

Obtenção de Ácidos Graxos Livres do Óleo de Macaúba (*Acrocomia Aculeata*) em Sistema Livre de Solvente Orgânico

Obtention of Free Fatty Acids of Macauba Oil (*Acrocomia Aculeata*) in Organic Solvent Free System

Caroline Portilho Trentini¹; Djéssica Tatiane Raspe²; Camila da Silva³

Resumo

O presente trabalho objetivou investigar a hidrólise enzimática do óleo de Macaúba, visando obter um hidrolisado rico em ácidos graxos livres (AGLs), para posterior utilização na etapa de esterificação. O efeito das variáveis do processo (percentual de catalisador, temperatura e teor de água), foi avaliado sob o rendimento em AGL, utilizando um planejamento experimental fatorial 2³, em que o efeito positivo e significativo das variáveis foi verificado. Os resultados relatam rendimentos de 50,5% em AGLs em 6 horas de reação, a 60°C, percentual de água de 15% (m/m) e percentual de catalisador de 5% (m/m).

Palavras-chave: Hidrólise. Macaúba. Ácidos graxos livres.

Abstract

The present study aimed to investigate the enzymatic hydrolysis of oil Macaúba, to obtain a hydrolyzate rich in free fatty acids (FFA) for later use in step esterification. The effect of process variables (percentage of catalyst, temperature and water content) was evaluated in the FFA yield, using a factorial experimental design 2³, where the positive and significant effect of the variables was observed. The results reported yields of 50.5% in FFA in 6 hours of reaction at 60°C, water percentage of 15 wt% and catalyst percentage of 5 wt%.

Key words: Hydrolysis. Macauba. Free fatty acids.

Introdução

O estudo de fontes alternativas e renováveis de energia tem se tornado necessário devido à possível escassez de combustíveis fósseis e problemas de ordem ambiental. Dentre os recursos renováveis disponíveis para produção de combustíveis alternativos, a modificação de óleos e gorduras

tem sido largamente investigada (SINGH; SINGH, 2010; FERELLA et al., 2010; KARMAKAR; KARKAMAR; MUKHERJEE 2010; HINCAPIÉ; MONDRAGON; LOPEZ 2011; BANKOVIC-LIIC; STAMENKOVIC; VEIJKOVIC, 2012). Entre os processos disponíveis para modificação destas oleaginosas, podemos destacar a

^{1,2} Mestrandas em Bioenergia, Universidade Estadual de Maringá; carol_trentini22@hotmail.com; djessicaraspe@hotmail.com;

³ Docente do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá; camiladasilva.eq@gmail.com

esterificação, transesterificação (BORGES; DIAZ, 2012) e hidrólise (HERMANSYAH et al., 2007; MENG et al., 2011; SATYARTHI; SRINIVAS; RATNASAMY, 2011; WANG et al., 2011).

Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de Janeiro de 2005 vigente no Brasil, 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” (Portal do Biodiesel - Brasil). O método de obtenção de biodiesel comumente empregado é o de transesterificação, que consiste na reação química de triglicerídeos com álcoois na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático) (MEHER; SAGAR; NAIK 2006; LEUNG; WU; LEUNG, 2010). A glicerina é um subproduto da reação, e deve ser purificada antes da venda para se aumentar a eficiência econômica do processo (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007).

O óleo de soja tem sido até o presente momento a oleaginosa mais empregada para a produção do biodiesel, por ser único óleo que está disponível em quantidade suficiente para fornecer um mercado nacional deste biocombustível (CANAKCI, 2007). No entanto, o custo do mesmo limita a sua utilização, uma vez que cerca de 75% das despesas de produção do biodiesel provém da matéria-prima (CANAKCI; SANLI, 2008; MENG et al., 2009), sendo necessária uma redução do custo da mesma para o biodiesel se tornar comercialmente viável.

