

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOENERGIA – NÍVEL DE MESTRADO

SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BIODIESEL DO ÓLEO DA SEMENTE DE BARU (*Dipteryx
Alata*) A PARTIR DE LIPASES FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense* POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

TAYRINE MAINKO HOBLOS POZZOBON

TOLEDO
DEZEMBRO/2020

TAYRINE MAINKO HOBLOS POZZOBON

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTER DO BIODIESEL DO ÓLEO DA SEMENTE DE
BARU (*Dipteryx Alata*) A PARTIR DE LIPASES FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense*
POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Professora Dra. Maria Luiza Fernandes Rodrigues

TOLEDO
DEZEMBRO/2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Mainko Hoblos Pozzobon, Tayrine
SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTER DO BIODIESEL DO ÓLEO DA
SEMENTE DE BARU (Dipteryx Alata) A PARTIR DE LIPASES
FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense* POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO / Tayrine Mainko Hoblos Pozzobon;
orientador(a), Maria Luiza Fernandes Rodrigues, 2020.
69 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste
do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e
Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia,
2020.

1. biodiesel. 2. Fermentação Estado Sólido. 3. Lipase.
I. Fernandes Rodrigues, Maria Luiza. II. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por TAYRINE
MAINKO HOBLOS POZZOBON perante a Comissão Julgadora do Curso de
Mestrado em Bioenergia em 08 de setembro de 2020

COMISSÃO JULGADORA

Profª Drª Maria Luiza Fernandes Rodrigues
Orientadora

Profª Drª Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca
Membro externo

Profª. Drª. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner
Membro

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Juliano, pelo apoio incondicional ao longo deste percurso, sempre me dando forças para continuar.

A minha orientadora Maria Luiza, que aceitou orientar minha Dissertação de Mestrado. Pela atenção e dedicação ao trabalho desenvolvido e principalmente pela amizade e companheirismo.

A Capes, pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos.

A professora Tatiana Rodrigues, pela ajuda, apoio e compreensão constante durante o período do Mestrado e também a Dirce pelos conselhos, pela organização dos prazos e entregas, orientações que foram de fundamental importância. Pela amizade, conversas e nossos cafés da tarde.

A amiga e aluna de IC Ruana Benitez, por toda ajuda e dedicação, sempre pronta para ajudar no que fosse necessário, e por vezes por puro companheirismo.

Ao técnico de laboratório da Unioeste Fernando Dessler, que sempre esteve pronto a ajudar e dar o suporte necessário.

Ao professor André Mariano e em especial a doutoranda Anne, que nos recebeu com muita atenção em seu laboratório na UFPR, Campus de Curitiba, nos ajudando e orientando nas análises finais e nos ensaios de Cromatografia Gasosa.

Finalmente agradeço a Deus, que me permitiu esta oportunidade e colocou no meu caminho pessoas tão especiais que me permitiram chegar até aqui.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma das etapas operacionais da produção do biodiesel.	18
Figura 2- Reação de transesterificação.....	19
Figura 3- Reações de hidrólise de um triacilglicerol catalisadas por lipase.....	20
Figura 4 Reações de síntese catalisadas por lipases.....	21
Figura 5- Padrão de enovelamento de lipases (α/β – hidrolases)	23
Figura 6- Mecanismo de catálise e os estados de transição durante a hidrólise de éster catalisada por lipases.....	24
Figura 7- Árvore e semente do baru com a polpa.....	25
Figura 8- Número de artigos publicados nos últimos 10 anos referente as palavras chaves pesquisadas: Lipase - Biodiesel, Biodiesel - <i>Dipteryx alata</i> , Lipase - <i>Dipteryx alata</i>	30
Figura 9 - Extração do óleo de baru pelo método Soxhlet.....	31
Figura 10- Curva de Calibração do Ácido Oleico.....	35
Figura 11- Cinética de produção de lipase fúngica de <i>Penicillium sumatrense</i> por fermentação no estado sólido. Os ensaios foram realizados com umidade de 55 %. Experimentos realizados em duplicata com temperatura de 28°C.....	36
Figura 12- Fungo <i>Penicillium sumatrense</i> incubado em meio BDA–cloridrato de tetraciclina (250 mg L ⁻¹ de meio BDA) e Clorafenicol (1% m\v)	36
Figura 13 – Solução de esporos.....	38
Figura 14- Substratos inoculados assepticamente com o inóculo.....	38
Figura 15 – Curva de Calibração do Ácido Oleico.....	42
Figura 16- Cinética de produção de lipase fúngica de <i>Penicillium sumatrense</i> por fermentação no estado sólido. Os ensaios foram realizados com umidade de 55 %. Experimentos realizados em duplicata com temperatura de 28°C.....	45
Figura 17- Gráfico de Pareto na interação dos efeitos das variáveis na atividade enzimática, com um intervalo de 95% de confiança.....	47
Figura 18- Gráfico de paridade para mostrar a distribuição dos observados e os valores previstos para produção de lipase.....	48
Figura 19- Gráfico de superfícies de resposta que apresenta a interação entre as variáveis Granulometria e Umidade para a produção de lipase.....	49

Figura 20- Gráfico de contorno que apresenta a interação entre as variáveis Granulometria e Umidade para a produção de lipase.....	50
Figura 21- Reação de síntese do oleato de etila catalisada pela lipase.....	53
Figura 22- Cinética de rendimento do oleato de etila em função do tempo utilizando-se o sólido fermentado, contendo a lipase de <i>Penicillium sumatrense</i> produzida por FES. Condições: 37°C, 10,0 mL de n-hexano, razão molar 1:9 (ácido:álcool) e 60,0 U.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel (FERNANDES, 2002).....	22
Tabela 2- Principais aplicações industriais das lipases.....	28
Tabela 3- Planejamento experimental do delineamento fatorial 2^2 com ponto central aplicado no estudo da fermentação da semente de baru, utilizando-se o sólido fermentado produzindo a lipase de <i>Penicillium sumatrense</i>	40
Tabela 4- Resultados da composição centesimal da semente de baru (<i>Dipterix alata</i>).....	44
Tabela 5- Resultados experimentais do delineamento fatorial 2^2 com ponto central aplicado no estudo da FES, utilizando a semente de baru como substrato, para a produção de lipase de <i>Penicillium sumatrense</i>	46
Tabela 6- Análise de variância (ANOVA) para o modelo de atividade enzimática obtida pelo fungo <i>Penicillium sumatrense</i>	47
Tabela 7- Composição em ácidos graxos do óleo de semente de baru, disponíveis na literatura comparados a análise atual.....	52

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

μmol - micromol

BDA - Ágar Batata Dextose

CO_2 -Dióxido de Carbono

FES - Fermentação no Estado Sólido

FS - Fermentação Submersa

g L^{-1} - grama por litro

h - horas

m/m – razão massa por massa

MEV - Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura

mg L^{-1} - Miligrama por Litro

mm - milímetro

mM - milimolar

NaOH- Hidróxido de Sódio

nm - nanômetros

RM – Razão molar

s - segundo

TAGs - triacilgliceróis

U - Unidades totais

U gSS^{-1} - Unidade por grama de sólido seco

v/v - volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. BIODIESEL	16
2.1.1. Histórico	16
2.1.2. Matéria-prima para produção de biodiesel	18
2.1.3. Produção de biodiesel	18
2.1.3.1. Catálise enzimática do biodiesel	21
2.2. LIPASES-ASPECTOS GERAIS	23
2.2.1. Definição	23
2.2.2. Aspectos Estruturais e Mecanismo Catalítico das Lipases	24
2.2.3. Fontes de Lipases	27
2.2.4. Aplicações industriais das lipases	27
2.3. PRODUÇÃO DE LIPASES VIA FERMENTAÇÃO	29
2.3.1. Substratos utilizados na FES para produção de lipases	30
2.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO DA LITERATURA	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3.1.1 Estudos de Fermentação	33
3.1.2 Estudos de Síntese	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. REAGENTES	34
4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DA SEMENTE DE BARU E DA CASCA DE ARROZ	34
4.3. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA SEMENTE DE BARU E CASCA DE ARROZ	35
4.4. EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA SEMENTE DE BARU PARA APLICAÇÃO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BIODIESEL	35
4.4.1. Extração do óleo da semente de baru por Soxhlet	35
4.5. MICRORGANISMO	36
4.6. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS	37
4.7. PRODUÇÃO DA LIPASE	37
4.7.1. Condições de Cultivo no Meio Sólido	37
4.7.2. Secagem do Sólido Fermentado	39
4.8. OTIMIZAÇÃO DA FES ATRAVÉS DO DELINEAMENTO FATORIAL	39

4.8.1. Otimização da produção de lipases de <i>Penicillium sumatrense</i> utilizando planejamento experimental 2 ²	39
4.9. ESTUDO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA	40
4.9.1. Hidrólise do óleo da semente de baru	40
4.9.2. Reação de Esterificação por Adição Direta do Material Fermentado	41
4.10. MÉTODOS ANALÍTICOS	41
4.10.1. Determinação de Atividade Lipolítica- Método Titulométrico	41
4.10.2. Determinação de Atividade Lipolítica-Método Espectrofotométrico	42
4.10.3. Identificação dos ésteres do óleo de baru	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO	44
5.2. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES DE <i>Penicillium sumatrense</i> POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	45
5.2.1. Cinética de Produção da Enzima	45
5.2.2. Otimização da produção de lipases de <i>Penicillium sumatrense</i> utilizando planejamento experimental 2 ²	46
5.3. ESTUDO DA SÍNTESE	52
5.3.1. Caracterização da Composição em Ácidos Graxos do Óleo de Semente Baru	52
5.3.2. Reação de Esterificação Enzimática por Adição Direta do Material Fermentado	54
5.3.2.1. Método Espectrofotométrico	54
6. CONCLUSÃO	56
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	56
7. REFERÊNCIA	57

SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BIODIESEL DO ÓLEO DA SEMENTE DE BARU (*Dipteryx Alata*) A PARTIR DE LIPASES FÚNGICAS DE *Penicillium sumatrense* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

RESUMO

O interesse na produção de lipases está relacionado ao seu potencial tecnológico como biocatalisador em reações de hidrólise e síntese como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), bem como aminólise (síntese de amidas) e lactonização, em meios aquo-restritos, quando a quantidade de água do sistema é suficientemente baixa para deslocar o equilíbrio no sentido da síntese. A Fermentação no Estado Sólido (FES) surge como uma alternativa para redução de custos de produção do biocatalisador, pois é possível utilizar resíduos agroindustriais como substratos. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de lipase fúngica de *Penicillium sumatrense* por FES, utilizando como substrato a semente de baru (*Dipteryx alata*). O microrganismo utilizado, o *Penicillium sumatrense* foi isolado das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*) e identificado por sequenciamento de DNA ribossomal. A atividade enzimática foi determinada pelo método titulométrico utilizando-se o óleo de oliva como substrato. Para otimizar a produção de lipases foi realizado um planejamento experimental ², visando avaliar os efeitos das variáveis envolvidas no processo (granulometria do substrato e umidade). A variável resposta escolhida foi a atividade enzimática em unidades totais (U). As análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica 7.0. Os resultados do planejamento experimental indicaram que a atividade enzimática foi máxima (237,0 U) quando utilizamos uma umidade do substrato de 60 % (m/m, base úmida), granulometria do substrato de 15 mesh, 28°C, após 72 h de fermentação. O sólido fermentado e seco, produzido no melhor resultado do planejamento experimental (237,0 U ou 23,7 U gSS⁻¹) foi empregado nos estudos da síntese enzimática do biodiesel a partir do óleo da semente de baru. Verificou-se, através do método espectrofotométrico, que o rendimento em éster do biodiesel (oleato de etila) foi de 100%.

Palavras-chave: FES, lipases, óleo de baru, biodiesel

ENZYMATIC SYNTHESIS OF BIODIESEL OF BARU (*Dipteryx Alata*) SEED OIL FROM FUNGAL LIPASES of *Penicillium sumatrense* BY SOLID STATE FERMENTATION

ABSTRACT

The interest in the production of lipases is related to its technological potential as a biocatalyst in hydrolysis and synthesis reactions such as esterification, transesterification (interesterification, alcoholysis and acidolysis), as well as aminolysis (synthesis of amides) and lactonization, in aquo-restricted medium, when the amount of water in the system is low enough to shift the balance towards the synthesis. Solid State Fermentation (SSF) emerge as an alternative to reduce production costs of the biocatalyst, since it is possible to use agro-industrial waste as substrates. The objective of this work was to study the production of fungal lipase from *Penicillium sumatrense* by SSF using baru seed (*Dipteryx alata*) as substrate. The microorganism used, *Penicillium sumatrense*, was isolated from castor leaves (*Ricinus communis* L.) and identified by ribosomal DNA sequencing. The enzymatic activity was determined by the titrimetric method using olive oil as a substrate. In order to optimize the production of lipases, an experimental design 2^2 was carried out, aiming to evaluate the effects of the variables involved in the process (substrate size and moisture). The response variable chosen was the enzymatic activity total units (U). The statistical analyzes were performed using Statistica 7.0 software. The results of the experimental design indicated that the enzymatic activity was maximum (237.0 U) when used a substrate moisture of 60% (m / m, wet basis), substrate granulometry of 15 mesh, 28 °C, after 72 h fermentation. The fermented and dry solid, produced in the best result of the experimental design (23.7 U gSS⁻¹ or 237,0 U). It was verified, through the spectrophotometric method, that the yield into biodiesel ester (ethyl oleate) was 100%.

Key-words: SSF, lipases, baru oil, biodiesel

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas aumentaram os estudos para reduzir os impactos negativos provocados ao meio ambiente por ações antrópicas, como a emissão de gases de efeito estufa, advindo dos combustíveis fósseis (XIA & TANG, 2017). Dentre esses estudos, diversos segmentos vem adotando uma nova prática de gestão ambiental com uma produção mais limpa, dentre eles podemos citar o industrial e o agrícola, que buscam priorizar o uso de matérias-primas oriundas de fontes renováveis, diminuindo a geração de resíduos e emissões que causem danos ao meio ambiente (BEZERRA, *et. al.*, 2012; FOLEY *et. al.*, 2017).

O biodiesel é um combustível derivado de óleos vegetais e gorduras animais, pode ser classificado como qualquer combustível alternativo, de natureza renovável, que possa ser empregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo em motores de ignição por compressão interna (motores do ciclo Diesel) (RAMOS *et al.*, 2017).

O óleo da semente de baru, como matéria-prima na produção de biodiesel, é interessante principalmente por não ser uma variedade competitiva com outras culturas agriculturáveis e também porque existem poucos trabalhos na literatura utilizando este óleo. O baruzeiro é uma árvore nativa do Cerrado, pertencente à família Fabaceae, se prolifera na região do Planalto Central, precisamente no norte de Minas Gerais, Goiás e centro do Mato Grosso, indo até a costa atlântica do Maranhão. As sementes dessa leguminosa são fontes significativas de lipídeos e proteínas, a composição dos ácidos graxos é semelhante as do óleo de amendoim, destacando-se os ácidos oleico e linoleico. O elevado grau de insaturação do óleo desta semente favorece seu uso para fins comestíveis e como matéria-prima industrial (TAKEMOTO *et al.*, 2001). O teor de lipídios da semente de baru é de 38% sendo mais elevado que o da soja (17%) e mais baixo que a castanha do Pará (67%) (ALMEIDA, 1988).

Com relação as rotas sintéticas de síntese do biodiesel, o processo de transesterificação é o mais frequentemente utilizado. Este processo consiste na reação química de óleos vegetais ou de gordura animal com o álcool, etanol ou metanol, na presença de um catalisador básico, ácido ou enzimático. Apesar de diversas vantagens socioambientais, o aumento da produção de biodiesel acarreta no aumento de efluente gerado durante o seu processo de purificação.

A produção e purificação de biodiesel pela rota química passam por várias etapas, como a preparação da matéria-prima; preparação do catalisador; processo reacional; separação de fases; recuperação de excesso de álcool; lavagem e secagem do biodiesel e purificação da

glicerina (BENEVIDES, 2011). Assim como qualquer processo de síntese gera subprodutos, como a glicerina e efluentes da lavagem do biodiesel oriundos da purificação.

Como uma rota alternativa, estudou-se neste trabalho de pesquisa, o uso de enzimas como catalisadores na produção do biodiesel, pois a produção da enzima é de baixo custo e apresenta as vantagens de biodegradabilidade (*white biotechnology*) e pode se recuperada e utilizada em ciclos, reduzindo o custo operacional. Neste trabalho utilizou-se lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense* com aplicação em processos de síntese do biodiesel. A produção de enzimas por Fermentação no Estado Sólido (FES), com aplicações na síntese enzimática do biodiesel, justifica plenamente este trabalho, considerando que os processos enzimáticos são ambientalmente limpos e geram menores volumes de efluentes, associados à crescente preocupação com os impactos ambientais e uma legislação ambiental cada vez mais rígida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIODIESEL

Os problemas ambientais surgidos em decorrência da emissão dos gases de efeito estufa pelo consumo do petróleo e seus derivados tem desencadeado várias pesquisas para utilização de fontes renováveis de energia substitutas aos combustíveis fósseis.

O biodiesel é um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas de gorduras de origem vegetal ou animal com um álcool na presença de um catalisador, (PORTELA, 2008; ALBUQUERQUE, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

É um combustível ambientalmente limpo quando comparado ao diesel de petróleo, pois ele reduz as emissões dos gases poluentes, é considerado um substituto parcial e alternativo aos derivados do petróleo, sendo um combustível ecológico e renovável (SILVA, 2010). Ao liberar o gás carbônico (CO₂) durante o processo de queima, as plantas o absorvem transformando-o em oxigênio, que é liberado na atmosfera neutralizando as emissões de CO₂. Outra característica importante do biodiesel é sua fácil adaptação aos motores a diesel se compararmos com outros biocombustíveis como o gás natural, que requer adaptação do motor, o que se torna uma técnica capaz de atender toda a frota de motores a diesel já existente (KNOTHE, 2018). Ainda podemos citar como vantagem a ausência de enxofre e compostos aromáticos, o que resulta em uma combustão mais limpa sem a formação de SO₂ (dióxido de enxofre), causador das chuvas ácidas e compostos cancerígenos (SANTOS *et al.*, 2008). A adição do biodiesel no petrodiesel ainda melhora as características do combustível fóssil reduzindo os níveis de ruído do motor, melhorando a eficiência da combustão pelo aumento do número de cetanos (GALLO, 2003).

2.1.1. Histórico

Na Exposição Mundial de Paris em 1898, Rudolf Diesel, inventor do motor a combustão interna que leva seu nome, demonstrou seu invento utilizando óleo de amendoim *in natura*, onde o motor não apenas funcionou com o óleo orgânico, como o desempenho da máquina em comparação com o combustível fóssil foi exatamente o mesmo (TEIXEIRA;2010) Outros experimentos conduzidos por Rudolf Diesel foram realizados em São Petersburgo, na Rússia,

com locomotivas movidas a óleo de mamona e a óleos animais, ele acreditava que a utilização de um combustível advindo da biomassa seria o futuro para o seu motor apesar da insignificância que lhe era atribuída na época como registrado em seu discurso realizado em 1912 (KNOTHE *et al.*, 2018). Quando surgiu a Segunda Guerra Mundial, muitos governos passaram a adotar o óleo vegetal como combustível de emergência porém devido à falta de uma base tecnológica adequada as indústrias não progrediram após o encerramento da Guerra.

