

Síntese de ácidos graxos livres do óleo de caroço de algodão

Ana Paula Guerra¹, Djéssica Tatiane Raspe², Ana Claudia Santos da Rosa³, Camila da Silva^{3*}

¹Engenheira de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Brasil. (*Autor correspondente: camiladasilva.eq@gmail.com).

Histórico do Artigo: Submetido em: 27/01/2022 – Revisado em: 15/03/2022 – Aceito em: 14/06/2022

RESUMO

Vislumbrando obter um hidrolisado com elevados percentuais de ácidos graxos livres (AGLs), o presente trabalho teve como objetivo explorar a hidrólise enzimática do óleo de caroço de algodão (OCA). Diferentes pré-tratamentos para purificação do óleo foram propostos, dos quais a lavagem com água aquecida à 80 °C resultou em apreciáveis 52,2% de AGLs, sendo esta etapa fixada para a condução das posteriores. O efeito das variáveis do processo (percentual de água, pH da solução tampão e percentual de catalisador) foi avaliado sequencialmente, por meio dos catalisadores enzimáticos Lipozyme® RM IM e Lipozyme® TL IM. O aumento do percentual de água (5-100% em relação à massa de óleo) e pH da solução tampão (5,7-8,2) no meio reacional foi proporcional ao aumento da formação de AGL para ambas as enzimas avaliadas, com destaque para a Lipozyme® TL IM. Ao analisar a influência do catalisador (1-15%), pode-se constatar que menores percentuais (5%) promoveram a formação de maiores teores de AGLs (~83%). Após efeito das variáveis, na faixa experimental considerada, ~83% de AGLs foram obtidos utilizando 50% de solução tampão à pH 8,2 e 5% de enzima Lipozyme® TL IM, durante 6 horas de reação à 55 °C e 400 rpm.

Palavras-Chaves: Catálise enzimática, Hidrólise, Variáveis experimentais.

Synthesis of free fatty acids of cotton seed oil

ABSTRACT

Seeking to obtain a hydrolyzate with high percentages of free fatty acids (FFA), the present work aimed to explore the enzymatic hydrolysis of cottonseed oil (OCA). Different pretreatments for oil purification were proposed, of which washing with water heated to 80 °C resulted in appreciable 52.2% of FFAs, this stage being fixed for the conduction of the latter. The effect of the process variables (water percentage, buffer pH and percentage of catalyst) was evaluated sequentially through the enzymatic catalysts Lipozyme® RM IM and Lipozyme® TL IM. The increase in the percentage of water (5-100% in relation to the oil mass) and pH of the buffer solution (5.7-8.2) in the reaction medium was proportional to the increase of FFA formation for both enzymes evaluated, with emphasis on Lipozyme® TL IM. When analyzing the influence of the catalyst (1-15%), it can be seen that lower percentages (5%) promoted the formation of higher levels of AGLs (~83%). After effect of the variables, in the experimental range considered, ~83% of FFAs were obtained using 50% buffer solution at pH 8.2 and 5% Lipozyme® TL IM enzyme, during 6 hours of reaction at 55 °C and 400 rpm.

Keywords: Enzymatic catalysis, Hydrolysis, Experimental variables.

Guerra, A. P., Raspe, D. T., Rosa, A. C. S., Silva, C. (2022). Síntese de ácidos graxos livres do óleo de caroço de algodão. *Revista Brasileira de Meio Ambiente*, v.10, n.2, p.136-148.



1. Introdução

Desenvolver tecnologias renováveis, capazes de melhorar o atual cenário no uso de combustíveis de origens fósseis, tornou-se foco nas últimas décadas, principalmente no que diz respeito ao biodiesel, que possui a particularidade de ser um combustível limpo e renovável. A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 vigente no Brasil, estabelece que o biodiesel é um “*combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil*” (Brasil, 2005). Resultante da mistura de ésteres de ácidos graxos, o biodiesel é oriundo de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais (triglicerídeos), cuja produção de energia ocorre quando estes são estimulados por um catalisador adequado (ácido, básico ou enzimático) e reagem quimicamente com um álcool, comumente etanol ou metanol (Hájek et al., 2021; Rashid; Hazmi, 2022).

O Brasil é provido de diversas espécies de oleaginosas das quais o biodiesel pode ser produzido (Cajamarca et al., 2018). Os óleos provenientes de culturas alimentares são as principais fontes para sua produção (Brennan; Owender, 2010; Freitas, 2011; Costa; Oliveira, 2022), sendo o óleo de soja o principal e mais empregado, atualmente, em virtude de sua disponibilidade, capaz de fornecer o mercado interno deste biocombustível (ANP, 2019). No entanto, divergências entre o uso do grão e das terras cultivadas para finalidades energéticas e alimentares passou a ser pautada (Brennan; Owender, 2010; Conceição et al., 2012), alavancando o incentivo e exploração da utilização de demais substratos como fonte de óleo, contribuindo assim a complementação da demanda primária deste biocombustível.

