodiesel Produced with LE	Biodiesel Produced with ILE	Biodiesel Produced with IPLE	ANP [46]
Kinematic viscosity (mm ² /s)	3.84	3.25	3.56	3.0–5.0
Specific mass (kg/m ³)	879.3	885.0	869.8	850–900
Ash (%)	0.02	0.01	0.01	<0.02
Flash point (°C)	112	143.5	143.7	>100
Ester content	86%	88.2%	89.7%	96.5%
Acid value (mgKOH/g)	4.15	3.85	3.95	<0.50

Furthermore, to improve compliance with ANP specifications, it would be important to optimize the purification steps of waste cooking oil prior to transesterification, which could reduce free fatty acid levels and, consequently, the acidity index. Post-production refining techniques, such as washing or distillation, can also be applied to remove impurities and improve the ester content. Adjusting the ratio of the reactants and maintaining optimal temperature and pH conditions during the reaction are strategies that could also be employed to maximize conversion and ensure that the biodiesel produced is in full compliance with ANP standards [89].

4. Conclusions

The Amazonian endophytic fungus *E. endophytica* QAT_7AC is a promising novel non-commercial source of lipase, which showed a catalytic performance comparable to that of industrial lipases. The lipolytic extract produced by this fungus, both in crude form and when precipitated with ethanol, was effectively immobilized in calcium alginate, with a high recovered enzymatic activity. The ethanol precipitation of the lipolytic extract was essential for improving immobilization efficiency, functioning as a pre-purification step that increased the retention of enzymatic activity. The biocatalysts were shown to be able to act in the transesterification of waste cooking oil with ethanol to produce biodiesel, which represents a sustainable process and is aligned with ecologically friendly principles. Their use allowed up to four reaction cycles, meeting most of the quality specifications provided by the ANP. However, in order for the biodiesel produced to fully meet the ANP standards, additional studies are needed. These studies should focus on improving the recycling of biocatalysts, increasing the number of viable reaction cycles, and maximizing the efficiency of the biodiesel production process. In addition, the pre-treatment of waste cooking oil and the optimization of the immobilization step, such as the combination of different methods, to improve the efficiency and durability of the biocatalyst, should also be investigated.

From the results obtained, our study highlights the industrial potential of this technology, as a fully sustainable and economically viable approach to the production of biofuels. The immobilization of lipases permitted the efficient reuse of the biocatalyst in multiple cycles, reducing operational costs and increasing the economic viability of the process. Moreover, the use of alternative raw materials, such as waste cooking oil, combined with the use of ethanol, reinforces the sustainability of the process, thus aligning it with the principles of the circular economy and offering a viable and effective solution for the industrial production of renewable biofuels.

Author Contributions: Conceptualization, P.M.A., J.G.C.R. and S.D.J.; investigation, J.G.C.R. and F.V.C.; methodology, J.G.C.R., P.M.A. and S.D.J.; formal analysis, P.M.A., N.T.M. and S.D.J.; data curation, J.G.C.R.; validation, J.G.C.R.; writing—original draft preparation, J.G.C.R.; writing—review and editing, P.M.A. and N.T.M.; project administration, P.M.A. and S.D.J.; resources, P.M.A. and S.D.J.; funding acquisition, P.M.A. and S.D.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (grant numbers 01.02.016301.00568/2021-05 and 01.02.016301.00101/2024-08), by POS-GRAD/FAPEAM 2023, by Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (grant number 406819/2022) and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (finance code 001). The APC was funded by CAPES.