As iniciativas de substituição do petróleo e seus derivados na economia mundial ganharam destaque devido às crises do petróleo nas décadas de 70 e 80, causadas pelo agravamento dos conflitos no Oriente Médio, quando o mercado de petróleo passou por desequilíbrios entre ofertas e demandas mundiais, aumentando as pesquisas por outras fontes de energia a fim de diminuir a dependência por petróleo (BARROS *et al.*, 2014). Nesta época, o governo Federal criou além do ProÁlcool, o Plano De Produção De Óleos Vegetais Para Fins Carburantes (Pro Óleo), através da Resolução nº 007, de 22 de outubro de 1980 (GOLDEMBERG *et al.*, 2004). Através desta Resolução previa-se a regulamentação de uma mistura de 30% de óleo vegetal e uma substituição integral a longo prazo.

Porém, entre 1983 e 1985, a produção de petróleo teve um aumento significativo o que acarretou em uma baixa dos preços no mercado internacional onde o cenário tornou-se desfavorável ao uso dos biocombustíveis, e em consequência vários projetos foram desarticulados (CAMARA DOS DEPUTADOS, 2003; MENDES 2015).

O preço do petróleo se estabilizou no ano de 2000 em um nível um pouco mais alto no mercado internacional e as fontes de energia renováveis voltaram a assumir um papel importante na matriz energética mundial com técnicas mais avançadas. Em 2005, o biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira através do artigo 2º da Lei nº 11.097, de 13.01.2005, onde determinou o volume de 5% mínimo obrigatório de adição ao óleo diesel comercializado ao consumidor final em qualquer parte do território nacional (FERRARI *et al.*, 2005; MME/EPE, 2007; MENDES, 2015).

Em 2020, a mistura de biodiesel no diesel comercializado no Brasil passou a ser de, no mínimo 12% a partir de março, percentual confirmado e publicado pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Anteriormente o mínimo obrigatório era de 11% e a expectativa é de que a mistura suba 1 ponto porcentual por ano até chegar em 2023 aos 15%.

2.1.2. Matéria-prima para produção de biodiesel

Toda substância que contém triglicerídeos em sua composição pode ser usada para produção de biodiesel. Estes são encontrados nos óleos vegetais e gorduras animais. O Brasil é favorecido com sua biodiversidade e clima por possuir uma gama de matérias-primas para extração de óleo vegetal como a mamona, pinhão manso, o girassol, dendê, canola, babaçu entre outros. No Brasil, a soja é a principal matéria-prima utilizada.

Já existem estudos investigando também o óleo extraído das microalgas como Unpaprom (2015) e Ribeiro (2019). As algas são de crescimento rápido na natureza e tem capacidade de converter grandes quantidades de CO₂ em oxigênio. Segundo Santos A. (2007), quando comparado aos óleos vegetais, o maior rendimento em óleo provém das microalgas.

Devido á semelhança com os óleos vegetais, a gordura animal também pode ser convertida em biodiesel, como por exemplo, o óleo de peixe, o sebo bovino, a banha de porco dentre outras, podendo ser obtidas de frigoríficos e abatedouros (SBRT, 2006).

Além dos óleos vegetais e gorduras animais, constituem também matéria-prima para a produção de biodiesel os óleos e gorduras residuais, resultantes de processamentos domésticos, comerciais e industriais.

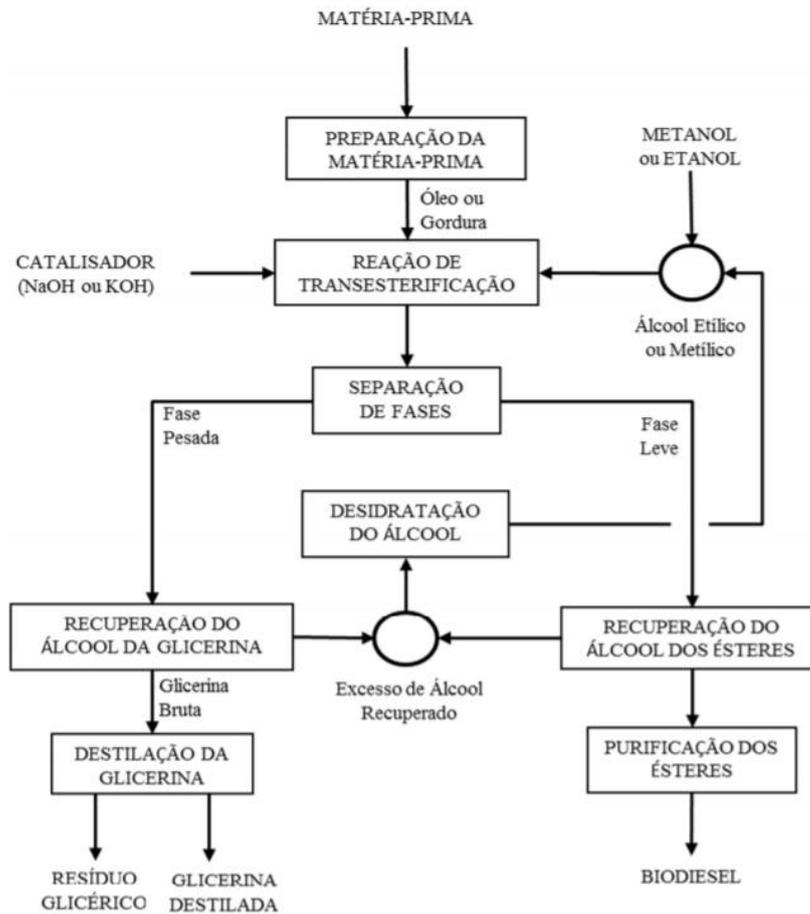
2.1.3. Produção de biodiesel

O biodiesel só é renovável em consequência do uso das matérias-primas advindas das fontes renováveis, da biomassa, diferente dos compostos derivados do petróleo. A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, define como biodiesel qualquer combustível advindo de uma fonte renovável que possa ser utilizado na substituição do diesel de petróleo em motores de ciclo diesel.

O processo mais utilizado na produção de biodiesel é a transesterificação, onde se utilizam catalisadores básicos, porém mais recentemente surgiram estudos utilizando também o processo de hidroesterificação, que permite a utilização de diferentes matérias-primas independente da acidez e da umidade (ENCARNAÇÃO, 2008).

Silva (2014) e Parente (2003) descreveram o processo de produção do biodiesel em algumas etapas, como a preparação da matéria-prima, reação de transesterificação, separação das fases, recuperação do álcool e da glicerina, assim como mostra na Figura 1.

Figura 1- Fluxograma das etapas operacionais da produção do biodiesel.

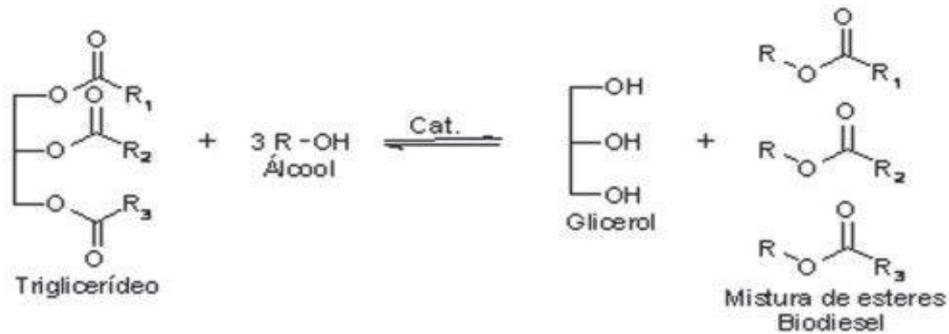


Fonte: Parente, 2003.

Segundo Parente (2003) e Encarnação (2008), na prepara o da matéria-prima, os óleos devem ter baixo teor de ácidos graxos livres e umidade evitando a saponifica o, o que diminui a eficiência de conversão. Assim, pode-se utilizar uma prepara o anterior a rea o onde a matéria-prima   neutralizada com uma lavagem de soluço alcalina de hidróxido de sódio ou potássio e uma secagem ou desumidifica o, nesta etapa o processo gera como subproduto o *soapstock* (borra de refino) que   basicamente tratado como rejeito.

Na rea o de transesterifica o (Figura 2), a matéria-prima passa por uma rea o química onde o triglicerídeo reage com um álcool simples (metanol ou etanol), formando ésteres (met lico ou etílico), que constituem o biodiesel, e o glicerol.

Figura 2– Reação de transesterificação.



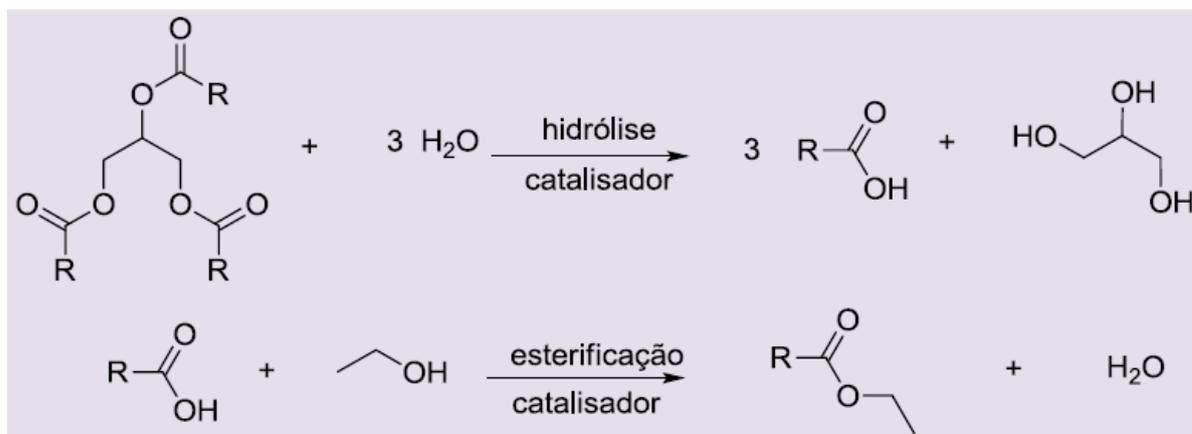
Fonte: RODRIGUES (2009).