O óleo de caroço de algodão (OCA), subproduto resultante do beneficiamento do algodão em caroço para a extração da fibra, tem sido citado entre outras aplicações com potencial na produção de biodiesel (Mahdavi; Monajemi, 2014; Mujeli et al., 2016; Malhotra; Ali, 2018; Djomdi et al., 2020; Yesilyurt; Aydin, 2020; Razzaq et al., 2022), principalmente por ser a quinta maior oleaginosa em termos de volume de produção de óleo no mundo (500-550 mil toneladas/ano) (CONAB, 2018), ocupar a quinta posição entre as matérias-primas mais utilizadas no Brasil para a produção de biodiesel (ANP, 2016) e possuir custo inferior comparativamente à alguns óleos vegetais (ABRAPA, 2017; CONAB, 2019). No entanto, na maioria dos casos estudados, tem sido reportadas interações complexas entre as variáveis que afetaram notavelmente a eficiência do processo, o que se deve ao fato de que o OCA se caracteriza por considerável percentual de AGLs e água, o que torna o processo convencional de transesterificação homogênea alcalina inviável (Litinas et al., 2020). Essa composição em AGLs desencadeia ao processo a formação de sabão, diminuindo a eficiência da reação, limitando o processo de separação e purificação dos produtos (Fernandez, Liu e Zhao, 2017).

Dentre as tecnologias disponíveis que visam solucionar os inconvenientes do processo convencional para substratos com elevada acidez e umidade, está a obtenção de ésteres de ácidos graxos por meio da hidrólise dos triglicerídeos seguido da esterificação dos AGLs (Vescovi et al., 2016; Souza et al., 2016; Mello et al., 2017; Zenevich et al., 2017; Pradana et al., 2018; Rosset et al., 2019; Costa et al., 2020). Dentre os catalisadores disponíveis para a condução destes processos, destaque é dado aos catalisadores enzimáticos, em virtude, principalmente, de serem facilmente separados do meio de reação resultando em maior pureza dos coprodutos e reutilização por vários ciclos sem gerar resíduos tóxicos (Tavares et al., 2017). As enzimas ainda permitem que as reações sejam realizadas em temperaturas amenas e pressões atmosféricas (Ferreira et al., 2019), o que evita a degradação dos produtos e reduz os gastos com energia (Sheldon; Woodley, 2018), tornando-se alvo atrativo à investigação.

No presente estudo, a hidrólise enzimática do óleo de caroço de algodão foi conduzida, principalmente, por destacar-se sob os métodos convencionais e de altas temperaturas (Jiang et al., 2012; Lima et al., 2019). Para tanto, a influência das variáveis teor de água, pH da solução tampão e percentual de catalisador foi analisado mediante a utilização da Lipozyme® RM IM e Lipozyme® TL IM, objetivando-se a

obtenção de um hidrolisado com consideráveis teores de AGLs para posterior utilização na etapa de esterificação.

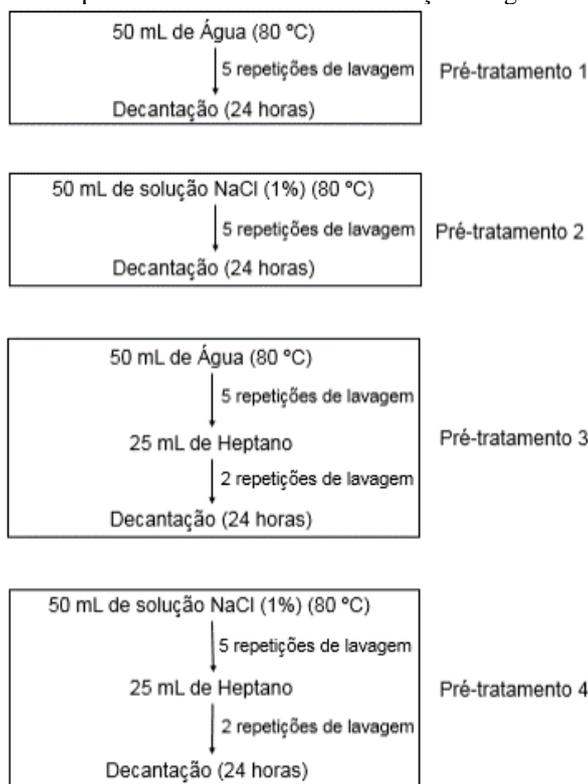
2. Material e Métodos

Nas reações foram utilizados como substratos o óleo de caroço de algodão (Paraguaçu Textil), cuja composição química é descrita por Silva e Trentini (2013), água destilada, solução tampão fosfato de sódio (Neon), preparada conforme reportado por Gomori (1955) e como catalisador, as enzimas Lipozyme® *Rhizomucor miehei* imobilizada (Lipozyme® RM IM) e Lipozyme® *Thermomyces lanuginosus* imobilizada (Lipozyme® TL IM) (Novozymes®). Na etapa de titulação das amostras foram utilizados: solução de etanol/éter etílico 1:2 (v:v) (Vetec/Nuclear), hidróxido de sódio 0,1 M (Nuclear) e o indicador fenolftaleína (Nuclear).

A purificação do óleo de caroço de algodão foi realizada em um funil de decantação considerando as etapas, solventes, temperatura e tempo apresentados na Figura 1, onde o efeito de quatro diferentes pré-tratamentos foram avaliados.

As etapas descritas na Figura 1 envolveram os pré-tratamentos do OCA avaliados, englobando sucessivas lavagens do óleo por diferentes solventes, como a água aquecida à 80 °C (pré-tratamento 1); solução de cloreto de sódio (NaCl) à concentração de 1% e aquecida à 80 °C (pré-tratamento 2); água aquecida à 80 °C seguida de lavagens com heptano (pré-tratamento 3) e, por fim, solução de NaCl (1%) aquecida à 80 °C, seguida de heptano (pré-tratamento 4), com posterior repouso dos sistemas por 24 horas. Transcorrido o tempo de decantação, a porção inferior foi removida e o óleo foi coletado, o solvente remanescente foi evaporado para então designarem-se as reações de hidrólise.