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge Universidade do Estado do Amazonas—UEA, FAPEAM, CNPq and CAPES for supporting this research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Kiehbaddroudzehad, M.; Merabet, A.; Ghenai, C.; Abo-Khalil, A.G.; Salameh, T. The role of biofuels for sustainable MicrogridsF: A path towards carbon neutrality and the green economy. *Heliyon* **2023**, *9*, 13407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Shirneshan, A. HC, CO, CO₂ and NO_x emission evaluation of a diesel engine fueled with waste frying oil methyl ester. *Procedia Soc. Behav. Sci.* **2013**, *75*, 292–297. [[CrossRef](#)]
3. Touqeer, T.; Mumtaz, M.W.; Mukhtar, H.; Irfan, A.; Akram, S.; Shabbir, A.; Rashid, U.; Nehid, I.A.; Choong, T.S.Y. Fe₃O₄-PDA-Lipase as Surface Functionalized Nano Biocatalyst for the Production of Biodiesel Using Waste Cooking Oil as Feedstock: Characterization and Process Optimization. *Energies* **2019**, *13*, 177. [[CrossRef](#)]

4. Pata, S.K.; Balcilar, M. Decarbonizing energy: Evaluating fossil fuel displacement by renewables in OECD countries. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2024**, *31*, 31304–31313. [\[CrossRef\]](#)
5. Nawkarkar, P.; Singh, A.K.; Abidin, M.Z.; Kumar, S. Life cycle assessment of *Chlorella* species producing biodiesel and remediating wastewater. *J. Biosci.* **2019**, *44*, 89. [\[CrossRef\]](#)
6. Pothu, R.; Mamede, N.; Boddula, R.; Mitta, H.; Perugopu, V.; Al-Qahtani, N. Sustainable conversion of biodiesel-waste glycerol to acrolein over Pd-modified mesoporous catalysts. *Mater. Sci. Energ. Technol.* **2023**, *6*, 226–236. [\[CrossRef\]](#)
7. Carpio, L.G.T. Transmission of variations in the biodiesel mandate for Brazilian biodiesel market. *Biofuels* **2023**, *14*, 373–386. [\[CrossRef\]](#)
8. Grand View Research: Biodiesel Market Size, Share & Trends Analysis Report by Feedstock (Vegetable Oils, Animal Fats), By Application (Fuel, Power Generation), by Region (Europe, APAC), and Segment Forecasts, 2022–2030. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biodiesel-market> (accessed on 11 October 2024).
9. Ferrusca, M.C.; Romero, R.; Martínez, S.L.; Remírez-Serrano, A.; Natividade, R. Biodiesel production from waste cooking oil: A perspective on catalytic processes. *Processes* **2023**, *11*, 1952. [\[CrossRef\]](#)
10. Corral-Bobadilla, M.; Lostado-Lorza, R.; Somovilla-Gómez, F.; Íñiguez-Macedo, S. Life cycle assessment multi-objective optimization for eco-efficient biodiesel production using waste cooking oil. *J. Clean. Prod.* **2022**, *359*, 132113. [\[CrossRef\]](#)
11. Claeys, C. Used Cooking Oil (UCO) feedstock now accounts for one-fifth of all European biofuels. In Proceedings of the ACI Oleofuels Conference, Marseille, France, 18–19 May 2022.
12. Farouk, S.M.; Tayeb, A.M.; Abdel-Hamid, S.M.S.; Osman, R.M. Recent advances in transesterification for sustainable biodiesel production, challenges, and prospects: A comprehensive review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2024**, *31*, 12722–12747. [\[CrossRef\]](#)
13. Nazloo, E.K.; Moheimani, N.R.; Ennaceri, H. Graphene-based catalysts for biodiesel production: Characteristics and performance. *Sci. Total Environ.* **2023**, *10*, 160000. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Rodrigues, J.G.C.; Cardoso, F.V.; Santos, C.C.; Matias, R.R.; Machado, N.T.; Duvoisin, S., Jr.; Albuquerque, P.M. Biocatalyzed Transesterification of Waste Cooking Oil for Biodiesel Production Using Lipase from an Amazonian Fungus *Endomelanconiopsis endophytica*. *Energies* **2023**, *16*, 6937. [\[CrossRef\]](#)
