

**Produção de Hidrolisado do Óleo de Macaúba
(*Acrocomia aculeata*) com Adição de Solvente Orgânico
ao Meio Reacional**

**Production of Hydrolyzed from Macauba Oil (*Acrocomia
aculeata*) with Addition of Organic Solvent to Reaction
Medium**

Djéssica Tatiane Raspe

Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá, PR

djessicaraspe@hotmail.com

Camila da Silva

Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá, PR

camiladasilva.eq@gmail.com

Resumo: A modificação de óleos e gorduras em produtos de alto valor agregado, como ácidos graxos livres (AGL) e derivados, tem sido de grande interesse comercial na atualidade. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do processo de obtenção de ácidos graxos livres (AGLs) a partir da reação de hidrólise do óleo de macaúba, utilizando, como catalisador, a enzima Lipozyme® RM IM com adição de solventes orgânicos ao meio reacional e análise das variáveis de processo. Dentre os solventes e razões mássicas avaliadas, o n-hexano apresentou melhor desempenho, atingindo, em razão mássica óleo:solvente 1:1, 50% de solução tampão, 55 °C, 5% de enzima, e 6 horas de reação, ~73% de rendimento em AGL foi obtido. O efeito das variáveis do processo (percentual de catalisador, temperatura e percentual de solução tampão), foi avaliado sob o rendimento em AGL, utilizando um planejamento experimental fatorial, no qual o efeito positivo das variáveis foi reportado, sendo significativos os percentuais de solução tampão e de catalisador.

Palavras-chave: AGL; catálise enzimática; hidrólise; planejamento experimental; solventes.

Recebido em 13/08/2013 - Aceito em 18/04/2014.

RECEN 15(2) p. 239-254 jul/dez 2013 DOI: 10.5935/RECEN.2013.02.05

Abstract: Modification of oils and fats in products with high added value, such as free fatty acids (FFA) and derivatives, has been of great commercial interest today. In this context, the study aimed to evaluate the process of obtaining free fatty acids (FFAs) from the reaction of hydrolysis of macauba oil, using as catalyst Lipozyme® RM IM with addition of organic solvents to the reaction medium and analysis of process variables. Among the solvents and mass ratios evaluated, n-hexane showed better performance, achieving in solvent to oil mass ratio of 1:1, 50% buffer solution, 55 °C, 5% of enzyme, and 6 hours of reaction, ~73% in FFA was obtained. The effect of process variables (percentage of catalyst, temperature and percentage of buffer), was evaluated according to the performance in FFA, using a factorial design, where the positive effect of the variables was reported, with significant percentages of buffer and catalyst.

Key words: enzymatic catalysis; experimental design; FFA; hydrolysis; solvents.

1 Introdução

Atualmente, a modificação de óleos e gorduras em produtos de alto valor agregado, como ácidos graxos livres (AGL) e derivados, tem sido de grande interesse comercial, atuando como componentes essenciais na indústria oleoquímica [1]. Um número significativo de produtos requerem ácidos graxos para sua fabricação, sendo usados amplamente pela indústria para a produção de sabões, detergentes e produtos para a indústria de alimentos [2]. Especialmente para esta, os produtos intermediários da reação de produção de AGL, como os monoacilgliceróis (MAG), equivalem a 70% dos emulsificantes utilizados. Além dos MAG, os diacilgliceróis (DAG) apresentam aplicação como emulsificantes não iônicos e agentes texturizadores [3].

Dentre as diversas plantas capazes de produzir ácidos graxos livres, as palmas são consideradas as espécies mais promissoras. A *Acrocomia aculeata* é altamente produtiva e seus frutos podem gerar mais de 5.000 kg de óleo por hectare [4], o qual pode ser utilizado em alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e biodiesel. Além disso, uma quantidade significativa de um carvão vegetal de alta qualidade pode ser produ-

zida a partir de seu endocarpo. O mesocarpo é um alimento rico em fibras, óleo e proteína [5]. No entanto, as plantações de macaúba no Brasil e em muitos lugares do mundo, ainda estão em fase preliminar, uma vez que sua exploração comercial depende do desenvolvimento de tecnologias avançadas [6].