A exploração e incentivo da utilização de demais substratos como fonte de óleo pode contribuir para complementar a demanda primária de biodiesel, visto que as principais fontes de óleo para a produção de biodiesel são de culturas alimentares (BRENNAN; OWENDER, 2010), merecendo o Brasil o posto de um dos maiores produtores de óleo de soja (CONAB) no mundo, o que estabelece um conflito entre as finalidades energéticas e alimentares no uso das terras aráveis (CONCEIÇÃO

et al., 2012). Visando com otimismo uma futura liderança mundial do país na produção de biodiesel, assim como a utilização de uma matriz oleaginosa sem fins alimentícios, o óleo do fruto da Macaúba (*Acrocomia aculeata*) destaca-se, devido ao grande potencial para produção, podendo ser de 1500 a 5000 Kg de óleo por hectare (MANFIO et al., 2011), comparativamente muito superior à produtividade exibida pela soja, cerca de 415 Kg de óleo por hectare (NUNES, 2007). A *Acrocomia aculeata* produz óleo de alta qualidade e é considerada uma matriz oleaginosa com grande potencial para a produção sustentável de biocombustíveis (ABREU et al., 2012).

Embora o processo convencional de produção de biodiesel possua bons rendimentos e tempo de reação, possui alguns inconvenientes, como a dificuldade de separar o catalisador do produto e do glicerol, a produção de água altamente alcalina e a necessidade de uma alta qualidade de matérias-primas (acidez inferior a 0,5%) (MEHER et al., 2006). A investigação de matérias-primas mais baratas representa uma estratégia associada à produção que tem sido utilizada para melhorar a viabilidade econômica do biodiesel. No entanto, a composição destas matérias primas pode exigir mudanças no processo e modificações das tecnologias já existentes para a produção de um biodiesel de boa qualidade.

Dentre as tecnologias disponíveis, a obtenção de ésteres de ácidos graxos em duas etapas reacionais para substratos com elevada acidez e umidade, que consiste na hidrólise dos triglicerídeos seguida da esterificação dos ácidos graxos obtidos tem se destacado recentemente (GAN et al., 2010; ROCHA et al., 2010; SOUSA et al., 2010; TALUKDER; WU; CHUA, 2010a; MENG et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011), principalmente sobre o processo de transesterificação convencional, uma vez que este gera inevitavelmente sabões na presença de ácidos graxos (DEMIRBAS, 2008; TING et al., 2008) inativando assim o catalisador, tornando a separação do biodiesel e glicerol dispendiosa

e afetando a produtividade do processo (MA; HANNA, 1999; FUKUDA; KOND; NODA; 2001; BARNWAL; SHARMA, 2005; AKON et al., 2007; RANGANATHAN; NARASHIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008; SOUSA et al., 2010).

A hidroesterificação permite o uso de qualquer matéria prima graxa (SOUSA et al., 2010), cujas quais são totalmente transformadas em biodiesel independente da acidez e da umidade que possuem. Este processo proporciona uma glicerina muito mais pura que a glicerina advinda da transesterificação, onde um significativo teor de sais, álcoois e outras impurezas encontram-se presente na glicerina. A reação de hidrólise acontece na fase orgânica por meio de três etapas consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos como intermediários, resultando em uma molécula de ácido graxo em cada etapa (SUAREZ et al., 2009). Após a hidrólise, os ácidos graxos gerados são então esterificados, obtendo-se os ésteres com elevada pureza (MENG et al., 2011; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011).

Neste estudo, o óleo de Macaúba foi hidrolisado por meio de um catalisador enzimático, rota escolhida por destacar-se sob os métodos convencionais e de altas temperaturas (JIANG et al., 2012). O efeito das variáveis foi analisado por meio da utilização da Lipozyme® RM IM, e as condições da reação otimizadas utilizando a metodologia de superfície de resposta, tendo por finalidade a obtenção de um hidrolisado rico em ácidos graxos livres para posterior utilização na etapa de esterificação.