Figura 1 – Influência dos diferentes pré-tratamentos do óleo de caroço de algodão sob o processo de hidrólise.



As reações de hidrólise enzimática foram conduzidas em um reator encamisado de vidro de 40 mL, conectado a um banho termostático com controle da temperatura (Marconi) e uma chapa de agitação magnética (Marconi, MA 085), conforme descrito por Raspe, Cardozo-Filho e Silva (2013), com pequenas modificações.

A obtenção das amostras do meio reacional foi realizada, inicialmente, com a ativação da enzima (40 °C/1 h). Após, adicionaram-se ao reator os substratos (água ou tampão) em relação à massa de óleo em suas quantidades específicas de 5, 10, 15, 50 e 100% (m/m), e por fim, a enzima (em suas quantidades pré-estabelecidas) de 1, 5, 7,5, 10, 12,5 e 15% em relação à massa dos substratos (m/m). Os experimentos foram conduzidos mediante condições fixas de temperatura, agitação e tempo de 55 °C, 400 rpm e 6 horas, respectivamente. Ao final do tempo da reação, todo o meio reacional foi recolhido e filtrado a vácuo com sucessivas lavagens com n-heptano para separação de toda a amostra da superfície das enzimas imobilizadas. As amostras sem enzima foram transferidas para frascos de amostragem e colocadas em estufa com circulação de ar forçado para evaporação do excesso de solvente. Por fim, as amostras foram refrigeradas para posterior análise dos produtos de interesse.

A determinação do teor de AGLs foi realizada utilizando o método Ca 5a-40 (AOCS, 1998), que consiste na titulação ácido-base usando uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) previamente padronizada (0,1 mol L⁻¹) como agente titulante. Os resultados foram obtidos em duplicata e são apresentados como teor de AGLs, sendo submetidos à ANOVA, Tukey e Dunnett de fator único (p>0,05) para avaliar diferenças nas médias de tratamento.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito do pré-tratamento do óleo

A Tabela 1 apresenta os resultados para as reações de hidrólise do óleo de caroço de algodão purificado perante diferentes etapas utilizando a enzima Lipozyme® TL IM como catalisador. Nesta etapa, os experimentos foram realizados na temperatura de 55 °C, 50% de água (em relação à massa de óleo), 5% de catalisador (em relação à massa dos substratos), agitação de 400 rpm e tempo de reação de 6 horas.

Tabela 1 – Resultados experimentais para a hidrólise do óleo de caroço de algodão purificado.

Pré-tratamentos	AGLs (%)
Sem purificação	47,55 ± 0,94 ^a
Água (80 °C)	52,28 ± 1,15 ^b
Solução de NaCl à 1% (80 °C)	45,23 ± 0,44 ^c
Água (80 °C) + Heptano	52,28 ± 1,98 ^b
Solução de NaCl à 1% + Heptano (80 °C)	48,32 ± 0,16 ^a

Fonte: Os autores.

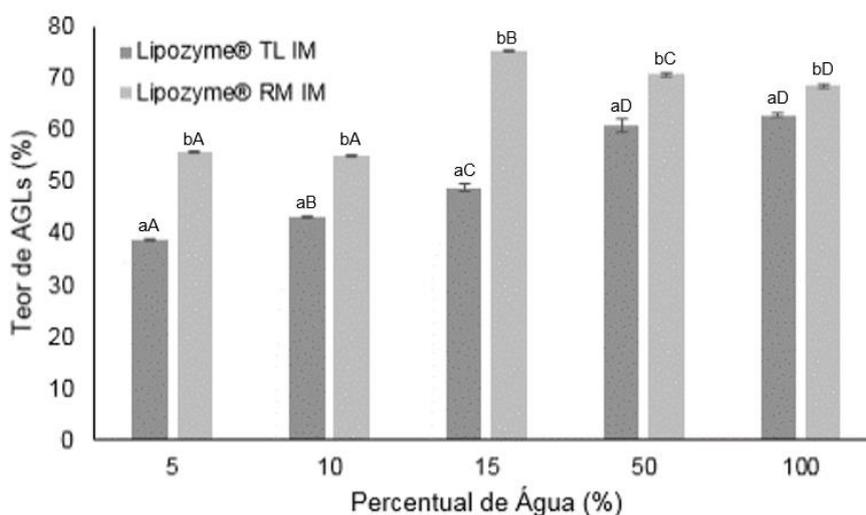
Conforme pode-se verificar na Tabela 1, ao conduzir as reações de hidrólise com os óleos pré-tratados, teores de AGLs superiores à amostra sem purificação (~47%) foram obtidos, com exceção ao tratamento conduzido com a solução de NaCl (1%) (~45%). Ao analisar os tratamentos, pode-se constatar obtenção de teores de AGLs na ordem de 52% para o óleo que foi lavado apenas com água (80 °C), enquanto para tratamentos associados ao uso de um ou mais solventes, este rendimento foi inferior (<52%). Tem-se reportado que a utilização de solventes orgânicos, como meios de reação para as reações enzimáticas,

proporciona vantagens atraentes em comparação com os sistemas tradicionais, como aumento da solubilidade dos substratos e supressão das reações dependentes de água (Raspe, Cardozo-Filho e Silva, 2013). No entanto, algumas desvantagens estão correlacionadas, como a inativação de enzimas, limitações na transferência de massa em sistemas com solventes/substratos que apresentem elevada viscosidade e custo elevado do solvente (Doukyu; Ogino, 2010; Batistella et al., 2012), o que torna o processo dispendioso. Neste trabalho, a purificação do óleo de caroço de algodão obtida por meio da lavagem com água (80 °C) resultou em teores de AGLs apreciáveis, sendo, portanto, o pré-tratamento fixado para o preparo do óleo para a condução das etapas posteriores.