Buscando-se obter um produto que alie os atributos qualitativos e de composição dos ácidos graxos do óleo de macaúba, têm sido realizados estudos objetivando-se sua modificação [7 - 11]. Deve-se destacar que a rota enzimática possui vantagens se comparada à química, tais como a regioespecificidade que permite maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, além de empregar condições brandas de reação [12, 13]. Nos últimos anos, diferentes técnicas foram aperfeiçoadas e desenvolvidas para estudo e otimização de processos envolvendo a catálise enzimática [14], tendo como exemplos a imobilização da enzima, modificação do substrato, mapeamento do sítio ativo e estudo da adição e variação do solvente [14]. Destas, a técnica que utiliza o estudo da variação do solvente é a que apresenta menor custo, maior flexibilidade e velocidade na execução [15].

O processo de hidrólise enzimática necessita, basicamente, de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima adsorvida, acarretando velocidades de hidrólise mais elevadas [16]. A utilização de solventes orgânicos, como meios de reação para as reações enzimáticas, proporciona vantagens atraentes industrialmente em comparação com os sistemas tradicionais, tais como aumento da solubilidade dos substratos, reversão do equilíbrio termodinâmico, supressão das reações dependentes de água e eliminação de contaminação microbiana. No entanto, algumas desvantagens podem ser citadas, com inativação de enzimas, custo elevado do solvente, limitações na transferência de massa no caso dos sistemas heterogêneos ou em sistemas com solventes/substratos que apresentem elevada viscosidade [17, 18].

Estudos prévios têm abordado que o aumento da eficiência da reação de hidrólise está associada à adição de solventes orgânicos ao meio reacional [19 - 23], os quais auxiliam no aumento da taxa de reação. Em todos os sistemas biocatalíticos contendo solventes, a atividade catalítica e a estabilidade da enzima são influenciadas pela natu-

reza desses solventes. A polaridade do solvente é extremamente importante. Sendo assim, uma maior solvatação ou interação do solvente com o sítio ativo da enzima poderá levar a uma redução de sua atividade catalítica [24]. Dos parâmetros apontados, o que apresenta uma melhor correlação entre a atividade enzimática e a polaridade do solvente é o log P, denominado coeficiente de partição [25].

Dentro do contexto descrito, este trabalho tem por objetivo a seleção de solventes orgânicos para condução da reação de hidrólise enzimática do óleo de macaúba, bem como avaliar o efeito das variáveis de processo (percentual de catalisador, temperatura e percentual de solução tampão) na obtenção de AGLs em meio com solvente orgânico.

2 Materiais e métodos

Nas reações de hidrólise foram utilizados óleo de Macaúba (Cocal Brasil), solução tampão fosfato de sódio (Neon), preparada conforme reportado por Gomori [26] e como catalisador, a enzima Lipozyme® *Rhizomucor miehei* (Sigma-Aldrich). A composição química do óleo de macaúba apresenta-se na tabela 1. O teor de AGL (mg AGL/100 mg) e o teor de água no óleo (% em peso, método de titulação de Karl Fischer, a DL 50, Mettler-Toledo) foram determinados como sendo de aproximadamente $23,0 \pm 0,4$ e $0,7 \pm 0,05$, respectivamente.

Tabela 1. Composição química do óleo de macaúba.

Ácido Graxo	Percentual (%)
Láurico (C12:0)	$0,02 \pm 0,00$
Mirítico (C14:0)	$0,12 \pm 0,01$
Palmítico (C16:0)	$11,07 \pm 0,22$
Palmitoléico (C16:1n-7)	$1,50 \pm 0,03$
Estearico (C18:0)	$3,46 \pm 0,03$
Oleico (C18:1n9)	$19,74 \pm 0,07$
cis-vacênico (C18:1n-7)	$0,75 \pm 0,00$
Linoléico (C18:2n-6)	$62,33 \pm 0,15$
Linolênico (C18:3n-3)	$0,33 \pm 0,01$
Araquídico (C20:0)	$0,35 \pm 0,00$
Eicosadienoico (C20:2n-6)	$0,27 \pm 0,00$