15. Tabatabaei, M.; Aghbashlo, M.; Dehghani, M.; Panahi, H.K.S.; Mollahosseini, A.; Hosseini, M.; Soufiyan, M.M. Reactor technologies for biodiesel production and processing: A review. *Prog. Energy Comb. Sci.* **2019**, *74*, 239–303. [\[CrossRef\]](#)
16. Rathore, D.; Sevda, S.; Prasad, S.; Venkatramanan, V.; Chandel, A.K.; Kataki, R.; Bhadra, S.; Channashettar, V.; Bora, N.; Singh, A. Bioengineering to Accelerate Biodiesel Production for a Sustainable Biorefinery. *Bioengineering* **2022**, *9*, 618. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Alagumalai, A.; Mahian, O.; Hollmann, F.; Zhang, W. Environmentally benign solid catalysts for sustainable biodiesel production: A critical review. *Sci. Total Environ.* **2021**, *10*, 144856. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Notarnicola, B.; Tassielli, G.; Renzulli, P.A.; Di Capua, R.; Astuto, F.; Riela, S.; Nacci, A.; Casiello, M.; Testa, M.L.; Liotta, L.F.; et al. Life Cycle Assessment of a system for the extraction and transformation of Water Treatment Sludge (WWTS)-derived lipids into biodiesel. *Sci. Total Environ.* **2023**, *883*, 163637. [\[CrossRef\]](#)
19. Zhong, L.; Feng, Y.; Wang, G.; Wang, Z.; Bilal, M.; Lv, H.; Jia, S.; Cui, J. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *152*, 207–222. [\[CrossRef\]](#)
20. Al-Kadmy, I.M.S.; Aziz, S.N.; Hussein, N.H.; El-Shafeiy, S.N.; Hamzah, I.H.; Suhail, A.; Alhomaidi, E.; Algammal, A.M.; El-Saber Batiha, G.; El Badre, H.M.; et al. Sequencing analysis and efficient biodiesel production by lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biol. Rep.* **2024**, *51*, 323. [\[CrossRef\]](#)
21. Alonazi, M.; Al-Diahan, S.K.; Alzahrani, Z.R.A.; Bacha, A.B. Combined immobilized lipases for effective biodiesel production from spent coffee grounds. *Saudi J. Biol. Sci.* **2023**, *30*, 103772. [\[CrossRef\]](#)
22. Mathew, G.M.; Raina, D.; Narisetty, V.; Kumar, V.; Saran, S.; Pugazhendhi, A.; Sindhu, R.; Pandey, A.; Binod, P. Recent advances in biodiesel production: Challenges and solutions. *Sci. Total Environ.* **2021**, *794*, 148751. [\[CrossRef\]](#)
23. Mahfoudhi, A.; Benmabrouk, S.; Fendri, A.; Sayari, A. Fungal lipases as biocatalysts: A promising platform in several industrial biotechnology applications. *Biotechnol. Bioeng.* **2022**, *119*, 3370–3392. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Borges, J.P.; Quilles, J.C., Jr.; Ohe, T.H.K.; Ferrarezi, A.L.; Nunes, C.D.C.C.; Boscolo, M.; Gomes, E.; Bocchini, D.A.; da Silva, R. Free and Substrate-Immobilised Lipases from *Fusarium verticillioides* P24 as a Biocatalyst for Hydrolysis and Transesterification Reactions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2021**, *193*, 33–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Malewska, E.; Kurańska, M.; Tenczyńska, M.; Prociak, A. Application of Modified Seed Oils of Selected Fruits in the Synthesis of Polyurethane Thermal Insulating Materials. *Materials* **2023**, *17*, 158. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Lotti, M.; Pleiss, J.; Valero, F.; Ferrer, P. Enzymatic Production of Biodiesel: Strategies to Overcome Methanol Inactivation. *Biotechnol. J.* **2018**, *13*, 1700155. [\[CrossRef\]](#)
27. Zulqarnain; Yusoff, M.H.M.; Ayoub, M.; Ramzan, N.; Nazir, M.H.; Zahid, I.; Abbas, N.; Elboughdiri, N.; Mirza, C.R.; Butt, T.A. Overview of Feedstocks for Sustainable Biodiesel Production and Implementation of the Biodiesel Program in Pakistan. *ACS Omega* **2021**, *6*, 19099–19114. [\[CrossRef\]](#)
28. Monika; Banga, S.; Pathak, V.V. Biodiesel production from waste cooking oil: A comprehensive review on the application of heterogeneous catalysts. *Energ. Nex.* **2023**, *10*, 100209. [\[CrossRef\]](#)
29. Silva, R.C.D.; Ferdaus, M.J.; Foguel, A.; da Silva, T.L.T. Oleogels as a Fat Substitute in Food: A Current Review. *Gels* **2023**, *9*, 180. [\[CrossRef\]](#)