3.2 Influência do teor de água

O efeito do teor de água (em relação à massa de óleo) sob o teor de ALGs do óleo de caroço de algodão foi avaliada mantendo-se a temperatura fixa em 55 °C, percentual de catalisador enzimático de 5% (em relação aos substratos) e tempo de reação fixo de 6 horas, cujos resultados estão expressos na Figura 2.

Figura 2 – Influência do percentual de água sob a hidrólise do óleo do caroço de algodão utilizando as enzimas Lipozyme® RM IM e Lipozyme® TL IM como catalisador.



Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (efeito do percentual de água nos diferentes catalisadores) e maiúsculas (efeito do percentual de água para cada catalisador) não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

Fonte: Os autores.

O favorecimento da produção de AGLs pôde ser verificada com o aumento da quantidade de água no meio reacional, conforme demonstra a Figura 2. Entretanto, à elevadas quantidades de água no meio (50 e 100%), reduções no teor de AGLs das condições avaliadas para a enzima Lipozyme® RM IM foram observados. Existem vários relatos na literatura (You; Baharin, 2006; Reis et al., 2009) indicando que com um ligeiro aumento na quantidade de água do meio reacional da hidrólise, há o aumento na atividade enzimática, devido a formação de uma maior interface entre os substratos (óleo/água). Contudo, em um determinado ponto da reação, pode ocorrer a inibição da atividade enzimática devido alto teor de água deste meio (Mulinari et al., 2017). Raspe, Cardozo-Filho e Silva (2013) observaram este efeito no teor de produção de AGLs do óleo de macaúba utilizando como catalisador a enzima Lipozyme® RM IM, no qual ao aumentar a quantidade de água no meio de 50 a 100%, redução de ~10% no teor de AGLs foi observado. De tal modo, Mello, Rodrigues e Silva (2015) na produção de AGLs do óleo de crambe utilizando a enzima

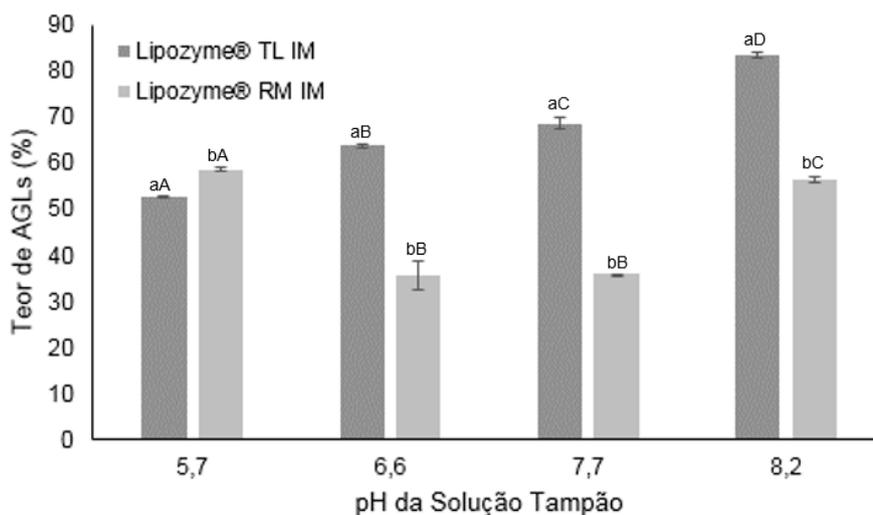
Lipozyme® TL IM como catalisador, constataram que o excesso de água no meio (50%) não apresentou efeito significativo sobre o teor de AGLs.

Outros estudos, porém, reportam que o incremento do teor de água afeta positivamente a taxa de hidrólise, conforme demonstra a Figura 2 para a enzima Lipozyme® TL IM. Alves et al. (2014) destacam que a água no processo de hidrólise enzimática é um fator importante na manutenção da atividade e estabilidade catalítica, uma vez que o excesso de óleo no meio promove a saturação dos sítios ativos, reduzindo a taxa de difusão dos substratos e produtos aos mesmos (Chua et al., 2012), comprometendo a eficiência do processo. Teores de AGLs de ~38% foram obtidos por Trentini, Raspe e Silva (2014) ao utilizarem 5% de água na hidrólise do óleo de macaúba, enquanto a 15% os teores foram superiores a 50%. Bressani et al. (2015) reportam que o aumento da porção aquosa no meio reacional de 20 a 40% durante a hidrólise do óleo de semente de mamona favoreceu a obtenção de AGLs utilizando 7% de extrato enzimático de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) de ~22% a 32% a 45 °C e 30 minutos de reação.

3.3 Influência do pH da solução tampão

A literatura reporta que o pH desempenha um papel importante na reação de hidrólise para obtenção de AGLs (Serri, Kamarudin e Rahaman, 2008; Jarjes, Mohammed e Sulaiman, 2012). O efeito do pH da solução tampão fosfato de sódio foi avaliado, na faixa de 5,7 a 8,2, nas reações de hidrólise enzimática do óleo de caroço de algodão. Este procedimento transcorreu durante 6 horas de reação, a temperatura de 55 °C, agitação de 400 rpm, percentual de catalisador enzimático Lipozyme® RM IM e Lipozyme® TL IM (em relação à massa dos substratos) de 5% e percentual de solução tampão de 50% (em relação à massa de óleo), onde os resultados apresentam-se na Figura 3.