O efeito da adição dos solventes *n*-hexano (Nuclear), *n*-heptano (Nuclear), isopropanol (Fmaia), terc-butanol (Sigma-Aldrich) foram avaliados em relação à massa de óleo. Os dados foram submetidos à ANOVA, teste de Tukey e teste de Dunnett ($p > 0,05$), por meio do software Microsoft Excel®. Na etapa de titulação das amostras foram utilizados: solução de éter etílico/álcool 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 conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Valores reais e codificados (-1, 0, +1) das variáveis independentes.

Variáveis	-1	0	+1
Temperatura (°C) [T]	35	45	55
Solução Tampão (%) [ST]	10	30	50
Enzima (%) [E]	5	7,5	10

As reações foram conduzidas em um reator encamisado de vidro de 40 mL, conectado a um banho termostatizado com controle da temperatura (Marconi) e uma chapa de agitação magnética (Marconi, MA 085). A obtenção das amostras do meio reacional foi realizada nos seguintes passos: primeiramente a enzima era colocada em estufa a 40 °C/1 h para ativação. Após, adicionaram-se ao reator, o óleo de macaúba e a solução tampão, no volume total de 12 mL, os aditivos em suas quantidades específicas e a enzima. Ao final do tempo da reação, todo o meio reacional foi recolhido e filtrado a vácuo. As enzimas, posteriormente, passaram por sucessivas lavagens com *n*-heptano [27], sendo então acondicionadas em condensador à vácuo para secagem completa e posterior armazenamento. As amostras foram, então, transferidas para frascos de amostragem e levadas à estufa a vácuo (80 °C) até peso constante, para eliminação dos resíduos do solvente. Por fim, foram acondicionadas em temperatura de refrigeração para posterior análise dos produtos de interesse. O teor de AGL nas amostras foi determinado em duplicata utilizando o método Ca 5a-40 [28], e o rendimento calculado 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 os ácidos graxos livres produzidos e TG, os triglicerídeos.

3 Resultados e discussões

3.1 Efeito da adição de diferentes solventes

A seleção do solvente orgânico é um fator importante em reações mediadas sob a catálise enzimática, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima [15]. Dentro do exposto, realizou-se a definição do solvente orgânico a ser utilizado na condução da reação de hidrólise do óleo de macaúba previamente à avaliação das variáveis do processo, sendo selecionados para análise, perante o rendimento da reação, o *n*-hexano, *n*-heptano, isopropanol e terc-butanol.

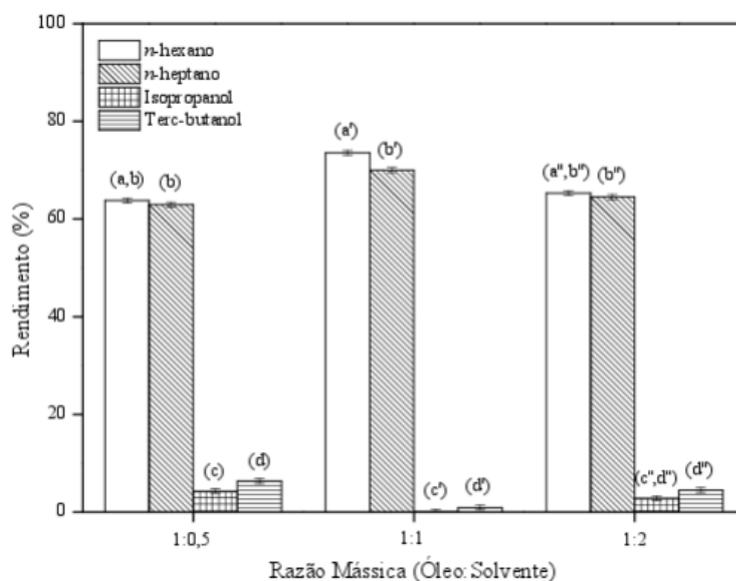


Figura 1. Efeito da adição de diferentes razões mássicas de solventes na hidrólise do óleo da amêndoa de macaúba a 55 °C, 400 rpm, 50% de solução tampão à pH 8,0, percentual de catalisador de 5% (em relação à massa dos substratos) e 6 horas de reação. Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