30. Pang, Y.; Zhao, Y.; Li, S.; Zhao, Y.; Li, J.; Hu, Z.; Zhang, C.; Xiao, D.; Yu, A. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil. *Biotechnol. Biofuels*. **2019**, *12*, 241. [\[CrossRef\]](#)
31. Bacha, A.B.; Alonazi, M.; Alharbi, M.G.; Horchani, H.; Abdelmalek, I.B. Biodiesel production by single and mixed immobilized lipases using waste cooking oil. *Molecules* **2022**, *27*, 8736. [\[CrossRef\]](#)
32. Cordero-Ravelo, V.; Schallenberg-Rodriguez, J. Biodiesel production as a solution to waste cooking oil (WCO) disposal. Will any type of WCO do for a transesterification process? A quality assessment. *J. Environ. Manag.* **2018**, *15*, 117–129. [\[CrossRef\]](#)
33. Lombardi, L.; Mendecka, B.; Carnevale, E. Comparative life cycle assessment of alternative strategies for energy recovery from used cooking oil. *J. Environ. Manag.* **2018**, *15*, 235–245. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Thilakaranthne, D.; Miyuranga, K.A.V.; Arachchige, U.S.P.R.; Weerasekara, N.A.; Jayasinghe, R.A. Production of biodiesel from waste cooking oil in laboratory scale: A review. *Int. J. Scient. Eng. Sci.* **2020**, *5*, 28–34.
35. Wancura, J.H.C.; Tres, M.V.; Jahn, S.L.; de Oliveira, J.V. Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2020**, *67*, 648–667. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Mandari, V.; Devarai, S.K. Biodiesel Production Using Homogeneous, Heterogeneous, and Enzyme Catalysts via Transesterification and Esterification Reactions: A Critical Review. *Bioenergy Res.* **2022**, *15*, 935–961. [\[CrossRef\]](#)
37. Lam, M.K.; Lee, K.T.; Mohamed, A.R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 500–518. [\[CrossRef\]](#)
38. Shao, P.; Meng, X.; He, J.; Sun, P. Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. *Food Bioprod. Proces.* **2008**, *86*, 283–289. [\[CrossRef\]](#)
39. Bergamasco, J. Synthesis and Characterization of Poly (Vinyl Alcohol) Microspheres and Their Use as Supports for Immobilization of Lipase Produced by *Rhizomucor miehei* and Its Catalytic Study in the Transesterification Reaction of Soybean Oil for Biodiesel Production via the Ethyl Route. Master's Thesis, São Paulo State University Julio de Mesquita Filho, Institute of Biosciences, Letters, and Exact Sciences of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil, 2013.
40. Bilal, M.; Fernandes, C.D.; Mehmood, T.; Nadeem, F.; Tabassam, Q.; Ferreira, L.F.R. Immobilized lipases-based nano-biocatalytic systems—A versatile platform with incredible biotechnological potential. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *175*, 108–122. [\[CrossRef\]](#)
41. Gonçalves Filho, D.; Silva, A.G.; Guidini, C.Z. Lipases: Sources, immobilization methods, and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 7399–7423. [\[CrossRef\]](#)
42. Matias, R.R.; Rodrigues, J.G.C.; Procópio, R.E.L.; Matte, C.R.; Duvoisin, S., Jr.; Soares, R.M.D.; Albuquerque, P.M. Lipase production from *Aniba canelilla* endophytic fungi, characterization and application of the enzymatic extract. *Res. Soc. Develop.* **2022**, *11*, e180111234326. [\[CrossRef\]](#)
43. Gurgel, R.S.; Rodrigues, J.G.C.; Matias, R.R.; Batista, B.N.; Oliveira, R.L.; Albuquerque, P.M. Biological activity and production of metabolites from Amazon endophytic fungi. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2020**, *14*, 85–93. [\[CrossRef\]](#)
44. Winkler, U.K.; Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **1979**, *138*, 663–670. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Tombini, J. Selection of Lipolytic Microorganisms and Lipase Production from Soy Processing by Products. Master's Thesis, Federal Technological University of Paraná, Pato Branco, Brazil, 2015.
46. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248. [\[CrossRef\]](#)
47. Costa, M.A.L.; Farinas, C.S.; Miranda, E.A. Ethanol precipitation as a downstream processing step for concentration of xylanases produced by submerged and solid-state fermentation. *Braz. J. Chem. Eng.* **2018**, *35*, 477–488. [\[CrossRef\]](#)
48. Manera, A.P.; Meinhardt, S.; Kalil, S.J. Purification of amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *Semin. Cienc. Agrar.* **2011**, *32*, 651–658. [\[CrossRef\]](#)
49. Teixeira, V.F.T.; Pereira, N.R.; Waldman, W.R.; Ávila, A.L.C.D.; Pérez, V.H.; Rodríguez, R.J.S. Ion exchange kinetics of magnetic alginate ferrogel beads produced by external gelation. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *111*, 198–205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Bindu, V.U.; Shanty, A.A.; Mohanan, P.V. Parameters affecting the improvement of properties and stabilities of immobilized α -amylase on chitosan-metal oxide composites. *Int. J. Biochem. Biophys.* **2018**, *6*, 44–57. [\[CrossRef\]](#)
51. Yang, Q.; Wang, B.; Zhang, Z.; Lou, D.; Tan, J.; Zhu, L. The effects of macromolecular crowding and surface charge on the properties of an immobilized enzyme: Activity, thermal stability, catalytic efficiency and reusability. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 38028–38036. [\[CrossRef\]](#)
52. Cruz, J. Immobilization of *Candida antarctica* B Lipase on Chitosan for Biodiesel Production by Transesterification of Castor Oil. Master's Thesis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 2007.
53. Marder, F.; Celin, M.M.; Mazuim, M.S.; Schneider, R.C.S.; Macagnan, M.T.; Corbellini, V.A. Biodiesel production by biocatalysis using an alternative method of lipase immobilization in hydrogel. *Tecno-Lógica* **2008**, *12*, 56–64. [\[CrossRef\]](#)
54. Atadashi, I.M.; Aroua, M.K.; Aziz, A.A. Biodiesel separation and purification: A review. *Renew. Energy* **2011**, *36*, 437–443. [\[CrossRef\]](#)
55. Naser, J.; Avbenake, O.P.; Dabai, F.N.; Jibril, B.Y. Regeneration of spent bleaching Earth and conversion of recovered oil to Biodiesel. *Waste Manag.* **2021**, *126*, 258–265. [\[CrossRef\]](#)
56. Parandi, E.; Safaripour, M.; Abdellatif, M.H.; Saidi, M.; Bozorgian, A.; Nodeh, H.R.; Rezaia, S. Biodiesel production from waste cooking oil using a novel biocatalyst of lipase enzyme immobilized magnetic nanocomposite. *Fuel* **2022**, *313*, 123057. [\[CrossRef\]](#)

57. Jamil, N.; Zairi, M.N.M.; Nasim, N.A.M.; Pa'ee, F. Influences of Enviromental Conditions to Phytoconstituents in *Clitoria ternatea* (Butterfly Pea Flower)—A review. *J. Sci. Technol.* **2018**, *10*, 208–228. [\[CrossRef\]](#)
58. Silva, J.A.; Macedo, G.P.; Rodrigues, D.S.; Giordano, R.L.C.; Gonçalves, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochem. Eng. J.* **2012**, *60*, 16–24. [\[CrossRef\]](#)
59. Adetunji, A.I.; Olaniran, A.O. Immobilization and characterization of lipase from an indigenous *Bacillus aryabhattai* SE3-PB isolated from lipid-rich wastewater. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2018**, *48*, 898–905. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Quayson, E.; Amoah, J.; Hama, S.; Kondo, A.; Ogino, C. Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2020**, *134*, 110355. [\[CrossRef\]](#)
61. ANP. National Agency of Petroleum. ANP Resolution 42/2004. 2004. Available online: <https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-42-2004-> (accessed on 7 June 2024).