Materiais e Métodos

Nas reações de hidrólise foram utilizados óleo de Macaúba (Cocal Brasil) e como catalisador a enzima Lipozyme® RM IM (Sigma-Aldrich), escolhida após etapa de seleção de catalisadores. Na etapa de titulação das amostras foram utilizados: solução de álcool etílico/éter etílico 2:1 (v:v) (Vetec/Nuclear),

hidróxido de sódio 0,1 N (Nuclear) e o indicador fenolftaleína (Nuclear). O efeito das variáveis do processo foi avaliado na conversão em AGL utilizando um planejamento experimental fatorial 2^3 conforme apresenta a Tabela 1.

Tabela 1 - Valores reais e codificados (- nível inferior, 0 intermediário, + nível superior) das variáveis independentes, 2^3 .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C) [T]	40	50	60
Teor de água (%) [A]	5	10	15
Enzima (%) [E]	1	3	5

Fonte: autores

As reações foram conduzidas em uma incubadora refrigerada (MA 839/A, Marconi) onde foram posicionados os Erlenmeyers (com ~7 gramas de meio reacional) a uma plataforma de movimento orbital com controle de temperatura e agitação. Decorrido o tempo de reação de 6 horas sob agitação de 250 rpm, as amostras foram centrifugadas à 3500 rpm por 15 minutos para remoção do glicerol formado, sendo que a eficiência da remoção foi comprovada utilizando o método EN 14105 (STANDARD UNE-EN, 2003). A água não reagida foi removida em um rota-evaporador a vácuo até peso constante. As amostras foram então acondicionadas em temperatura de refrigeração para posterior análise dos produtos de interesse. A determinação do rendimento em AGL foi realizada utilizando o método Ca 5a-40 (AOCS, 1998) e o cálculo do rendimento realizado conforme descrito na equação 1.

$$R(\%) = \frac{\text{Massa de AGL produzida}}{\text{Massa de TG inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: *R* é o rendimento, AGL denota o teor de ácidos graxos livres produzido nas amostras do meio reacional e TG o teor de triglicerídeos presente no óleo utilizado.