O álcool é adicionado em excesso, permitindo a formação de uma fase separada de glicerol, o que ainda gera um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do biodiesel, pela característica reversível da reação. Nesta reação ocorre a separação da glicerina do óleo vegetal, o que constitui cerca de 20% da massa molecular do óleo. Ainda pode-se utilizar nesta reação um catalisador químico como as bases e os ácidos ou um catalisador biológico, como as enzimas. Os catalisadores mais eficientes para esse propósito são KOH e NaOH. A catálise básica homogênea é a mais empregada comercialmente por razões econômicas e pela grande disponibilidade (BORGES & DIAZ, 2012).

O meio reacional é composto por duas fases, a mais densa contém a glicerina e a menos densa o biodiesel, ambas contaminadas com impurezas e excesso de álcool. A separação de fases pode ocorrer por decantação ou centrifugação (MARQUES *et al.*, 2011). Ainda segundo o autor, a recuperação do álcool da fase glicerinosa pode ser realizada através da evaporação, que pode ser tratado posteriormente para reutilização no processo de produção. Na recuperação do álcool da fase menos densa (biodiesel), utiliza-se o mesmo tratamento descrito acima na recuperação do álcool da glicerina. Depois de recuperado, o álcool ainda contém quantidades significativas de água, necessitando ser desidratado por destilação. A purificação da glicerina pode ser realizada por destilação a vácuo, resultando em um produto límpido e transparente, gerando uma glicerina de grau farmacêutico de concentração superior a 99%. A purificação do biodiesel é feita através de uma sequência de lavagens para retirada de vestígios de catalisador, glicerina e álcool que ainda podem estar retidos no produto, seguido de uma desumidificação para se enquadrar nas especificações comerciais do produto.

Na hidroesterificação, que atualmente vem sendo estudada como alternativa tecnológica, o processo consiste em duas etapas correlacionadas, a hidrólise onde os triacilgliceróis são hidrolisados aos ácidos graxos, gerando como subproduto a glicerina, e em seguida a etapa de esterificação, na qual os ácidos graxos livres gerados, após passar por um processo de purificação, são esterificados com o álcool desejado (Figura 3), (RAMOS, 2011).

Figura 3 -Etapas do processo de hidroesterificação: hidrólise dos triacilgliceróis e esterificação dos ácidos graxos.



Fonte: (RAMOS 2011)

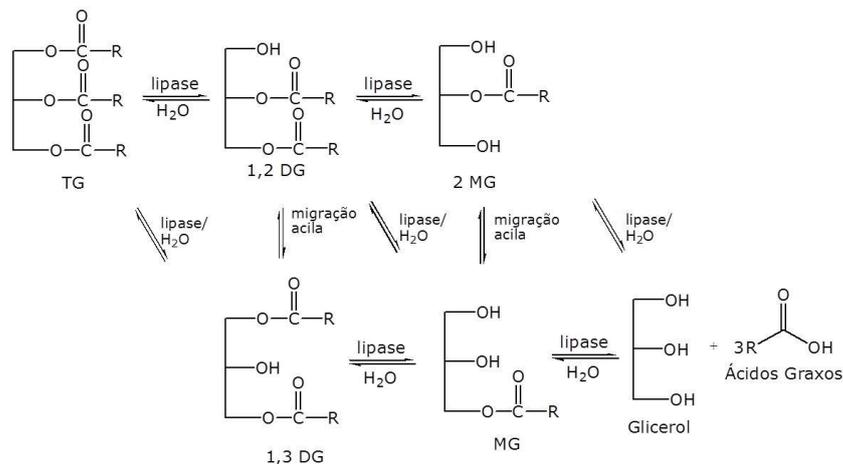
O processo de hidroesterificação possui diversas vantagens em relação a transesterificação, sendo um processo químico com menor custo e com eliminação de etapas de purificação, o ácido graxo livre passa a não ser uma limitação em termos de especificação na matéria-prima onde as com alta acidez não necessitam de tratamento prévio, o uso ainda se torna mais atrativo quando se realiza o uso de catalisadores heterogênicos, diminuindo o número de etapas de separação, possibilitando o reuso do catalisador e produzindo no final uma glicerina livre de sais com alta pureza (ARANDA *et al.*, 2009; TEIXEIRA 2011).

2.1.3.1. Catálise enzimática do biodiesel

Segundo a NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), as lipases (triacilglicerol éster acilhidrolase, E.C. 3.1.1.3) são pertencentes ao grupo das serina hidrolases. São enzimas hidrolíticas que *in vivo* catalisam a hidrólise da ligação éster presentes em triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10

átomos de carbono), sendo a trioleína o seu substrato padrão, em monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol na interface água óleo (Figura 4). As lipases constituem uma classe especial de carboxil éster hidrolases. Já as esterases são enzimas que hidrolisam triacilgliceróis de cadeia curta (menor que de 10 átomos de carbono) (MESSIAS *et al.*, 2011; DOS SANTOS *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016).

Figura 4- Reações de hidrólise de um triacilglicerol catalisadas por lipase.



Fonte: FUREBY *et al.*, 1997.

As lipases são provenientes de diversos tipos de microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras e, são encontradas naturalmente em tecidos de animais e algumas plantas (SAXENA *et al.*, 2003, COLLA *et al.*; 2012). As enzimas provenientes de microrganismos constituem um grupo interessante para aplicação biotecnológica industrial, devido à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática, utilização de substratos de custos mais baixos e a facilidade de produção de enzimas em grande escala (HASAN *et al.*, 2006).

Lipases podem ser utilizadas como catalisadores em várias reações industrialmente importantes, como a esterificação e a transesterificação (SHAH *et al.*, 2003, COLLA *et al.*, 2012). Elas podem converter de forma eficiente triglicerídeos em ésteres de ácidos graxos, o que atrai o interesse no campo de produção do biodiesel. Assim, muitos pesquisadores consideram que o uso de lipases como sendo uma alternativa "verde" em relação aos catalisadores químicos tradicionais, pois as enzimas não são tóxicas e sendo biodegradáveis, não poluem o meio ambiente.

O processo químico utilizado para produção do biodiesel, mesmo sendo simples e rápido, possui suas desvantagens. Ao término da reação, o catalisador permanece misturado com um subproduto (glicerina) fazendo com que a separação e purificação sejam complexas. Por outro lado, o processo enzimático não possui tais dificuldades e possibilita o aproveitamento do biocatalisador (NASCIMENTO *et al*; 2001). Fernandes (2002) descreve várias vantagens para o uso da catálise enzimática como podemos observar na Tabela 1.

Tabela 1- Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel (FERNANDES, 2002).

Processo	Vantagens	Desvantagens
Enzimático	<ul style="list-style-type: none"> ◦ De forma geral as reações por catálise enzimáticas são limpas; ◦ O catalisador pode ser reutilizado; ◦ Facilidade de separação do catalisador; ◦ Obtenção de produtos mais puros; ◦ Não há corrosão nos equipamentos durante o processo; 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Custo das enzimas ◦ Longo tempo de reação
Químico	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Simplicidade ◦ Alto rendimento ◦ Curto tempo de reação 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Dificuldade de separação do catalisador ◦ Impossibilidade de reutilização do catalisador ◦ Dificuldade de utilização de etanol hidratado ◦ Obtenção de produtos com menor grau de pureza

Neste sentido, o uso das enzimas apresenta-se como uma alternativa promissora atendendo aos apelos atuais da química verde, reduzindo o impacto ambiental minimizando os resíduos gerados nos processos químicos convencionais, com menor consumo de energia (COSTA-FILHO, 2008).

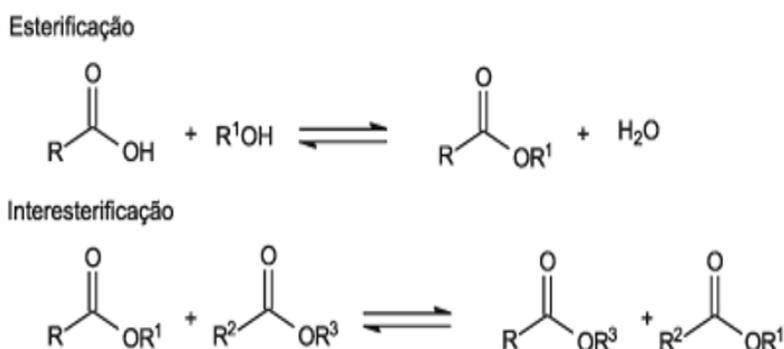
2.2. LIPASES-ASPECTOS GERAIS

2.2.1. Definição

As lipases representam uma importante classe de enzimas cujo papel biológico relaciona-se com a digestão e o metabolismo de gorduras. São hidrolases que atuam na interfase

orgânica aquosa catalisando a hidrólise de óleos com liberação de ácidos graxos, triglicerídeos em diglicerídios, monoglicerídios, ácidos graxos livres e glicerol. Em meios de baixa concentração de água agem em ligações éster do grupo carboxílico, como reações de esterificação, transesterificação e interessesterificação como mostra na Figura 5 (CARVALHO *et al.*, 2003, ZORN *et al.*, 2016).

Figura 5- Reações de síntese catalisadas por lipases.



Fonte: CARVALHO *et al.*, 2003, ZORN *et al.*, 2016.