62. Battisti, G.; Seabra, E., Jr.; Pozzo, D.M.; Santos, R.F. Comparison of the Physicochemical Characteristics of Citronella and Eucalyptus Biodiesel with Soybean Biodiesel. *II Seminar on Energy Engineering in Agriculture, Acta Iguazu.* **2017**, *6*, 173–180.
63. ASTM D92-18; Flash and Fire Points by Cleveland Open Cup Tester. ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2018.
64. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*; Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, Brazil, 2008.
65. Sopalun, K.; Laosripaiboon, W.; Wachirachaiarn, A.; Iamtham, S. Biological potential and chemical composition of bioactive compounds from endophytic fungi associated with thai mangrove plants. *S. Afr. J. Bot.* **2021**, *141*, 66–76. [\[CrossRef\]](#)
66. Oliveira, G.F.; Silva, M.R.L.; Hirata, D.B. Production of new lipase from *Preussia africana* and a partial characterization. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2021**, *52*, 942–949. [\[CrossRef\]](#)
67. Rocha, K.S.C.; Queiroz, M.S.R.; Gomes, B.S.; Dallago, R.; Souza, R.O.M.A.; Guimarães, D.O.; Itabaiana, I., Jr.; Leal, I.C.R. Lipases of endophytic fungi *Stemphylium lycopersici* and *Sordaria* sp.: Application in the synthesis of solketal derived monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* **2020**, *142*, 109664. [\[CrossRef\]](#)
68. Sena, I.S.; Ferreira, A.M.; Marinho, V.H.; Holanda, F.H.; Borges, S.F.; Souza, A.A.; Koga, R.C.R.; Lima, A.L.; Florentino, A.C.; Ferreira, I.M. *Euterpia oleracea* Mart (Açaizeiro) from the Brazilian Amazon: A Novel Font of Fungi for Lipase Production. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2394. [\[CrossRef\]](#)
69. Rana, Q.U.A.; Irfan, M.; Ahmed, S.; Hasan, F.; Shah, A.A.; Khan, S.; Rehman, F.U.; Khan, H.; Ju, M.; Li, W.; et al. Bio-catalytic transesterification of mustard oil for biodiesel production. *Biofuels* **2019**, *13*, 69–76. [\[CrossRef\]](#)
70. Zhu, J.; Liu, Y.; Qin, Y.; Pan, L.; Li, Y.; Liang, G.; Wang, Q. Isolation and Characterization of a Novel Bacterium *Burkholderia gladioli* Bsp-1 Producing Alkaline Lipase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 1043–1052. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Preczeski, K.P.; Kamanski, A.B.; Scapini, T.; Camargo, A.F.; Modkoski, T.A.; Rosseto, V.; Venturin, B.; Mulinari, j.; Golunski, S.M.; Mossi, T.A.; et al. Efficient and Low-Cost Alternative for Lipase Concentration Aimed at Application in the Treatment of Residual Kitchen Oils. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2018**, *41*, 851–857. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Ghattas, N.; Filice, M.; Abidi, F.; Guisan, J.M.; Ben, A. Purification and improvement of the functional properties of *Rhizopus oryzae* lipase using immobilization techniques. *J. Mol. Catal. B Enz.* **2014**, *110*, 111–116. [\[CrossRef\]](#)
73. Vetrano, A.; Gabriele, F.; Germani, R.; Spreti, N. Characterization of lipase from *Candida rugosa* entrapped in alginate beads to enhance its thermal stability and recyclability. *New J. Chem.* **2022**, *46*, 10037. [\[CrossRef\]](#)
74. Sari, A.N.M.; Koentjoro, M.P.; Prasetyo, E.N. Lipase Immobilization based on biopolymer. In Proceedings of the Surabaya International Health Conference, Surabaya, Indonesia, 13–14 July 2019.