Figura 3 – Influência do pH da solução tampão sob a hidrólise do óleo do caroço de algodão utilizando as enzimas Lipozyme® RM IM e Lipozyme® TL IM como catalisador.



Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (efeito do pH da solução tampão nos diferentes catalisadores) e maiúsculas (efeito do pH da solução tampão para cada catalisador) não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

Fonte: Os autores.

A Figura 3 mostra os resultados obtidos para os diferentes valores de pH avaliados, onde seu aumento ocasionou acréscimo da taxa de hidrólise dos triacilglicerídeos, reportando-se teor em AGLs na ordem de 53% a pH 5,7 e cerca de 85% a pH 8,2, para o catalisador enzimático Lipozyme® TL IM. Para o catalisador

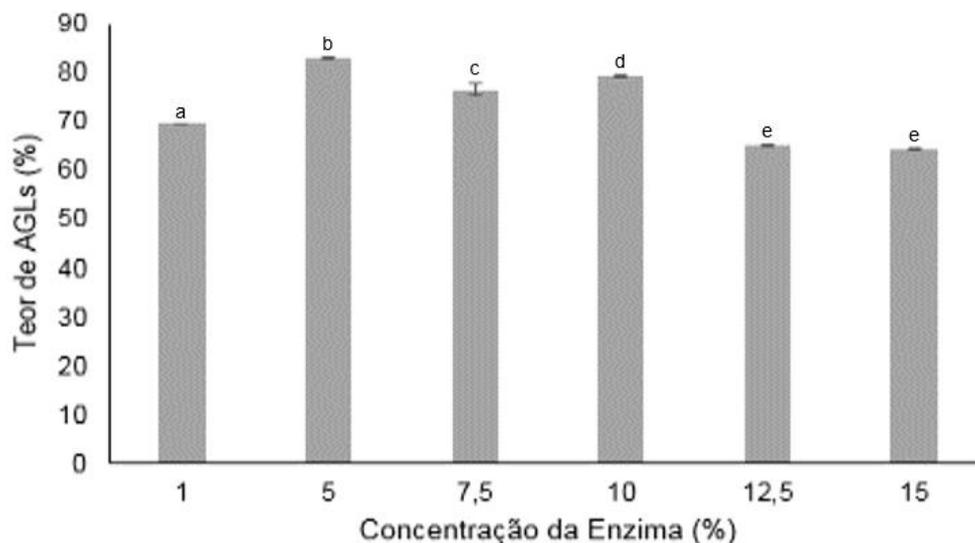
enzimático Lipozyme® RM IM, constatou-se decréscimo no teor no intervalo do pH de 5,7 (~58%), 6,6 (~35%) e 7,7 (~35%), e posterior aumento para o pH de 8,2 (~56%). Segundo Goswami e Basu (2009), este declínio na atividade enzimática da Lipozyme® RM IM, pode estar relacionado a uma possível reação reversível que envolveu a ionização ou deionização de grupos ácidos ou básicos do sítio ativo da proteína enzimática.

Comparando os resultados apresentados na Figura 3 com os da Figura 2, para a Lipozyme® TL IM verificou-se que a adição da solução tampão ao meio reacional aumentou o teor em AGLs de ~62% (na reação com a água) para ~83% sob pH 8,2, nas mesmas condições de reação. Khaskheli et al. (2015) reportam que o pH afeta a estabilidade, estrutura e função de muitas proteínas devido à sua capacidade de influenciar interações eletrostáticas, por este motivo a extensão da hidrólise ocorre de modo distinto mediante os diferentes valores de pH (Kulkarni; Pandit, 2005). Redução significativa no teor de ácido erúico foi obtido por Goswami, Basu e De (2012) ao aumentar o pH do meio reacional de 8,0 (33,21%) para 10,0 (9,67%), utilizando 25% de solução tampão (em relação à massa de óleo), 42 °C, 1,4% de catalisador lipase pancreática suína (em relação à massa de óleo). Raspe, Cardozo-Filho e Silva (2013) ao avaliarem o efeito do pH da solução tampão sob a produção de AGLs do óleo de macaúba, verificaram que a adição da solução tampão ao meio reacional aumentou o teor em AGLs de 58% (na reação com a água) para cerca de 67% a pH 8,0. Khaskheli et al. (2015) avaliando a hidrólise do óleo de mamona catalisada pela lipase *Rhizopus oryzae*, observaram aumento significativo no teor de AGLs, de ~54% à ~83%, ao aumentar o pH da solução tampão de 6,0 a 7,0, respectivamente.

3.4 Influência do percentual de catalisador

O efeito do percentual de catalisador Lipozyme® TL IM na reação de hidrólise foi avaliado considerando os valores de 1,0, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5 e 15% (em relação à massa de substratos), fixando-se o tempo de 6 horas, agitação de 400 rpm, temperatura em 55 °C e utilizando 50% de água (em relação à massa de óleo), conforme apresentado pela Figura 4.

Figura 4 – Influência da concentração da enzima Lipozyme® TL IM sob a hidrólise do óleo do caroço de algodão.



Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

Fonte: Os autores.