A figura 1 apresenta o resultado médio das duplicatas dessa análise, na qual as reações foram conduzidas a 55 °C, percentual de catalisador em relação aos substratos de 5% e percentual de solução tampão de 50% em relação à massa de óleo. De acordo com a figura 1, dentre os solventes avaliados, *n*-hexano e *n*-heptano levaram a um aumento no rendimento em ácidos graxos livres, estatisticamente significativos ($p > 0,05$) quando comparados à reação conduzida sem adição de quaisquer solventes, que resultou em um rendimento de ~66%, e às reações conduzidas com o isopropanol e terc-butanol, que levaram à redução da hidrólise.

Conforme visto na figura 1, diferentes razões mássicas de solvente em relação à massa de óleo foram adicionados à reação, a fim de observar o efeito da concentração de solvente na hidrólise. Pôde-se verificar que a síntese de AGLs foi significativamente influenciada pela adição de solventes orgânicos ao meio reacional, principalmente à razão mássica de 1:1. O solvente *n*-hexano apresentou maiores rendimentos em todas as concentrações avaliadas, seguido pelo *n*-heptano, terc-butanol e isopropanol. As razões mássicas de 1:0,5 e 1:2 (óleo:solvente) não apresentaram rendimentos significativamente ($p > 0,05$) superiores quanto correlacionadas. A presença de solvente *n*-hexano no sistema pôde melhorar a solubilidade dos substratos no meio reacional, em razão mássica de 1:1, resultando em elevada taxa de reação e, conseqüentemente, maiores rendimentos.

Selecionar um solvente orgânico apropriado é um fator crucial na catálise enzimática, devido à interferência direta deste sobre a atividade, estabilidade e especificidade da enzima. Em geral, os solventes hidrofóbicos, como o isooctano, *n*-heptano, éter de petróleo, *n*-hexano e ciclo-hexano [29], são menos prejudiciais para as enzimas, já que possuem a água necessária para manter a estrutura do catalisador. Solventes hidrofílicos tendem a retirar a água essencial da estrutura da proteína, conduzindo à perda da atividade enzimática [30, 31]. As enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos, requerem substancialmente uma menor quantidade de água para manutenção de sua atividade em comparação às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos [15]. Tal fato pode ser verificado por meio dos resultados apresentados na figura 1. Neste trabalho, os solventes *n*-hexano e *n*-heptano resultaram em rendimentos mensuráveis devido sua hidrofobicidade [32], enquanto que o emprego dos solventes terc-butanol

[33] e isopropanol [34] apresentaram seu respectivo desempenho hidrofílico.

Tem sido relatado que a atividade das enzimas mostra-se mais eficiente na presença de diferentes solventes orgânicos, possivelmente devido à dissolução dos lipídios, uma vez que se faz necessário um solvente orgânico que possa dissolver consideravelmente o substrato, favorecendo o progresso da reação, sem afetar a atividade enzimática [18]. Solventes como o isooctano [20, 36] e hexano [37, 38] foram utilizados com sucesso em reações enzimáticas que obtiveram elevados rendimentos em AGL. Battistella et al [18] investigaram a estabilidade e a atividade catalítica da Lipozyme® RM IM e Novozyme® 435 na presença de diferentes solventes orgânicos em um sistema assistido por ultrassom, onde constataram o aumento da atividade enzimática da Lipozyme® RM IM quando em contato com os solventes *n*-hexano e isooctano.