75. Pereira, A.S.; Miranda, S.M.; Lopes, M.; Belo, I. Factors affecting microbial lipids production by *Yarrowia lipolytica* strains from volatile fatty acids: Effect of co-substrates, operation mode and oxygen. *J. Biotechnol.* **2021**, *331*, 37–47. [\[CrossRef\]](#)
76. Knezevic, Z.; Bobic, S.; Milutinovic, A.; Obradovic, B.; Mojovic, L.; Bugarski, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. *Proc. Biochem.* **2002**, *32*, 313–318. [\[CrossRef\]](#)
77. Khan, M.R. Immobilized enzymes: A comprehensive review. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2021**, *45*, 207. [\[CrossRef\]](#)
78. Ahmed, N.E.; El Shamy, A.R.; Awad, H.M. Optimization and immobilization of amylase produced by *Aspergillus terreus* using pomegranate peel waste. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2020**, *44*, 109. [\[CrossRef\]](#)
79. Pereira, A.S.; Diniz, M.M.; Jong, G.; Gama Filho, H.S.; dos Anjos, M.J.; Finotelli, P.V.; Fontes-Sant'Ana, G.C.; Amaral, P.F.F. Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: Morphological, physico-chemical and kinetic characteristics. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *139*, 621–630. [\[CrossRef\]](#)
80. Ng, C.H.; Yang, K.L. Lipase in biphasic alginate beads as a biocatalyst for esterification of butyric acid and butanol in aqueous media. *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *82*, 173–179. [\[CrossRef\]](#)
81. Colla, L.M.; Ficanha, A.M.M.; Rizzardi, J.; Bertolin, T.E.; Reinehr, C.O.; Costa, J.A.V. Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 25959. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Bhushan, I.; Parhad, R.; Qazi, G.N. Immobilization of lipase by entrapment in Ca-alginate beads. *J. Bioac. Compat. Polym.* **2008**, *23*, 552–562. [\[CrossRef\]](#)
83. Kareem, S.O.; Falokun, E.I.; Balogun, S.A.; Akinloye, O.A.; Omeike, D.O. Improved biodiesel from palm oil using lipase immobilized calcium alginate and *Irvingia gabonensis* matrices. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2020**, *9*, 59. [\[CrossRef\]](#)
84. Zhao, K.; Di, Q.; Cao, X.; Wang, M.; Deng, L.; Wang, F. Production of biodiesel using immobilized lipase and the characterization of different co-immobilizing agents and immobilization methods. *Sustainability* **2016**, *8*, 764. [\[CrossRef\]](#)

85. Poppe, J.K.; Matte, C.R.; Peralba, M.C.R.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R.C.; Ayub, M.A.Z. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. *Appl. Cat. A-Gen.* **2015**, *490*, 50–56. [[CrossRef](#)]
86. Alnoch, R.C.; Santos, L.A.; Almeida, J.M.; Krieger, N.; Mateo, C. Recent trends in biomaterials for immobilization of lipases for application in non-conventional media. *Catalysts* **2020**, *10*, 697. [[CrossRef](#)]
87. Chattopadhyay, S.; Sen, R. Fuel properties, engine performance and environmental benefits of biodiesel produced by a green process. *Appl. Energy* **2013**, *105*, 319–326. [[CrossRef](#)]
88. Larimi, A.; Harvey, A.P.; Phan, A.N.; Beshtar, M.; Wilson, K.; Lee, A.F. Aspects of reaction engineering for biodiesel production. *Catalysis* **2024**, *14*, 701. [[CrossRef](#)]
89. Martín, J.F.G.; Ruiz, J.C.; García, M.T.; Feng, C.; Mateos, P.A. Esterefication of free fatty acids with glycerol within biodiesel production framework. *Processes* **2019**, *7*, 832. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.