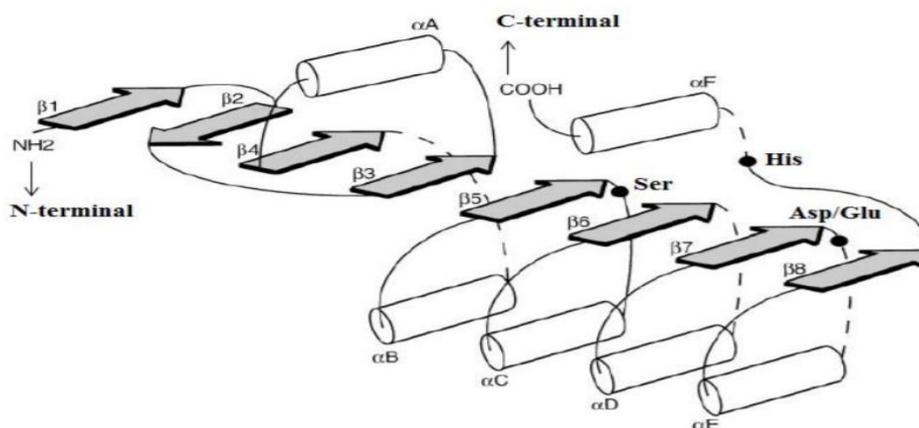
As lipases geralmente não requerem cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH, são relativamente estáveis a altas temperaturas e elevadas concentrações de sais, solventes orgânicos, líquidos iônicos, entre outros (PANDEY *et al.*, 1999; GANDHI, 1997; ZORN *et al.*, 2016). O interesse pelas lipases para possíveis aplicações industriais é importante, pois a substituição de catalisadores químicos por estes biocatalisadores oferece vantagens no processo, como menor consumo de energia, maior rendimento e menor geração de subprodutos.

2.2.2. Aspectos Estruturais e Mecanismo Catalítico das Lipases

A cristalografia de raios-x possibilitou a obtenção de estruturas tridimensionais de diversas lipases sendo possível compreender melhor seus mecanismos de ação. A primeira estrutura resolvida de uma lipase fúngica foi a *Rhizomucor miehei*, que apresentou um padrão conformacional comum, denominado de conformação α/β hidrolase, composto de uma sequência de α -hélices e folhas β -pregueadas alternadas (JAEGER *et al.*, 1999). Este tipo de enovelamento apresenta um núcleo central composto por fitas β paralelas rodeado por porções

em α -hélice. As fitas β têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre si.

Figura 6- Padrão de enovelamento de lipases (α/β – hidrolases). Os cilindros representam as alfa-hélices e as setas correspondem às fitas beta (folhas beta).



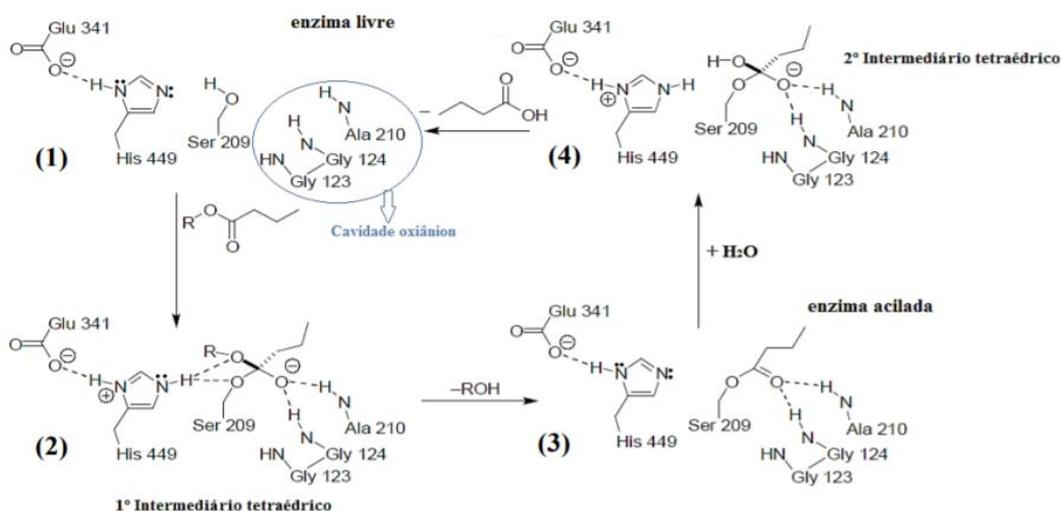
Fonte: GONÇALVES, 2013.

O sítio ativo das lipases está localizado no lado C-terminal das fitas β e é composto por três resíduos catalíticos que invariavelmente ocorrem na seguinte ordem na sequência primária: serina (nucleófilo), aspartato ou glutamato (ácido) e histidina. O resíduo de serina está localizado especificamente no C-terminal da fita $\beta 5$ em um pentapeptídeo altamente conservado G-X-S-X-G, onde G é o aminoácido glicina, S é o resíduo de serina e X representa qualquer aminoácido. Esse pentapeptídeo é denominado “cotovelo” nucleofílico por conectar a fita $\beta 5$ com a hélice αC (EGLOF *et al.*, 1995; SCHRAG & CYGLER, 1997; JAEGER & REETZ, 1998).

Estes estudos propiciaram a verificação em nível molecular da existência da ‘tampa’ conhecida como tampa hidrofóbica, que foi associada à ativação interfacial, ou seja, na presença de substratos micelares ou anfipáticos ela sofreria uma mudança conformacional expondo o sítio ativo e na presença de substratos solúveis em água ela se manteria fechada com ausência de atividade (COSTA & AMORIM, 1999, GONÇALVES, 2013). A abertura da tampa consiste no seu deslocamento da forma que seu lado hidrofílico seja encoberto em uma cavidade polar e sua região hidrofóbica seja exposta expandindo a superfície apolar em torno do sítio catalítico.

O mecanismo de catálise pode ser compreendido através da Figura 7 e a descrição proposta por BORNSCHEUER & KAZSLAUSKAS (2005).

Figura 7- Mecanismo de catálise e os estados de transição durante a hidrólise de éster catalisada por lipases.



Fonte: Bornscheuer e Kazslauskas (2005).

Após a etapa de abertura da tampa, já no sítio ativo, o aminoácido histidina (His) aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina (Ser). Desta forma, ocorre um ataque nucleofílico ao átomo de carbono suscetível da ligação éster do substrato, abrindo a ligação C=O e dando origem ao primeiro intermediário tetraédrico. O anel imidazólico da histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido (GONÇALVEZ, 2013).

Posteriormente, o intermediário tetraédrico formado é estabilizado por ligações de hidrogênio com os grupamentos amidas dos resíduos pertencentes à cavidade do oxianion. O intermediário tetraédrico é desfeito, pelo retorno da ligação C=O e consequente clivagem da ligação éster e liberação da porção álcool, cujo oxigênio recebe um próton proveniente da histidina, que age como ácido gerando assim o intermediário denominado enzima acilada, onde o componente ácido do substrato encontra-se esterificado com o resíduo serina da enzima. Para que a quebra da ligação covalente na enzima ocorra, é necessária a presença de água. Neste caso, a molécula de água que se aproxima é ativada pelo resíduo histidina vizinho e o íon hidroxila resultante promove o ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente. Uma molécula de água, que tem seu caráter nucleofílico acentuado

pela ação básica da histidina protonada, ataca o carbono suscetível do intermediário acil enzima, abrindo a ligação C=O, gerando um segundo intermediário. O retorno da ligação C=O desfaz o segundo intermediário tetraédrico com a liberação do ácido carboxílico e da enzima livre (MACHADO, 2011; GONÇALVEZ, 2013).

2.2.3. Fontes de Lipases

As lipases são encontradas amplamente distribuídas na natureza em tecidos animais e em microrganismos. Nos organismos eucarióticos essas biomoléculas fazem parte do metabolismo de lipídios, incluindo a digestão, absorção e reconstituição de gorduras, nas plantas são encontradas em tecidos de reserva de energia ou podem ser produzidas por fermentação de várias espécies de microrganismos (SHARMA *et al.*, 2001; LAGE *et al.*, 2016).

As enzimas produzidas por fermentação microbiana são em sua maioria extracelulares (GUTARRA *et al.*, 2009). As lipases extracelulares são secretadas em quantidades significativas por algumas espécies de fungos filamentosos cultivados em condições adequadas. A otimização do cultivo é de suma importância pois os parâmetros podem influenciar nas propriedades microbianas de produção da lipase (ANDRADE, 2012).

Os fungos filamentosos, principalmente aqueles pertencentes aos Gêneros *Aspergillus fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Thermomyces* são conhecidos como melhores produtores de lipases (CARDENAS *et al.*, 2001).

2.2.4. Aplicações industriais das lipases

O interesse industrial por lipases vem aumentando gradativamente, especialmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais que aumentaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (ROVEDA *et al.*, 2010). Dentre as múltiplas aplicações das lipases se destacam as sínteses orgânicas, hidrólise de óleos e gorduras, melhoramento de sabor no processamento de alimentos e análises químicas (SHARMA *et al.*, 2001). Elas também catalisam reações de hidrólise, esterificação e transesterificação em solventes orgânicos, sistemas bifásicos e em soluções micelares (BABICZ, 2009). A Tabela 2 demonstra as principais aplicações industriais das lipases.

Tabela 2- Principais aplicações industriais das lipases.

Setor	Aplicações das lipases	Produto
Alimentos		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite.	Formação do aroma para produtos lácteos
Panificação	Melhora sabor e qualidade, prolongamento da vida útil do alimento.	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhora aroma e aumenta a velocidade da fermentação, por remoção de lipídios.	Bebidas alcoólicas como o saquê, vinho e outras
Processamento de derivados do ovo, carnes e peixes	Melhora a qualidade do ovo por hidrólise dos lipídios, desenvolvimento do aroma e remoção de gordura.	Maionese, produtos embutidos.
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais, hidrólise de óleos	Óleos e gorduras modificadas
Químico		
Química fina	Síntese de Ésteres	Ésteres
Detergentes	Retirada de manchas de gorduras de alimentos	Detergentes
Farmacêutico e Médico		
Medicina	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivo
Cosmético	Remoção de Lipídios	Cosméticos em geral
Análítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico

Fonte: CASTRO *et al.*, 2004; SALIHU & ALAM, 2015; KRÜGER, 2017.