Ao analisar a Figura 4, pode-se constatar que o aumento do percentual de catalisador de 5,0% para 7,5, 10,0, 12,5 e 15,0% não ocasionou efeito significativo no teor de AGL, ou seja, obteve-se o maior percentual em AGLs (~83%) sob concentração menor (5,0%) de catalisador. A concentração da enzima tem um forte impacto sobre o processo catalítico, porém, seu excesso pode não influenciar positivamente no teor de AGLs devido à saturação da enzima na interface entre o óleo e a fase aquosa (Rooney; Weatherly, 2001).

Este efeito se confirma com dados reportados anteriormente, onde o aumento da concentração da enzima não forneceu quaisquer alterações significativas na taxa de reação (Mello, Rodrigues e Silva, 2015; Raizer et al., 2015; Tavares et al., 2018). Fazendo uso do mesmo catalisador enzimático avaliado neste trabalho, Mello, Rodrigues e Silva (2015) observam teores de AGLs do óleo de crambe na ordem de ~78%, usando concentração de 12,5% de Lipozyme® TL IM (em relação à massa dos substratos), enquanto ao aumentar este percentual à 15%, a taxa de hidrólise não sofreu aumento significativo. Raizer et al. (2015) ao avaliarem a produção de AGLs através da hidrólise enzimática do óleo de girassol, constataram diminuição no teor dos produtos de 38 à ~27%, ao aumentarem o conteúdo de catalisador de 1,0 a 3,0% (em relação à massa dos substratos) respectivamente, sob temperatura fixa de 30 °C. Avaliando o uso de sementes de mamona “in natura” como fonte catalítica para hidrólise de óleo de crambe, Tavares et al. (2018) observaram uma pequena redução no teor de AGLs produzidos, de ~83 a 81,5%, ao aumentar o percentual de catalisador de 0,25 a 0,46% (em relação à massa dos substratos), respectivamente. Neste trabalho, menores percentuais de catalisador (5%) promoveram um maior teor de AGLs (~83%).

Um número significativo de produtos de alto valor agregado requer AGLs em sua fabricação, dentre os quais destacam-se os surfactantes, óleos lubrificantes, produtos de higiene pessoal e o biodiesel (Farile et al., 2017). Para tanto, a exploração de oleaginosas e o emprego de rotas de processamento não-convencionais para obtenção desses compostos, alternativa trazida neste trabalho, contempla critérios tecnológicos promissores à promoção e manutenção da qualidade do meio ambiente. Isso porque, condições brandas de reação, alta seletividade do catalisador empregado, mediante um processo rápido e menos oneroso, que permite o uso de solventes renováveis e em condições de operação que não afetam a qualidade do produto obtido foram estabelecidas. Assim, o processo proposto configura-se como alternativa atrativa a ser utilizado para reduzir as limitações dos processos químicos, alinhando-se ao desenvolvimento de rotas alternativas de processamento que contemplem conceitos da química verde e de sustentabilidade. Embora essas investigações sejam precoces, seu aprimoramento é fator que deve ser considerado, possibilitando estreitamento às lacunas que configuram os desafios na ampliação do uso dessas tecnologias.

4. Conclusão

Neste trabalho, os efeitos das variáveis (percentual de água, pH, percentual de enzima) foram avaliadas e sua influência sob às reações de hidrólise do óleo de caroço de algodão foi analisado. Os melhores resultados (~83%) foram obtidos por meio do uso do catalisador enzimático Lipozyme® TL IM na concentração de 5% (em relação à massa dos substratos), 50% de solução tampão à pH 8,2 (em relação à massa de óleo), decorridas 6 horas de reação a 55 °C e 400 rpm. Os resultados obtidos demonstram que o processo proposto pode ser empregado para obtenção de apreciáveis níveis de ácidos graxos livres por meio do uso de baixa concentração de catalisador, para posterior utilização na etapa de esterificação, proporcionando contribuição na investigação do melhoramento do processo produção de biodiesel por meio de rotas e matérias-primas alternativas.

5. Agradecimentos

A Universidade Estadual de Maringá, Campus Umuarama, pela infraestrutura.

6. Referências

ABRAPA – Associação Brasileira dos Produtores de Algodão (2017). **A cadeia do Algodão Brasileiro - Safra 2016/2017: Desafios e Estratégias**. Brasília, Distrito Federal. Disponível em: <https://www.abrapa.com.br/BibliotecaInstitucional/A%20Cadeia%20do%20Algodao%20CC%83o%20Brasileiro%202016-2017.pdf>. Acesso em: 10/11/2021.

Alves, J. S., Vieira, N., Cunha, A. S., Silva, A. M., Ayub, M. A. Z., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R. C. (2014). Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. **The Royal Society of Chemistry**, 4, 6863-6868.

AOCS – American Oil Chemists' society (1998). **Official methods and recommended practices** (4a ed.). Champaign, 1998.

ANP – Associação Nacional do Petróleo (2020). **Percentual das matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/if/im-2020/processamento-materias-primas-2020.xlsx>. Acesso em: 10/11/2021.

ANP – Associação Nacional do Petróleo (2019). **Brazilian energy balance - year 2018**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/painel-dinamico-de-produtores-de-biodiesel>. Acesso em: 08/06/2022.

Batistella, L., Ustra, M. K., Richetti, A., Pergher, S. B. C., Treichel, H., Oliveira, J. V., Lerin, L., Oliveira, D. (2012). Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation. **Journal Bioprocess and Biosystems Engineering**, 35(3), 351-358.

Brasil. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 14 jan. 2005. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm. Acesso em: 08/06/2022.

Brennan, L., Owender, P. (2010). Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14(2), 557-577.

Bressani, A. P., Garcia, K. C. A., Hirata, D. B., Mendes, A. A. (2015). Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: optimization by response surface methodology. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 38(2), 287-297.