Resultados e Discussão

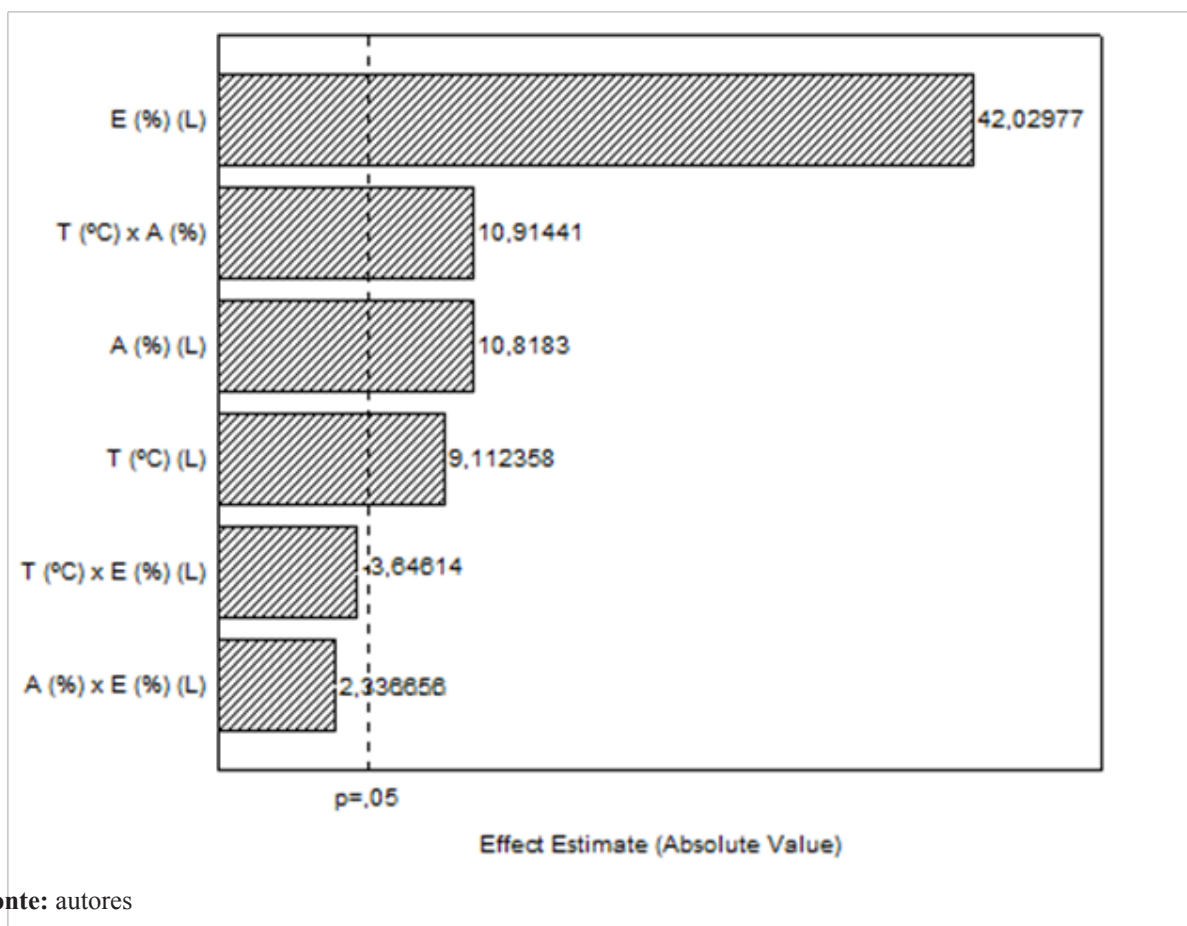
Os resultados experimentais de rendimento em AGLs para as reações realizadas estão apresentados na Tabela 2. Como apresentado na Tabela 2, as reações foram conduzidas por meio da variação da temperatura, teor de catalisador e percentual de água no meio reacional.

Tabela 2 - Planejamento experimental fatorial e resultados das reações de hidrólise.

Ensaio	T (°C)	A (%)	E (%)	Rendimento R (%)
1	-1	-1	-1	22,51 ± 0,12
2	-1	-1	+1	42,77 ± 0,20
3	-1	+1	-1	23,72 ± 0,03
4	-1	+1	+1	41,48 ± 0,05
5	+1	-1	-1	25,50 ± 0,12
6	+1	+1	-1	31,35 ± 0,09
7	+1	-1	+1	38,28 ± 0,23
8	+1	+1	+1	50,52 ± 0,10
9	0	0	0	37,20 ± 0,07
10	0	0	0	37,36 ± 0,12
11	0	0	0	38,29 ± 0,14

Fonte: autores

Figura 1 - Gráfico de Pareto com as variáveis experimentais significativas, onde E, corresponde ao percentual de enzima; T, temperatura; A, teor de água e L, efeito linear.



A Figura 1 apresenta os resultados obtidos por meio do planejamento proposto, onde todas as variáveis apresentaram um efeito positivo e significativo no estudo avaliado, sendo que a concentração de enzima apresentou efeito mais pronunciado. Dos ensaios realizados, o maior rendimento obtido (50,52%) correspondeu ao uso da temperatura de 60 °C, percentual de água de 15% e catalisador de 5%. Todas as interações entre as variáveis do processo apresentaram efeito positivo, sendo somente a interação da temperatura com o teor de água significativo ($p > 0,05$).