Uma das áreas com maior aplicação industrial das lipases é a indústria de detergentes. A eficiência da limpeza desses produtos é aumentada pela adição de enzimas em sua composição (HASAN, 2006). A produção de surfactantes corresponde a 32% da venda total de lipases. Estima-se que 1000 t de lipases são adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos anualmente (JAEGER & REETZ, 1998, COLLA *et al.*; 2012).

As lipases também têm sido aplicadas no tratamento de efluentes e resíduos gordurosos, nas indústrias de ração animal e de suplementos na alimentação de não ruminantes, melhorando a utilização dos nutrientes das matérias-primas que são mais difíceis de serem digeridas (JEGANATHAN, *et al.*, 2007; BÓDALO *et al.*, 2009).

Elas também têm sido aplicadas como catalisadores na produção de biodiesel, que é uma rota alternativa e promissora para contornar os problemas associados a rota convencional. As vantagens da biocatálise sobre o processo químico, incluem a esterificação de triglicerídeos e ácidos graxos, geração de um glicerol mais limpo e, no caso das enzimas imobilizadas, existe ainda a possibilidade de recuperação e reutilização do biocatalizador (DRAPCHO, 2008)

2.3. PRODUÇÃO DE LIPASES VIA FERMENTAÇÃO

Há dois tipos básicos de fermentação para produção enzimas: a Fermentação Submersa (FS) e a Fermentação em Estado Sólido (FES).

A FES é um processo onde se utilizam microrganismos que crescem em um substrato sólido na ausência ou baixo teor de água livre. A umidade deve ser suficiente para garantir o metabolismo e crescimento celular, sem exceder a capacidade máxima de retenção de água. Na FS, os substratos são dissolvidos em meio líquido (PANDEY, 2003; HANSEN *et al.*, 2015).

Segundo Rainbout (1998), Maciel (2006) e Santos S. (2007), se compararmos a FES e a FS, verificamos várias vantagens da Fermentação em Estado Sólido, principalmente quando utilizamos os fungos filamentosos, pois o meio fermentativo se aproxima das condições do habitat natural desse microrganismo; a baixa umidade do meio dificulta a contaminação por outros microrganismos; apresenta alta produtividade por volume de fermentação e a extração do produto do meio de fermentação é facilitada. Ainda podemos considerar a possibilidade de emprego de meios de cultivo mais baratos, como aqueles constituídos de resíduos de produtos agrícolas não refinados (por exemplo, palhas, bagaços e tortas vegetais), que muitas vezes são descartados pelas indústrias agrícolas e, que podem ser usados como substratos para geração de produtos de maiores valores agregados, como, por exemplo, as enzimas hidrolíticas com aplicações industriais (lipases, proteases, amilases, celulasas, xantanases).

2.3.1. Substratos utilizados na FES para produção de lipases

Os substratos ricos em conteúdo lipídico usados nas indústrias de extração de óleos vegetais, como o girassol, a soja e o milho são usados na produção de lipases microbianas (fungos, leveduras e bactérias) por FES; também vem sendo utilizados subprodutos da agroindústria como o farelo da casca de trigo, da cevada e do arroz (FERNANDES *et al.*, 2007; CORADI, 2012).

Nesse sentido, surge uma nova e promissora fonte de óleo para a indústria do biodiesel e uma alternativa de substrato para FES, a semente de baru (*Dipteryx alata*), um vegetal que possui em média 38% de óleo em sua semente, além do alto teor de proteína.

O baru (*Dipteryx alata*), árvore da família *Fabaceae*, que atinge 15 a 20 m de altura (Figura 8), é encontrada no Bioma Cerrado, e faz parte do grupo das espécies nativas usadas pela população regional como fonte de renda familiar. Apresenta frutos do tipo ovoides, levemente achatados e de coloração marrom, com uma única semente (amêndoa) comestível e comercializada em empórios nos grandes centros, bastante apreciada pela população local. Os frutos quando maduros caem com facilidade da árvore e são aproveitados pelos animais, funcionando como complemento alimentar na época da estiagem (PEREIRA, 2010).

Figura 8– Árvore e semente do baru com a polpa.



Fonte: A autora

Takemoto (2001) pesquisou a composição química da polpa e da semente do baru, sendo que os componentes majoritários foram os lipídeos (38,2%) e proteínas (23,9%). O óleo da semente revelou-se altamente insaturado com 50,4 % de ácidos oleicos e 28,9% de linoleico.

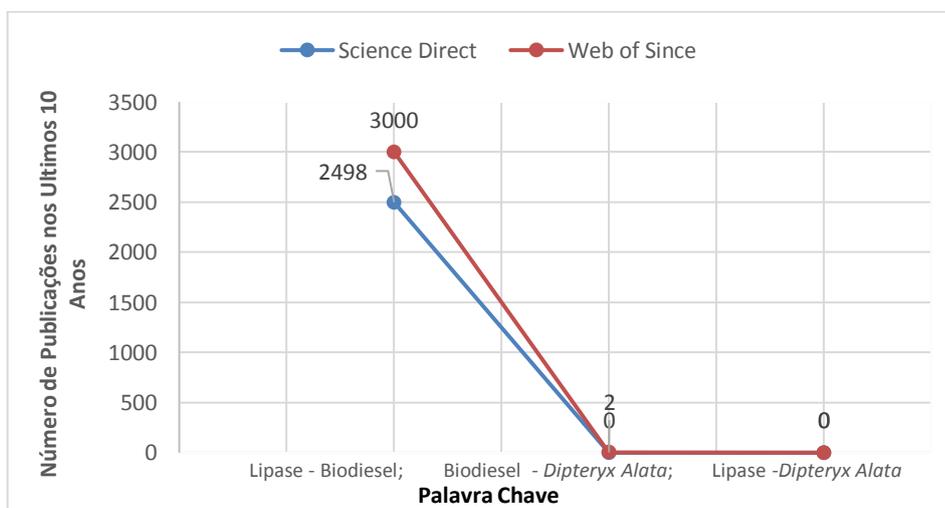
Além de ser uma excelente fonte de ácidos graxos insaturados e energia, o óleo dos frutos do cerrado vem ganhando espaço no mercado, pois contém um alto percentual de rendimento podendo ser utilizados para fins industriais (CICONINI *et al.*, 2013).

2.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO DA LITERATURA

Nos últimos anos, o biodiesel atraiu de forma considerável o interesse por um combustível de transporte alternativo, biodegradável e não poluente, tanto em estudos utilizando novas matérias-primas para sua produção como o uso de biocatalisadores alternativos que substituam os processos alcalinos convencionais que consomem energia e geram subprodutos indesejáveis, como sabões, que dificultam a separação e purificação do biodiesel. Neste sentido foi dedicada atenção especial ao uso de lipases como biocatalisadores na produção de biodiesel devido sua taxa de conversão favorável em condições de processamento relativamente simples.

A partir da revisão de literatura, podemos observar poucos trabalhos com o uso da semente de *Dipteryx alata*, tanto para matéria-prima de produção de biodiesel como para lipases. Para confirmar, foi realizada uma busca no Web of Science e no Science Direct sobre a quantidade de artigos publicados nos últimos 10 anos, empregando as palavras-chaves: lipase-biodiesel, lipase-*Dipteryx alata*, biodiesel-*Dipteryx alata* que resultou nos dados mostrados na Figura 9.

Figura 9 – Número de artigos publicados nos últimos 10 anos referente as palavras chaves pesquisadas: Lipase - Biodiesel; Biodiesel - *Dipteryx alata*; Lipase - *Dipteryx alata*.



Fonte: A autora.

De acordo com o levantamento realizado no Web of Science, foram encontrados um total de 3000 artigos sobre lipase-biodiesel; 2 sobre Biodiesel-*Dipteryx alata* e 0 sobre lipase-*Dipteryx alata*. Com relação ao Science Direct, foram encontrados um total de 2498 sobre lipase-biodiesel, 0 sobre Biodiesel-*Dipteryx alata* e 0 sobre lipase- *Dipteryx alata*.

Assim, ao analisarmos a Figura 9, verificamos poucos trabalhos publicados utilizando a semente de *Dipteryx alata* nos últimos 10 anos. Não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando-a como matéria-prima na produção das lipases e apenas dois trabalhos na produção de biodiesel.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da produção de lipase fúngica de *Penicillium sumatrense* por Fermentação no Estado Sólido (FES), utilizando como substrato a semente de baru (*Dipteryx alata*) e a sua avaliação catalítica em reações de síntese de ésteres do biodiesel.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Estudos de Fermentação

- Otimizar a produção de lipases por FES, utilizando a semente de baru como substrato, pelo estudo dos efeitos das seguintes variáveis no Planejamento Experimental 2²: granulometria do substrato, umidade do substrato e tempo de cultivo.

3.1.2 Estudos de Síntese

- Produzir a lipase nas condições otimizadas no Planejamento Experimental.
- Analisar a composição de ácidos graxos do óleo do baru através do método de cromatografia gasosa.
- Aplicar as lipases na reação de esterificação dos ácidos graxos livres obtidos por hidrólise do óleo da semente do baru e quantificar os ésteres de biodiesel pelo método espectrofotométrico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, no Centro de Engenharia e Ciências Exatas – Campus Toledo, nos Laboratórios de Microbiologia e Laboratório de Processos de Separação. Todas as análises de síntese foram realizadas no laboratório do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPD) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.1. REAGENTES

Neste trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico e grau de pureza requeridos nos experimentos, como a acetona PA (SYNTH), ácido oleico (SIGMA-ALDRICH, 99 %), Ágar BDA (KASVI), Goma Arábica (SYNTH), Etanol (SYNTH, 95%), Piridina PA (SYNTH) e acetato de cobre II PA (DINAMICA).

4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DA SEMENTE DE BARU E DA CASCA DE ARROZ

A semente de baru (*Dipteryx alata*), foi adquirida da empresa Biominas–MG. Com relação as sementes de baru estudadas, observou-se que as sementes apresentavam comprimento entre 2,5 a 3,2 cm (Figura 10 A).