Cajamarca, F. A., Lancheros, A. F., Araújo, P. M., Mizubuti, L. Y., Simonelli, S. M., Ida, E. I., Guedes, C. L. B., Guimarães, M. F. (2018). Evaluation of various species of winter oleaginous plants for the production of biodiesel in the State of Parana, Brazil. **Industrial Crops and Products**, 126, 113-118.

Chua, L. S., Alitabarimansor, M., Lee, C. T., Mat, R. (2012). Hydrolysis of Virgin Coconut Oil Using Immobilized Lipase in a Batch Reactor. **Enzyme Research**, 2012, 1-5, 2012.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a Agropecuária – Safra 2018/2019**. ISSN 2318-3241, Brasília, Agosto, 6, 1-112.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2019). **Perspectivas para a Agropecuária, Safra 2019/2020**. ISSN 2318-3241, Brasília, Outubro, 7, 1-100.

Conceição, R. C., Frasso, C. V., Silva, S. M. C., Medeiros, J. L., Araújo, O. Q. F., Picardo, M. C. (2012). Caracterização composicional e Transesterificação de óleo de microalga: uma abordagem computacional. **Química Nova**, 35(7), 1336-1342.

Costa, M. J., Silva, M. R. L., Ferreira, E. E. A., Carvalho, A. K. F., Basso, R. C., Pereira, E. B., Castro, H. F., Mendes, A. A., Hirata, D. B. (2020). Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, 157, 108131.

Costa, M. W., Oliveira, A. A. M. (2022). Social life cycle assessment of feedstocks for biodiesel production in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 159, 112166, 2022.

Djomdi, Leku, M. T., Djoulde, D., Delattre, C., Michaud, P. (2020). Purification and Valorization of Waste Cotton Seed Oil as an Alternative Feedstock for Biodiesel Production. **Bioengineering**, 7(2), 41.

Doukyu, N., Ogino, H. (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, 48(3), 270-282.

Farile, J. M., Garcia, J. I., Ferreiros, C. I., Pires, E. (2017). Synthetic transformations for the valorization of fatty acid derivatives. **Synthesis**, 49, 1444-1460.

Fernandez, I. A. P., Liu, D. H., Zhao, J. (2017). LCA studies comparing alkaline and immobilized enzyme catalyst processes for biodiesel production under Brazilian conditions. **Resources, Conservation & Recycling**, 119, 117–127.

Freitas, M. C. M. (2011). A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera Centro Científico Conhecer**, 7(12), 1-12.

Gomori, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies, in methods in enzymology. **Academic Press Inc.:** New York, 1.

Goswami, D., Basu, J., De, S. (2009). Optimization of process variables in castor oil hydrolysis by *Candida rugosa* lipase with buffer as dispersion medium. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 14(2), 220-224.

Hájek, M., Vávra, A., Carmona, H. P., Kocík, J. (2021). The Catalysed Transformation of Vegetable Oils or Animal Fats to Biofuels and Bio-Lubricants: A Review. **Catalysts**, 11(9), 1118.

Jarjes, Z. A., Mohammed, R. S., Sulaiman, A. G. (2012). Bio-electrode in Mechanistic Study of Lipoyxygenase with Fatty Acids from Cooking Palm Oil. **The Open Electrochemistry Journal**, 4(1), 13-19.

Jiang, Y., Guo, C., Gao, H., Xia, H., Mahmood, I., Liu, C., Liu, H. (2012). Lipase Immobilization on Ionic

Liquid Modified Magnetic Nanoparticles: Ionic liquids Controlled Esters Hydrolysis at Oil–Water Interface. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, 58(4), 1203-1211.

Khaskheli, A. A., Talpur, F. N., Ashraf, M. A., Cebeci, A., Jawaid, S., Afridi, H. I. (2015). Monitoring the *Rhizopus oryzae* lipase catalyzed hydrolysis of castor oil by ATR-FTIR spectroscopy. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 113, 56-61.

Kulkarni, S. R., Pandit, A. B. (2005). Enzymatic hydrolysis of castor oil: An approach for rate enhancement and enzyme economy. **Indian Journal of Biotechnology**, 4(2), 241-245.

Lima, R. T., Alves, A. M., de Paula, A. V., de Castro, H. F., Andrade, G. S. S. (2019). Mycelium-bound lipase from *Penicillium citrinum* as biocatalyst for the hydrolysis of vegetable oils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 22, 101410.

Litinas, A., Geivanidis, S., Faliakis, A., Courouclis, Y., Samaras, Z., Keder, A., Krasnoholovets, V., Gandzha, I., Zabulonov, Y., Puhach, O., Dmytryuk, M. (2020). Biodiesel production from high FFA feedstocks with a novel chemical multifunctional process intensifier. **Biofuel Research Journal**, 26, 1170-1177.

Mahdavi, V., Monajemi, A. (2014). Optimization of operational conditions for biodiesel production from cottonseed oil on CaO–MgO/Al₂O₃ solid base catalysts. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 45(5), 2286-2292.

Malhotra, R., Ali, A. (2018). Lithium-doped ceria supported SBA–15 as mesoporous solid reusable and heterogeneous catalyst for biodiesel production via simultaneous esterification and transesterification of waste cottonseed oil. **Renewable Energy**, 119, 32-44.

Mello, B. T. F., Gonçalves, J. E., Rodrigues, G. M., Cardozo-Filho, L.; Silva, C. (2017). Hydroesterification of crambe oil (*Crambe abyssinica* H.) under pressurized conditions. **Industrial Crops and Products**, 97, 110-119.