Os ensaios conduzidos em temperaturas inferiores a 60 °C reduziram a porcentagem de hidrólise do óleo de macaúba, devido ao aumento da viscosidade da emulsão pela aglomeração das gotas de óleo, favorecida com a redução da temperatura (McCLEMENTS; WEISS, 2005). Puderam ser observados maiores rendimentos ao utilizarem-se maiores quantidades de água no meio reacional, conforme verificado nos ensaios 7 e 8. A literatura reporta que estes resultados podem ser atribuídos à agregação de gotas de óleo para a formação de gotas maiores, o que reduz drasticamente a sua área superficial na interação óleo/água em meios com pouca água (McCLEMENTS e WEISS, 2005; SUN; GUNASEKARAN, 2009). Os ensaios 6 e 8 esboçam os resultados para os diferentes percentuais de catalisador sob um mesmo teor de água. Aumento na taxa de reação proporcionais ao aumento do teor de enzima também foram verificados no estudo de Freitas et al. (2007), You e Baharin (2006) e Meng et al. (2011).

Freitas et al. (2007) relatam que a um hidrolisado com 35% de AGLs foi obtido decorridas 24 horas, sob temperatura de 40 °C e agitação de 200 rpm. O percentual de catalisador relatada pelos autores variou de 1 a 3% (em relação à massa de óleo), onde o percentual de 3%, correspondeu ao maior rendimento obtido. You e Baharin (2006) avaliaram o efeito da concentração da enzima em função do rendimento de oleína de palma na hidrólise catalisada pela *Candida rugosa*, sendo verificado que

a produção de AGLs teve aumento com o aumento da concentração de enzima, especialmente de 0,5 a 1%. Efeito semelhante foi observado por Meng et al. (2011) para a hidrólise do óleo de soja com *Yarrowia lipolytica* (imobilizada), a qual foi avaliada sob concentrações de 25 a 100 U_w g⁻¹ de óleo, sendo relatados rendimentos de aproximadamente 90% para a maior quantidade de enzima.

Diferentes estratégias são empregadas para evitar a agregação das gotas de óleo na interface óleo/água, tais como a adição de agentes emulsificantes, poliois, proteínas e sais (MOREAU et al., 2003; McCLEMENTS e WEISS, 2005; LET et al., 2007; SERRI; KAMARUDIN; ABDUL 2008; TALUKDER et al., 2010b; SHARMA et al., 2013). (RATHOD; PANDIT, 2009), realizando a hidrólise do óleo de mamona visando otimizar as variáveis do processo, obtiveram 36,78% de AGLs por meio da razão molar óleo:água de 1:3, adição de 5 mL de solução enzimática de *Aspergillus oryzae* com concentração de 1% (em relação à massa de óleo) feita com uma solução tampão de fosfato de sódio (0,2 M) à pH 7,0, 1 mL de solvente iso-octano e temperatura de 35-40 °C por uma hora. Goswami, Basu e De (2012), visando maximizar a produção de ácido erúxico por hidrólise do óleo de mostarda com lipase pancreática suína, obtiveram cerca de 95,5% de AGLs após 6 horas de reação por meio da combinação das variáveis temperatura de 24,2 °C, pH de 8,7, concentração de enzima de 2,71 mg/g de óleo e de 1,25 g de tampão por grama de óleo.

No entanto, neste estudo as reações foram conduzidas sem a adição destes compostos, requerendo elevada concentração de água, para formar maior área superficial entre os substratos; maior temperatura, visando o decréscimo da viscosidade da emulsão; e maior percentual de catalisador, fornecendo rendimentos maiores em menores tempos de reação. Embora o melhor rendimento tenha sido obtido perante as maiores quantidades dos substratos avaliados, este estudo destaca-se por estar isento de quaisquer aditivos para o melhoramento reacional.

Os resultados obtidos pelo delineamento experimental foram analisados estatisticamente, permitindo assim o desenvolvimento de um modelo codificado do rendimento em AGLs em função da concentração de água e enzima. O modelo resultante foi validado pela análise de variância, onde o R^2 e o teste de F para regressão (valor calculado), mostraram que o modelo (Equação 2) foi capaz de representar bem os dados experimentais do rendimento em AGLs na gama de fatores estudados, permitindo a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 2. Uma análise desta figura permite concluir que os rendimentos mais elevados são obtidos com os níveis mais elevados de concentração de água e enzima, dentro do intervalo estudado. Como pode ser observado a partir da Equação 2, a concentração de água e enzima apresentaram efeito positivo significativo ($p > 0,05$), bem como a interação entre elas sobre o rendimento de AGLs.