Rathod & Pandit [39] avaliaram o efeito de vários solventes (metanol, *n*-hexano, acetona e isooctano) na produção de AGLs do óleo de mamona pela lipase *Aspergillus oryzae*, onde, exceto com o solvente isooctano, todos os outros solventes utilizados inibiram a atividade da lipase. A hidrólise do Tetrahydrofurfuril butirato em *n*-heptano foi realizada por Yadav & Devi [40] em um sistema trifásico, utilizando quantidades estequiométricas de água e Novozyme® 435 como catalisador. Após 5,5 horas, 46% de rendimento foi reportado em 30 °C e agitação a 350 rpm. Por outro lado, cabe ressaltar que a inibição da atividade da enzima na presença de solventes, ocorre devido a uma diminuição da camada de hidratação presente perto do local ativo da enzima, o que ocasiona diminuição no desempenho de suas atividades [41]. Entretanto, até o momento, não há um princípio para orientar a seleção do solvente orgânico para os processos enzimáticos em particular. O único critério é o grau de compatibilidade do solvente com a manutenção da atividade da enzima e de sua estabilidade [42].

3.2 Efeito das variáveis de processo na hidrólise com adição de *n*-hexano como solvente

Visando avaliar o efeito das variáveis de processo no rendimento em AGL com adição de *n*-hexano, conduziram-se reações nas condições apresentadas na tabela 2, cujos resultados são apresentados na tabela 3 e o efeito das variáveis sobre o rendi-

mento em AGLs ($p > 0,05$) é apresentado na figura 2.

Tabela 3. Planejamento experimental fatorial e resultados das reações de hidrólise.

T (°C)	ST (%)	E (%)	Rendimento (%)
-1	-1	-1	43,55 ± 1,26
-1	0	+1	72,78 ± 0,27
-1	+1	0	70,99 ± 0,09
0	-1	+1	64,76 ± 1,21
0	+1	-1	67,96 ± 1,00
+1	-1	0	58,80 ± 0,12
+1	0	-1	60,46 ± 0,04
+1	+1	+1	78,12 ± 0,55
0	0	0	76,33 ± 0,63
0	0	0	69,71 ± 0,95
0	0	0	72,94 ± 0,55

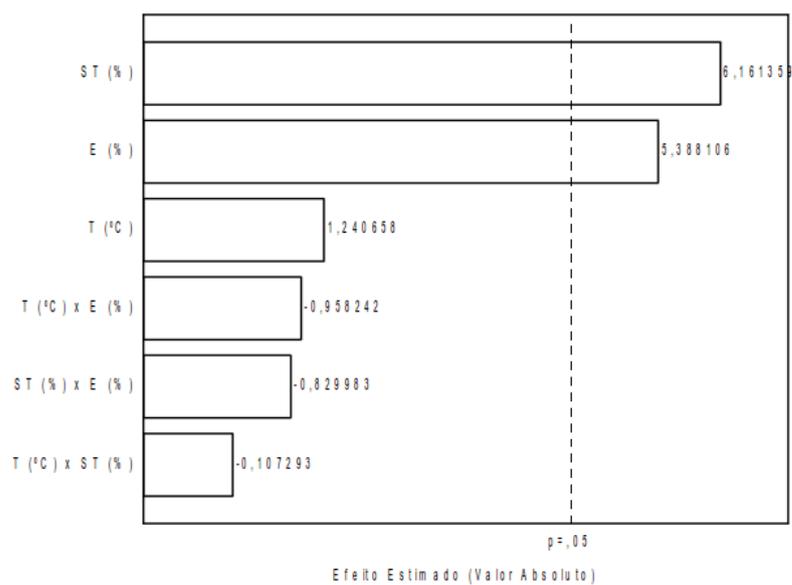


Figura 2. Gráfico de Pareto com as variáveis experimentais significativas e a interação das mesmas, onde ST corresponde à solução tampão; E, corresponde ao percentual de enzima e T, a temperatura.

A figura 2 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis de processo, onde pode ser visto efeito significativo e positivo das variáveis percentual de solução

tampão e concentração de enzima sob o rendimento da reação de hidrólise do óleo de macaúba. Conforme pôde ser observado na tabela 3, os maiores rendimentos foram obtidos a níveis máximos de concentração de enzima (10%), percentual de solução tampão (50%) e temperatura (55 °C). Autores reportam que, com o aumento da concentração de solução tampão, há uma menor variação do pH no meio reacional e menor agregação das gotas de óleo à enzima, o que promove aumento no rendimento da hidrólise [43, 44]. Segundo Oliveira et al [16], a principal vantagem do tampão está na geração de resultados mais reprodutíveis, o que é importante quando se trata de métodos analíticos envolvendo atividade enzimática.