Mello, B. T. F., Rodrigues, G. M., Silva, C. (2015). Hidrólise enzimática do óleo de crambe (*Crambe abyssinica* H.) assistida por ultrassom. **E-xacta**, 8(1), 77-85.

Mujeli, M., Kefas, H. M., Shitu, A., Ayuba, I. (2016). Optimization of Biodiesel Production from Crude Cotton Seed Oil Using Central Composite Design. **American Journal of Chemical and Biochemical Engineering**, 1(1), 8-14.

Mulinari, J., Venturin, B., Sbardelotto, M., Dall Agnol, A., Scapini, T., Camargo, A. F., Baldissarelli, D. P., Modkovski, T. A., Rossetto, V., Dalla Rosa, C., Reichert Jr, F. W., Golunski, S. M., Vieitez, I., Vargas, G. D. L. P., Dalla Rosa, C., Mossi, A. J., Treichel, H. (2017). Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by homemade lipases. **Ultrasonics Sonochemistry**, 35, 313-318.

Pradana, S. Y., Fauzi, A., Pratama, S. H., Sudiby, H. (2018). Simulation of biodiesel production using hydro-esterification process from wet microalgae. **MATEC Web of Conferences**, 154, 1-5.

Rashid, U., Hazmi, B. (2022). Advances in Production of Biodiesel from Vegetable Oils and Animal Fats.

Biodiesel Production: Feedstocks, Catalysts, and Technologies. Chapter 1. John Wiley & Sons Ltd.

Raspe, D. T., Cardozo-Filho, L., Silva, C. (2013). Effect of additives and process variables on enzymatic hydrolysis of macauba kernel oil (*Acrocomia aculeata*). **International Journal Chemical Engineering**, 2013, 1-8.

Raizer, E., Molinari, D., Reinehr, T. O., Fetsch, V. T., Awadallak, J. A., Silva, C., Silva, E. A. (2015). Produção de ácidos graxos livres através de hidrólise enzimática do óleo de girassol em ultrassom. **Revista Tecnológica**, 63-71.

Razzaq, L., Abbas, M. M., Miran, S., Asghar, S., Nawaz, S., Soudagar, M. E. M., Shaukat, N., Veza, I., Khalil, S., Abdelrahman, A., Kalam, M. A. (2022). Response Surface Methodology and Artificial Neural Networks-Based Yield Optimization of Biodiesel Sourced from Mixture of Palm and Cotton Seed Oil. **Sustainability**, 14(10), 6130.

Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 147-148, 237-250.

Rooney, D., Weatherly, L. R. (2001). The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. **Process Biochemistry**, 36(10), 947-953.

Rosset, D. V., Wancura, J. H. C., Ugalde, G. A., Oliveira, J. V., Tres, M. V., Kuhn, R. C., Jahn, S. L. (2019). Enzyme-Catalyzed Production of FAME by Hydroesterification of Soybean Oil Using the Novel Soluble Lipase NS 40116. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 188, 914-926.

Serri, N. A., Kamarudin, A. H., Rahaman, S. N. A. (2008). Preliminary Studies for Production of Fatty Acids from Hydrolysis of Cooking Palm Oil Using *C. rugosa* Lipase. **Journal of Physical Science**, 19(1), 79-88.

Sheldon, R. A., Woodley, J. M. (2018). Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, 118, 801-838.

Silva, C., Trentini, C. P. (2013). Produção de Ésteres de Ácidos Graxos a partir do Óleo de Caroço de Algodão em duas etapas reacionais. **Engevista**, 3, 235-242.

Souza, G. K., Scheufele, F. B., Pasa, T. L. B., Arroyo, P. A., Pereira, N. C. (2016). Synthesis of ethyl esters from crude macauba oil (*Acrocomia aculeata*) for biodiesel production. **Fuel**, 165, 360-366.

Tavares, G. R., Gonçalves, J. E., Santos, W. D., Silva, C. (2017). Enzymatic interesterification of crambe oil assisted by ultrasound. **Industrial Crops & Products**, 97, 218-223.

Tavares, F., Petry, J., Sackser, P. R., Borba, C. E., Silva, E. A. (2018). Use of castor bean seeds as lipase source for hydrolysis of crambe oil. **Industrial Crops & Products**, 124, 254-264.

Trentini, C. P., Raspe, D. T., Silva, C. (2014). Obtenção de ácidos graxos livres do óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) em sistema livre de solvente orgânico. **Semina**, 35(1), 15-24.

Vescovi, V., Rojas, M. J., Baraldo Jr, A., Botta, D. C., Santana, F. A. M., Costa, J. P., Machado, M. S.,

Honda, V. K., Giordano, R. L. C., Tardioli, P. W. (2016). Lipase Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 93(12), 1615-1624.

Zenevicz, M. C., Jacques, A., Oliveira, D., Furigo Jr, A., Valério, A., Oliveira, J. V. (2017). A two-step enzymatic strategy to produce ethyl esters using frying oil as substrate. **Industrial Crops and Products**, 108, 52-55.

Yesilyurt, K., Aydin, M. (2020). Experimental investigation on the performance, combustion and exhaust emission characteristics of a compression-ignition engine fueled with cottonseed oil biodiesel/diethyl ether/diesel fuel blends. **Energy Conversion and Management**, 205, 112355.

You, L. L., Baharin, B. S. (2006). Effects of enzymatic hydrolysis on crude palm olein by lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Food Lipids**, 13(1), 73-87.