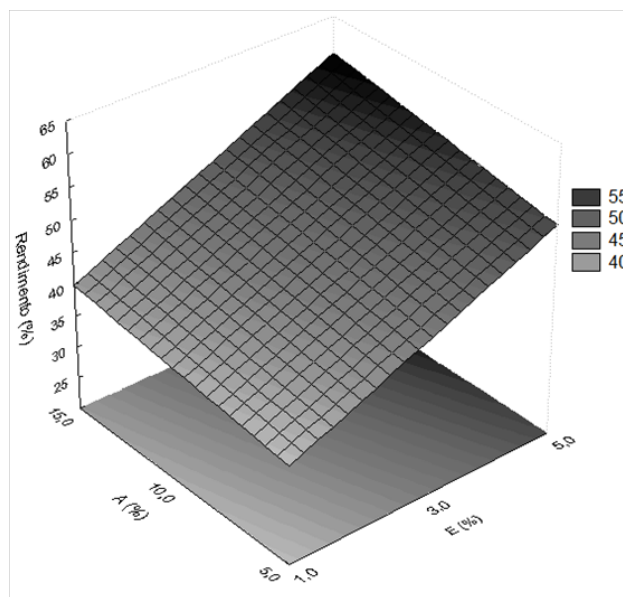
$$R (\%) = 35,36 + 2,25 A + 8,74 E + 0,48 A \times E \quad (2)$$

Onde A corresponde à concentração de água e E à concentração de enzima.

Cavalcanti-Oliveira et al. (2011) obtiveram aproximadamente 58% de AGLs, utilizando 62% óleo de soja e 2,3% de lipase *Thermomyces Lannuginosus* (TL 100L), 37% de solução tampão de fosfato (10M), pH 8,0 a uma temperatura de 60 °C em 5 horas de reação. Rodrigues e Ayub (2011), realizaram reação de hidrólise com óleo de soja obtendo um rendimento de aproximadamente 35%, sob razão molar óleo:água de 1:3 e 25% de Lipozyme® RM IM em relação a massa de óleo, 30 °C em 10 horas a 200 rpm. Liu et al. (2008) obtiveram rendimento de 77% de AGLs com o óleo de soja em meio livre de solvente orgânico, razão mássica água:óleo de 1:2,5 e 0,55% de lipase *Candida Lipolytica* em uma solução tampão de pH 7,7 a 45 °C por 12 horas de reação a 150 rpm. Ribeiro, Coelho e Barreto, (2012) utilizaram

óleo de buriti, obtendo 73% de AGLs, razão molar óleo:água de 1:2,33 e 0,47g de Lipozyme® TL IM a 31 °C em 4 horas de reação com agitação de 300 rpm.

Figura 2 - Superfície de resposta para a produção de AGLs em função da concentração de água e enzima. As condições experimentais e os dados então apresentados na Tabela 1.



Fonte: autores

Conclusão

Neste trabalho foi verificado o efeito de diferentes condições operacionais no rendimento da hidrólise do óleo de Macaúba. Para tal, obtiveram-se rendimentos de 50,5% de triglicerídeos em AGL em 6 horas de reação, a 60 °C, percentual de água de 15% (m/m), e percentual de catalisador de 5% (m/m).

Agradecimentos

Os autores agradecem à LNF Latino Americana pela doação das enzimas, à Fundação Araucária pelo suporte financeiro e à UEM – Campus Umuarama pela infraestrutura.