A influência do percentual de catalisador na reação de hidrólise também foi avaliada, na faixa de 5 a 10%, em relação à massa dos substratos, sendo os resultados mostrados na tabela 3. Como pôde ser observado, o aumento do percentual de catalisador também aumentou o rendimento da hidrólise, sendo seu máximo (78%) obtido à concentração de 10% de catalisador, decorridas as 6 horas fixas do tempo de reação. Efeito semelhante foi verificado por Coelho et al [45], os quais, avaliando a influência da concentração de extrato enzimático de sementes dormentes de mamona no rendimento da hidrólise do óleo de milho, obtiveram rendimentos de ~ 17% à 1% de extrato enzimático, enquanto que à 5%, este rendimento foi de ~63%.

Como mostra a figura 2, a temperatura apresentou menor influência dentre as variáveis avaliadas neste trabalho, embora tenha sido verificado um aumento no rendimento da reação, proporcional ao aumento da temperatura do meio reacional. Aumento equivalente foi reportado por Salimon et al [46], onde um maior rendimento em AGLs foi obtido quando a temperatura foi aumentada de 50 para 70 °C. Avelar et al [47] reportaram rendimentos proporcionais ao aumento da temperatura da reação na hidrólise de óleos vegetais catalisada pelo extrato em pó das sementes de mamona. Para os autores, a 25 °C, rendimentos de ~81% de AGLs foram alcançados, enquanto que, a 50 °C, os autores obtiveram 100% de hidrolisado. Al-Zuhair et al [48] explicam que há uma redução na viscosidade do óleo com o aumento da tensão superficial na interface entre a água e o óleo, à medida que a temperatura aumenta, o que explica sua influência em reações deste tipo.

4 Conclusões

O presente estudo visou avaliar as variáveis e o efeito da adição de solventes à reação hidrólise enzimática do óleo de macaúba. Previamente, avaliando os efeitos da adição de solvente orgânico ao meio reacional, o solvente *n*-hexano apresentou a maior influência sob o rendimento da hidrólise (~78%) perante os solventes *n*-heptano (~70%), terc-butanol (~6,5%) e isopropanol (~4,5%). Ao serem avaliadas as variáveis de processo, são reportados efeitos positivos e significativos para o percentual de solução tampão e concentração de catalisador, visto que a temperatura não apresentou influência significativa sob o rendimento da reação. Rendimentos superiores à 10% em AGL foram obtidos com a adição solvente *n*-hexano no meio reacional, quando comparado ao processo sem adição de solvente, onde o rendimento em AGLs obtido foi de ~66%, ambos sob razão mássica óleo:solvente 1:1, 10% de catalisador, 50% de solução tampão sob temperatura de 55 °C, em um tempo fixo de 6 horas.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária pelo suporte financeiro, à CAPES pela concessão da bolsa, e à Universidade Estadual de Maringá - *Campus* Regional de Umiarama pela infraestrutura.

Referências

- [1] HUANG, J.; LIU, Y.; SONG, Z.; JIN, Q.; LIU, Y.; WANG, X. Kinetic study on the effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil: Study of the interfacial area and the initial rates. *Ultrason Sonochem*, v. 17, p. 521–525, 2010.
- [2] 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 Biochem*, v. 46, p. 682–688, 2011.
- [3] MENG, X.; ZOU, D.; SHI, Z.; DUAN, Z.; MAO, Z. A Dietary diacylglyce-