Com relação a casca de arroz, observou-se que essas cascas apresentavam comprimento entre 1,2 e 1,5 cm (Figura 10 B). O resíduo agroindustrial casca de arroz (*Oryza sativa*) foi adquirido da empresa Moinho Iguazu, Itaipulândia-PR.

Figura 10. O baru (A) atuou como fonte de carbono, enquanto a casca de arroz (B) como suporte físico.



Fonte: A autora.

4.3. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA SEMENTE DE BARU E CASCA DE ARROZ

As análises de cinzas, teor de óleo, proteína e umidade foram realizadas pelo Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura– GEMaQ, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em Toledo-PR.

Para a análise da composição centesimal, utilizou-se a metodologia descrita conforme Associação de Químicos Agrícolas Oficiais (AOAC, 2005).

4.4. EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA SEMENTE DE BARU PARA APLICAÇÃO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BIODIESEL

O óleo foi extraído pelo método de Soxhlet. Após a extração do óleo da semente de baru, este foi utilizado na síntese enzimática do biodiesel.

4.4.1. Extração do óleo da semente de baru por Soxhlet

Neste método, os ácidos graxos são extraídos da amostra por contato de solvente e separados. Foi utilizado neste trabalho, como solvente o n-hexano, sendo adicionado em um Erlenmeyer, 100 g da semente de baru moída e 500 mL de n-hexano. Acoplou-se ao sistema de refluxo como o condensador e ligou-se o aquecimento (Figura 11). A temperatura foi mantida

a 65 °C durante 3 horas. Após a amostra foi filtrada e separada em rotoevaporador segundo a metodologia do American Oil Chemical Society (AOCS 1990, CORREIA 2009).

Figura 11- Extração do óleo de baru pelo método Soxhlet.



Fonte: A autora.

4.5. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma cepa fúngica endofítica isolada das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*), previamente identificada como *Penicillium sumatrense* por sequenciamento de DNA ribossomal de acordo com a metodologia descrita por STRINGARI (2009). Esta cepa foi gentilmente cedida pelo grupo de pesquisa da professora M.Sc. Roseli Mello, da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba-PR.

Para a manutenção da cepa, realizada a cada quatro meses, o fungo *Penicillium sumatrense*, foi incubado em meio BDA – cloridrato de tetraciclina (250 mg L⁻¹ de meio BDA) e Clorafenicol (1% m/v), em placas de Petri (Figura 12).

Figura 12- Fungo *Penicillium sumatrense* incubado em meio BDA–cloridrato de tetraciclina (250 mg L⁻¹ de meio BDA) e Clorafenicol (1% m/v).



Fonte: A autora.

O fungo foi incubado em estufa a 28°C por quatorze dias, após o crescimento foi transferido

e estocado em tubos estéreis contendo água esterilizada (CASTELANI, 1967). A cepa foi então armazenada, sob refrigeração, a 4°C.

4.6. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

4.7. PRODUÇÃO DA LIPASE

Para a produção da enzima, foi utilizado como substrato, a semente de baru (*Dipteryx alata*), adquirida da empresa Biominas – MG e o resíduo agroindustrial casca de arroz (*Oryza sativa*), adquirido da empresa Moinho Iguaçu – Itaipulândia \PR.

Nos estudos preliminares, avaliou-se a cinética de produção de lipases de *Penicillium sumatrense*, utilizando-se a semente de baru (*Dipteryx alata*) como substrato, durante 168 horas de fermentação, a 28°C, 55 % de umidade e granulometria do substrato entre 20 Mesh (0,84 mm) e 15 Mesh (1,18 mm). Os experimentos foram realizados em duplicata.

Os valores de atividade lipolítica foram obtidos pelo método titulométrico, conforme item 4.10.1.

4.7.1. Condições de Cultivo no Meio Sólido

Para avaliar a produção da enzima, utilizou-se como substrato a semente de baru (*Dipteryx alata*) e a casca de arroz (*Oryza sativa*). Enquanto a semente de baru serviu como fonte de nutrientes e energia para o crescimento fúngico, a casca de arroz foi um suporte para o microrganismo.

Os ensaios de FES foram realizados conforme metodologia descrita por Rodrigues *et al.* (2015), com adaptações. Para a preparação do inóculo foram utilizados frascos de erlenmeyers de 250 mL contendo o meio BDA – cloridrato de tetraciclina (250 mg L⁻¹ de meio BDA) e cloranfenicol (1% m/v). O fungo foi incubado em estufa a 28°C por 14 dias. Após o crescimento foi feita a solução de esporos, com pérolas de vidro e adição água estéril conforme figura 13.

Figura 13 – Solução de Esporos.



Fonte: A autora.

Após o preparo os meios foram esterilizados em autoclave, e após atingir temperatura ambiente foram acrescidos de 10^8 esporos g^{-1} do inóculo. Nos estudos cinéticos, os sólidos foram incubados em estufa a 28°C durante 24, 48, 72, 96 e 120, 144 e 168 horas (Figura 14). Este estudo cinético foi realizado para se determinar o pico máximo de produção de lipases. A produção de lipase foi acompanhada pela dosagem da atividade lipolítica (método titulométrico) no material fermentado. A atividade lipolítica é expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido fermentado (U gSS^{-1}).

Figura 14- Substratos inoculados assepticamente com o inóculo.



Fonte: A autora.

Para a FES foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL, contendo, 5 gramas do resíduo agroindustrial casca de arroz (*Oryza sativa*) e 5 g de semente de baru (*Dipteryx Alata*) com diferentes granulometrias (2,80 à 1,18 mm) e teores de umidade (50, 55 e 60%), utilizando-se tampão fosfato pH 7,0 (50 mM). Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.7.2. Secagem do Sólido Fermentado

Nos estudos cinéticos e nos experimentos utilizando o planejamento Experimental 2^2 , os sólidos fermentados foram congelados a 0 °C, por 24 horas, para interromper o crescimento fúngico. Após esse período, foram secos em estufa em circulação de ar por 48 horas à 30 °C, acondicionados em embalagens plásticas e armazenados em geladeira.

4.8. OTIMIZAÇÃO DA FES ATRAVÉS DO DELINEAMENTO FATORIAL

4.8.1. Otimização da produção de lipases de *Penicillium sumatrense* utilizando planejamento experimental 2^2

Após os estudos cinéticos, realizou-se um planejamento experimental 2^2 com ponto central, empregando as variáveis que influenciam na produção da enzima: granulometria do substrato e umidade. O objetivo do Planejamento foi otimizar a produção de lipases. Todos os experimentos foram realizados conforme descrito em 4.7.1. Os níveis das variáveis analisadas podem ser observados na Tabela 3. A variável resposta escolhida foi a atividade enzimática em U (Unidades Totais) de cada meio fermentado. As análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica 7.0.

Tabela 3– Planejamento experimental do delineamento fatorial 2^2 com ponto central aplicado no estudo da FES, para a produção de lipase de *Penicillium sumatrense*.

Experimento	Granulometria (Mesh)	Umidade (%)
1	(-1) 15,0	(-1) 50,0
2	(+1) 20,0	(-1) 50,0
3	(0) 17,5	(0) 55,0
4	(+1) 20,0	(+1) 60,0
5	(-1) 15,0	(+1) 60,0

Legenda: Os experimentos foram realizados em duplicata com triplicata no ponto central.

Os experimentos foram realizados com diferentes combinações das variáveis independentes a fim de encontrar o melhor efeito desses fatores para a produção da lipase.

4.9. ESTUDO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA

4.9.1. Hidrólise do óleo da semente de baru

Os ácidos graxos, presentes no óleo da semente de baru, extraídos pelo método de Soxhlet em n-hexano, conforme descrito no item 4.4.1 foram hidrolisados à quente segundo Costa (2012), com adaptações.

Dissolveu-se, em um erlenmeyer, 5 g do óleo em 100 mL de uma solução de etanol (95%) / hidróxido de potássio 1 mol L^{-1} (5%) e após realizou-se um sistema de refluxo durante 1 hora à $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Após resfriamento, adicionou-se 300 mL de água destilada e deionizada. A fase aquosa foi então acidificada com 100 mL de ácido clorídrico concentrado e os ácidos graxos livres extraídos com 600 mL de acetato de etila. Após a agitação em shaker por 5 minutos e repouso por 5 minutos, retirou-se a camada orgânica e evaporou-se o solvente em um rotoevaporador, obtendo-se assim os ácidos graxos livres.

Os ácidos graxos livres obtidos foram posteriormente esterificados conforme descrito em 4.9.2.

4.9.2. Reação de Esterificação por Adição Direta do Material Fermentado

Os estudos de síntese, foram realizados utilizando-se o sólido fermentado contendo a lipase, por adição direta.

Nestes experimentos, a enzima foi produzida por FES com a semente de baru, nas melhores condições do Planejamento Experimental 2², granulometria do substrato de 15 Mesh e umidade 60%.

A verificação de síntese dos ésteres do biodiesel foi realizada utilizando-se os ácidos livres obtidos pelo processo de hidrólise (item 4.9.1)

O estudo da cinética enzimática dos ésteres de biodiesel, permite avaliar o rendimento dos reagentes em produtos em função do tempo. A síntese foi conduzida em frascos erlenmeyers de 125 mL, contendo um volume reacional de 10 mL. Em cada frasco foram adicionados o sólido fermentado (60 U), 50 mM dos ácidos livres obtidos através da hidrólise, 450 mM de etanol e 10 mL de n-hexano. As reações foram incubadas em Agitador orbital a 37 °C e 180 rpm, e a cinética acompanhada por 400 minutos (0, 20, 40, 60, 90, 150, 210, 270, 350 e 400 minutos).

Este método foi utilizado para verificar qual o tempo necessário para converter os ácidos graxos em ésteres do biodiesel. O rendimento em éster foi avaliada pelo método pelo Método Espectrofotométrico (item 4.10.2) de Lowry-Tinsley (1976), baseado na curva de calibração do ácido oleico.