Referências

- ABREU, A. G.; PRIOLLI, R. H. G.; AZEVEDO-FILHO, J. A.; NUCCI, S. M.; ZUCCHI, M. I.; COELHO, R. M.; COLOMBO, C. A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 35, n. 1, p. 116-121, 2012.
- AKON, C. C.; CHANG, S. W.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 8995-9005, 2007.
- AOCS, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices. *Champaign*, v. 2, 1998.
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólico. *Revista Analytica*, n. 26, p. 56-62, 2007.
- BANKOVIC-LLIC, I. B.; STAMENKOVIC, O. S.; VELJKOVIC, V. B. Biodiesel production from non-edible plant oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 6, p. 3621-3647, 2012.
- BARNWAL, B. K.; SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 9, n. 4, p. 363-378, 2005.
- BORGES, M. E.; DÍAZ, L. Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 5, p. 2839-2849, 2012.
- BRENNAN, L.; OWENDER, P. Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557-577, 2010.
- CANAKCI, M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 1, p. 183-190, 2007.
- CANAKCI, M.; SANLI, H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 431-441, 2008.
- CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. A.; DA SILVA, P. R.; RAMOS, A. P.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. *Research Article*, v. 2011, n. 1, p. 1-8, 2011.
- CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento. www.conab.com.br. Acesso em Abril de 2013.
- CONCEIÇÃO, R. C.; FRASÃO, C. V.; SILVA, S. M. C.; MEREIROS, J. L.; ARAÚJO, O. Q. F.; PICARDO, M. C. Caracterização composicional e Transesterificação de óleo de microalga: uma abordagem computacional. *Química Nova*, v. 35, n. 7, p. 1336-1342, 2012.
- DEMIRBAS, A. Studies on cottonseed oil biodiesel prepared in non-catalytic SCF conditions. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1125-1130, 2008.
- FERELLA, F.; DI CELSO, G. M.; DE MICHELIS, I.; STANISCI, V.; VEGLIO, F. Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production. *Fuel*, v. 89, n. 1, p. 36-42, 2010.
- FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ V. H.; SANTOS, J.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 1725-1731, 2007.
- FUKUDA, H.; KOND, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Journal of Bioscience And Bioengineering*, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.
- GAN, S.; NG, H. K.; OOI, C. W.; MOTALA, N. O.; ANAS, M.; ISMAIL, F. Ferric sulphate catalysed esterification of free fatty acids in waste cooking oil. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 7338-7343, 2010.

- GOSWAMI, D.; BASU, J. K.; DE, S. Optimal hydrolysis of mustard oil to erucic acid: A biocatalytic approach. *Chemical Engineering Journal*, v. 181–182, p. 542–548, 2012.
- HERMANSYAH, H.; WIJANARKO, A.; DIANURSANTI, M.; GOZAN, P. P. D. K.; WULAN, R.; ARBIANTI, R. W.; SOEMANTOJO, T. S.; YULIUSMAN, M.; KUBO, N.; SHIBASAKI-KITAKAWA, YONEMOTO, T. Kinetic model for triglyceride hydrolysis using lipase: review. *Makara Teknologi*, v. 11, n. 1, p. 30-35, 2007.
- HINCAPIÉ, G.; MONDRAGON, F.; LOPEZ, D. Conventional and *in situ* transesterification of castor seed oil for biodiesel production. *Fuel*, v. 90, n. 4, p. 1618-1623, 2011.
- JIANG, Y.; GUO, C.; GAO, H.; XIA, H.; MAHMOOD, I.; LIU, C.; LIU, H. Lipase Immobilization on Ionic Liquid-Modified Magnetic Nanoparticles: Ionic liquids Controlled Esters Hydrolysis at Oil–Water Interface. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, v. 58, n. 4, p. 1203-1211, 2012.
- KARMAKAR, A.; KARKAMAR, S.; MUKHERJEE, S. Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 19, p. 7201-7210, 2010.
- LET, M. B.; JACOBSEN, C.; SORENSEN, A. D.; MEYER, A. S. Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 5, p. 1773-1780, 2007.
- LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, v. 87, p. 1083–1095, 2010.
- LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 15, p. 402–407, 2008.
- MA, F.; HANNA, M. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 1-15, 1999.
- MANFIO, C. E.; MOTOIKE, S. Y.; SANTOS, C. E. M.; PIMENTEL, L. D.; QUEIROZ, V.; SATO, A. Y. Repetibilidade em características biométricas do fruto de macaúba. *Ciência Rural*, v. 41, n. 1, p. 70-76, 2011.
- McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Bailey's industrial oil and fat products. Shahidi, F., ed.; *John Wiley & Sons Inc.*: New York, cap. 14, 2005.
- MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: A review, *Renewable and Sustainable Energy*, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2006.
- MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q. J.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganism. *Renewable energy*, v. 34, p. 1–5, 2009.
- MENG, Y.; WANG, G.; ZHOU, Z.; LI, Y.; LIANG, X.; CHEN, J.; LI, Y.; LI, J. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4, p. 1-9, 2011.
- MOREAU, L.; KIM, H. J.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 6612-6617, 2003.
- NUNES, S. P. Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil. *Boletim Eletrônico do Departamento de Estudos Sócio-Econômicos Rurais*, n. 159, p. 1-10, 2007.
- PORTAL BIODIESEL BRASIL. www.biodieselbr.com.br. Acesso em Dezembro de 2012.
- RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

- RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 47, p. 93–99, 2009.
- RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z.; BARRETO, D. W. Production of concentrated natural beta-carotene from buriti (*Mauritia vinifera*) oil by enzymatic hydrolysis. *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, p. 141–147, 2012.
- ROCHA, L. L. L.; RAMOS, A. L. D.; FILHO, N. R. A.; FURTADO, N. C.; TAFT, C. A.; ARANDA, D. A. G. Production of Biodiesel by a Two-Step Niobium Oxide Catalyzed Hydrolysis and Esterification. *Letters in Organic Chemistry*, v. 7, p. 571-578, 2010.
- RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 682–688, 2011.
- SATYARTHI, J. K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts. *Applied Catalysis A: General*, v. 391, n. 1-2, p. 427-435, 2011.
- SERRI, N. A.; KAMARUDIN, A. H.; ABDUL RAHAMAN, S. N. Preliminary Studies for Production of Fatty Acids from Hydrolysis of Cooking Palm Oil Using *C. rugosa* Lipase. *Journal of Physical Science*, v. 19, n. 1, p. 79–88, 2008.
- SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 200-216, 2010.
- SHARMA, A. C.; SATYENDRA, P.; CHAURASIAB, A.; DALAI, K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. *Catalysis Today*, v. 207, p. 93-100, 2013.
- SOUSA, J. S.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. A.; ARANDAB, D. A. G., FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 65, p. 133–137, 2010.
- SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES E MELQUIZEDEQUE, J. P.; ALVES, B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.
- SUN, C.; GUNASEHARAN, S. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, v. 23, n. 1, p. 165-174, 2009.
- STANDARD UNE-EN 14105. *Determinación de los contenidos de glicerol libre y total y de mono-, di-, e triglicéridos*. Madrid: Asociación Española de Normalización y Certificación, 2003.
- TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P. L. Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification. *Energy Fuels*, v. 24, p. 2016–2019, 2010a.
- 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, 2010b.
- TING, W. J.; HUANG, C. M.; GIRIGHAR, N.; WU, W. T. An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v. 39, n. 3, p. 203-210, 2008.
- YOU, L. L.; BAHARIN, B. S. Effects of enzymatic hydrolysis on crude palm olein by lipase from *candida rugosa*. *Journal of Food Lipids*, v. 13, p. 73–87, 2006.

WANG, C.; ZHOU, X.; ZHANG, W.; CHEN, Y.; YIN, A. Z. F.; LI, J.; XU, R.; LIU, S. Study on Preparing Fatty Acids by Lipase Hydrolysis Waste Oil from Restaurants. *IEEEExplore*, v. 978, n. 1, p. 4244-4246, 2011.

Recebido em 8 Junho 2013- Received on June 8, 2013.

Aceito em 17 Novembro, 2013 - Accepted on November 17, 2013.