- rol prevents high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and abdominal adipose tissue. *Lipids*, v. 39, p. 37-41, 2004.
- [4] TICKEL, J. From the Fryer to the Fuel Tank: The Complete Guide to using Vegetable Oil as an Alternative Fuel. Tickel Energy Consulting, Tallahassee, FL. 2000, 162.
- [5] BELÉN-CAMACHO, D. R.; LÓPEZ, I.; GARCÍA, D.; GONZÁLEZ, M.; MORENO-ÁLVAREZ, M. J.; MEDINA, C. Physicochemical evaluation of seed and seed oil of corozo *Acrocomia aculeata* Jacq. *Grasas and Aceites*, v. 56, p. 311-316, 2005.
- [6] FERRARI, R. A.; AZEVEDO FILHO, J. A. Macauba as Promising Substrate for Crude Oil and Biodiesel Production. *J Agr Sci Tech*, v. 2, p. 1119-1126, 2012.
- [7] HIANE, P. A.; BALDASSO, P. A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 26, p. 683-689, 2006.
- [8] RAMOS, M. I. L.; SIQUEIRA, E. M. A.; ISOMURA, C. C.; BARBOSA, A. M. J.; ARRUDA, S. F. Bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd) Improved Vitamin A Status in Rats. *J Agric Food Chem*, v. 8, p. 3186–3190, 2007.
- [9] NOGUEIRA, B. M.; CARRETONI, C.; CRUZ, R.; FREITAS, S.; MELO JR, P. A.; COSTA-FELIX, R.; PINTO, J. C.; NELE, M. Microwave activation of enzymatic catalysts for biodiesel production. *J Mol Catal B Enzym*, v. 67, p. 117–121, 2010.
- [10] SILVA, C. A. S.; SANAIOTTI, G.; LANZA, M.; FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; MEIRELLES, A. J. A.; BATISTA, E. A. C. Mutual Solubility for Systems Composed of Vegetable Oil + Ethanol + Water at Different Temperatures. *J Chem Eng Data*, v. 1, p. 440–447, 2010.
- [11] COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Characterization of the pulp and kernel oils from *Syagrus oleracea*, *Syagrus romanzoffiana*, and *Acrocomia aculeata*. *J Food Sci*, v. 8, p. 1156-1161, 2011.

- [12] RODRIGUES, J. N.; GIOIELLI, L. A. Chemical interesterification of milk fat and milk fat-corn oil blends. *Food Res Int*, v. 36, p. 149-159, 2003.
- [13] RONNE, T.; YANG, T.; MU, H.; JACOBSEN, C.; XU, X. Enzymatic interesterification of butterfat with rapeseed oil in a continuous packed bed reactor. *J Agric Food Chem*, v. 53, p. 5617-5624, 2005.
- [14] COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. The use of lipases as agents of kinetic resolution of enantiomers in organic synthesis: General aspects of solvent's influence: *Quim Nova*, v. 22, p. 863-873, 1999.
- [15] AYRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. *Bol. Biotecnol*, v.72, p. 2-6, 2002.
- [16] OLIVEIRA, A. L. A.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Hidrólise parcial enzimática da gordura de babaçu. *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 19, n. 2, p. 270-276, 1999.
- [17] DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem Eng J*, v. 48, p. 270-282, 2010.
- [18] BATISTELLA, L.; USTRA, M. K.; RICHETTI, A.; PERGHER, S. B.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V.; LERIN, L.; DE OLIVEIRA, D. Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation. *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 35, p. 351-358, 2012.
- [19] KULKAMI, S. R.; PANDIT, A. B. Enzymatic hydrolysis of castor oil: An approach for rate enhancement and enzyme economy. *Indian J. Biotechnol* v. 4, p. 241-245, 2005.
- [20] PUTHLI, M. S.; RATHODE, V. K.; PANDIT, A. B. Enzymatic hydrolysis of castor oil: process intensification studies. *Biochem Eng J*, v. 31, p. 31-41, 2006.

- [21] 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. *Phys Sci*, v.19, p. 79–88, 2008.
- [22] 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, 2010.
- [23] SHARMA, C.; SATYENDRA, P.; CHAURASIAB, A.; DALAI, K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. *Catal Today*, v. 207, p. 93-100, 20013. doi.org/10.1016/j.cattod.2012.05.006.
- [24] JOÃO, J. J.; ZANELLA, C. R. Utilização de enzimas em meio orgânico. *Biocologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 16, p. 32-36, 2000.
- [25] LAANE, C.; BEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol and Bioeng*, v.30, p. 81, 1987.
- [26] GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies, in methods in enzymology. Vol. 1. (Eds.) Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic Press Inc., New York (1955).
- [27] RASPE, D.T; SILVA, C.; CARDOZO FILHO, L. Effect of additives and process variables on enzymatic hydrolysis of macauba kernel oil (*Acrocomia aculeata*). *Int J Chem Eng*, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- [28] AOCS, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices, 2: 4. ed. Champaign (1998).
- [29] SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzym Microb Technol*, v. 33, p. 97-103, 2003.
- [30] ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J Mol Catal B Enzym*, v. 16, p. 53-58, 2001.

- [31] ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour Technol*, v. 98, p. 648-653, 2007.
- [32] PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F. Study of the influence of solvent, carbohydrate and fatty acid in the enzymatic synthesis of sugar esters by lipases. *Quim Nova*, v.28, p. 792-796, 2005.
- [33] LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *J Mol Catal B Enzym*, v. 43, p. 58-62, 2006.
- [34] KORENMAN, Y. I.; MOKSHINA, N. Y.; ZYKOY, A. V. Distribution coefficients of vitamin B₂ in hydrophilic organic solvent-aqueous salt solution systems. *Russ J Phys Chem*, v. 84, p. 415-418, 2010.
- [35] LIMA, A. W.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. *Quím Nova*, v. 22, p. 229-245, 1999.
- [36] GOSWAMI, D.; BASU, J. K.; DE, S. Optimal hydrolysis of mustard oil to erucic acid: A biocatalytic approach. *J Chem Eng*, v. 182, p. 542-548, 2012.
- [37] CHUA, L. S.; ALITABARIMANSOR, M.; LEE, C. T.; MAT, R. Hydrolysis of virgin coconut oil using immobilized lipase in a batch reactor. *Enzyme Research*, ID542589, 5p, 2012.
- [38] PIZARRO, C.; BRANES, M. C.; MARKOVITS, A.; LORENTE, G. F.; GUI-SÁN, J. M.; CHAMY, R.; WILSON, L. Influence of different immobilization techniques for *Candida cylindracea* lipase on its stability and fish oil hydrolysis. *J Mol Catal B: Enzym*, v. 78, p. 111- 118, 2012.
- [39] RATHOD, V. R.; PANDIT, A. B. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. *Biochem Eng J*, v. 47, p. 93-99, 2009.

- [40] YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Kinetics of hydrolysis of tetrahydrofurfuryl butyrate in a three phase system containing immobilized lipase from *Candida antarctica*. *Biochem Eng J*, v. 17, p. 57-63, 2004.
- [41] PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Kinetic Studies of Lipase from *Candida rugosa*: A Comparative Study of the Free and the Immobilized Enzyme on Porous Chitosan Beads. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 91/93, p. 739-752, 2001.
- [42] CHUA, L. S.; SARMIDI, M. R. Effect of solvent and initial water content on (R, S)-1-phenylethanol resolution. *Enzyme Microb Tech*, v. 38, p. 551-556, 2006.
- [43] ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biochem*, v. 36, p. 947-954, 2001.
- [44] McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Em Bailey's industrial oil and fat products; Shahidi, F., ed.; John Wiley & Sons Inc.: New York, 2005, cap. 14.
- [45] COELHO, A. D.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; MENDES, A. A. Produção de concentrados de ácidos graxos por hidrólise de óleos vegetais mediada por lipase vegetal. *Quim Nova XY*, v. 36, p. 1164-1169, 2013.
- [46] SALIMON, J.; ABDULLAH, B. M.; SALIH, N. Hydrolysis optimization and characterization study of preparing fatty acids from *Jatropha curcas* seed oil. *Chem Cent J*, v. 5, p. 1-9, 2011.
- [47] AVELAR, M. H. M.; CASSIMIRO, D. M. J.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. *Ind Crop Prod*, v. 44, p. 452-458, 2013.
- [48] AL-ZUHAIR, S.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. *Process Biochem*, v. 38, p. 1155-1163, 2003.