4.10. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.10.1. Determinação de Atividade Lipolítica- Método Titulométrico

A dosagem da atividade enzimática foi determinada pelo método titulométrico descrito por Rodrigues *et al.* (2015), com adaptações. Para as dosagens foi preparada uma emulsão contendo óleo de oliva (7,15% m/v) emulsão de goma arábica (7% m/v) em tampão fosfato 2,5 mM e pH 7,0. O ensaio foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL, adicionando-se 20 mL da emulsão e 1 grama do sólido fermentado. As amostras foram incubadas em Shaker, sob agitação, por 20 minutos, a 37 °C. A reação foi paralisada adicionando-se 20 mL de solução de etanol/acetona (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados em solução de NaOH (0,1 M) até pH 10. Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima

que libera 1 mM de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, sendo o resultado expresso em unidades totais por fermentação.

4.10.2. Determinação de Atividade Lipolítica-Método Espectrofotométrico

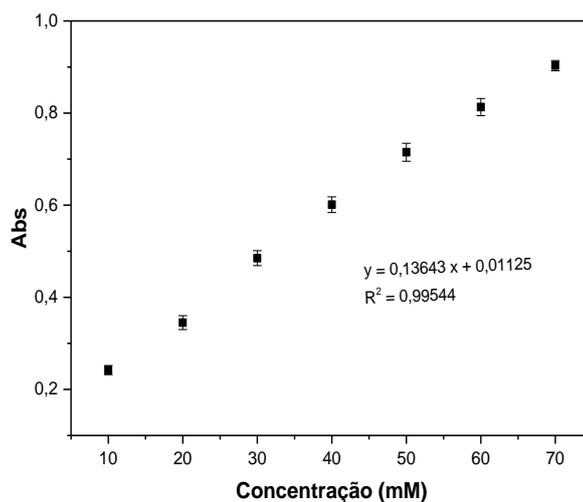
Este método espectrométrico (Lowry & Tinsley, 1976) foi utilizado para quantificar o teor residual de ácidos graxos durante a síntese enzimática do biodiesel, a partir do óleo da semente de baru.

Baseia-se na ligação entre os ácidos graxos livres e os íons cobre II em meio orgânico, possibilitando a avaliação do percentual de ácidos graxos convertidos a ésteres.

Adicionou-se 0,2 mL do meio reacional a 2,4 mL de tolueno e 0,5 mL da solução de piridina e acetato de cobre II (5%). As reações foram agitadas em vórtex por 30 segundos e a fase orgânica lida em espectrofotômetro em 715 nm.

O rendimento em éster foi calculado a partir do consumo do ácido graxo do meio reacional relacionada à absorbância através da curva de calibração (Figura 15) feita com ácido oléico (Sigma, 99 % PA) e nas mesmas condições do ensaio. O ácido oleico foi utilizado porque está em maior porcentagem no óleo de baru (50,4 %), segundo a literatura (ARAKAVA, 2018).

Figura 15 – Curva de Calibração do Ácido Oléico.



Fonte: O Autor.

4.10.3. Identificação dos ésteres do óleo de baru

Foi extraído o óleo da semente de baru (método de Soxhlet). A partir do óleo foi produzido o biodiesel metílico (transesterificação alcalina) (PEREIRA, 2015) e os ésteres de biodiesel foram quantificados por Cromatografia Gasosa (CG).

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Varian modelo Saturn 1800 com um detector 4000 MS (íon) equipado com uma coluna capilar DB225 de 30 mm (comprimento) x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 μm (espessura do filme). A rampa de temperatura foi: injetor a 250 °C, forno inicialmente a 50 °C, mantido por 2 minutos, aquecido a 90 °C (20 °C.min⁻¹ e então mantido por 1 minuto) e depois a 280 °C (5°C.min⁻¹ e depois mantido por 2 minutos). Espectro de ionização eletrônica foi obtido a 70 eV e 200 °C. O volume de injeção foi 1 μL com uma razão de 1:10. Análises depois da corrida foram feitas com o Saturn Workstation 5.1. Os ésteres foram identificados comparando o tempo de retenção com o padrão FAME (Fatty Acid Methyl Esther) comercializado pela Sigma-Supelco.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUBSTRATO

As sementes de baru (*Dipterix alata*) e a casca de arroz (*Oryza sativa*) foram submetidas a um processo de análise e avaliação das características físico-químicas de acordo com os procedimentos descritos por AOAC (2005). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da composição centesimal da semente de baru (*Dipterix alata*) e casca de arroz (*Oryza sativa*).

Parâmetro	Resíduo	
	Baru (SB)	Arroz (CA)
Cinzas	2,37 % ± 0,09	20,64% ± 0,78
Umidade	8,99% ± 0,07	8,93% ± 0,03
Proteínas	16,6% ± 0,78	2,49 % ± 0,10
Teor de Óleo	37,8 % ± 0,18	0,47% ± 0,12

Pode ser observado que as amêndoas apresentaram baixo teor de umidade, assim como os relatados por Vallilo *et al* (1990) (5,8%) e por Takemoto *et al.* (2001) (6,1%), que também analisaram as amêndoas cruas. Melhem (1972) observou teor médio de umidade para amêndoas da região do Estado de Minas Gerais de 10,7 %, superiores aos obtidos neste trabalho.

O teor de cinzas observado foi de 2,37 %, valor próximo aos obtidos para a amêndoa do baru por Fernandes *et al.* (2010) e Fraguas *et al.* (2014), de 3,34 % e 2,65 %, respectivamente.

O teor de óleo obtido foi de 37,8 % e se assemelha aos valores obtidos por outros autores como Almeida (1988) e Togashi (1993), que obtiveram teores de 38% e 40,27%, respectivamente.

Ao analisar os resultados da Tabela 4, verifica-se que o teor de óleo da casca de arroz (CA) é extremamente baixo (menor que 1%) em comparação à semente de baru (SB) (37,8% ± 0,18). A CA foi utilizada como suporte para a produção de lipases fúngicas por FES, enquanto o baru como substrato. Este substrato é viável e de fácil obtenção, se tornando ótima opção para a FES e produção de enzimas, uma vez que a semente de baru servirá como fonte de lipídios, que induzem a produção de lipases.

Outras vantagens do uso do baru (*Dipterix alata*) é que o próprio material fermentado pode ser utilizado como suporte para a enzima e aplicado diretamente em reações de síntese.

Conhecidos também a umidade de cada um dos substratos, pode-se ajustar a umidade disponível durante a fermentação de modo a favorecê-la.

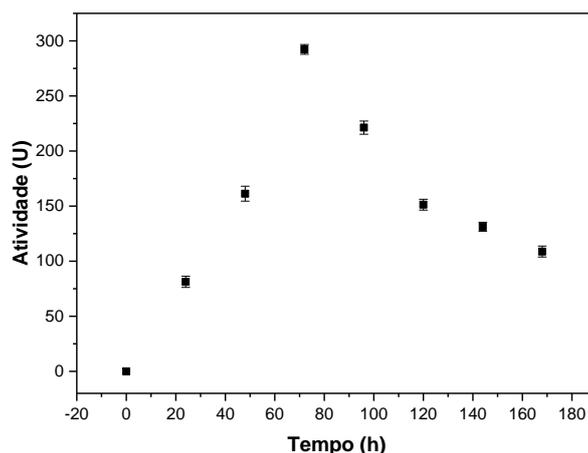
Após determinar a composição físico-química dos substratos, realizou-se então um estudo cinético de fermentação para os dois substratos escolhidos para o estudo.

5.2. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES DE *Penicillium sumatrense* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

5.2.1. Cinética de Produção da Enzima

Nos estudos prévios avaliou-se a cinética de produção de lipases de *Penicillium sumatrense*, utilizando-se a semente de baru como substrato, durante 168 h de fermentação, a 28 °C, 55 % de umidade e granulometria do substrato entre 20 e 15 Mesh (1,18 e 2,80 mm). Os resultados da cinética de produção de lipases estão apresentados na Figura 16.

Figura 16- Cinética de produção de lipase fúngica de *Penicillium sumatrense* por fermentação no estado sólido. Os ensaios foram realizados com umidade de 55 %. Experimentos realizados em duplicata com temperatura de 28°C.



Fonte: A autora.

Os resultados demonstraram que inicialmente houve um aumento de atividade lipolítica com o tempo de fermentação devido ao maior crescimento do microrganismo em fase

exponencial e maior disponibilidade de substrato. A maior atividade lipolítica (337,5 U ou 33,75 U gss⁻¹) foi obtida após 72 horas de fermentação.

Após o tempo de 72 horas, nota-se uma diminuição dos valores de atividade lipolítica, provavelmente devido à diminuição da fonte de carbono dos óleos presentes no substrato. Na determinação de lipídeos, realizada segundo o método AOAC (2005), verificou-se que no início da fermentação o valor era de 37,8 ± 0,18 % e após 96 horas de fermentação o valor reduziu para 18,2 %.

A queda na atividade lipolítica ocorre porque o fungo começa a produzir proteases para processar as outras fontes de carbono menos abundantes. Essas proteases são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas presentes em proteínas e outras enzimas, desnaturando e diminuindo a concentração de lipases (OLIVEIRA, 2013). Após realizar os estudos prévios, iniciou-se os estudos de FES através de um Planejamento experimental 2².

5.2.2. Otimização da produção de lipases de *Penicillium sumatrense* utilizando planejamento experimental 2²

Para otimizar a produção de lipases foi realizado um planejamento experimental 2² com triplicata do ponto central, empregando as variáveis que influenciam na produção da enzima: granulometria do substrato e umidade. Os níveis das variáveis analisadas podem ser observados na Tabela 5. A variável resposta escolhida foi a atividade enzimática em U (Unidades Totais).

Tabela 5- Resultados experimentais do delineamento fatorial 2² com ponto central aplicado no estudo da FES, utilizando a semente de baru como substrato, para a produção de lipase de *Penicillium sumatrense*.

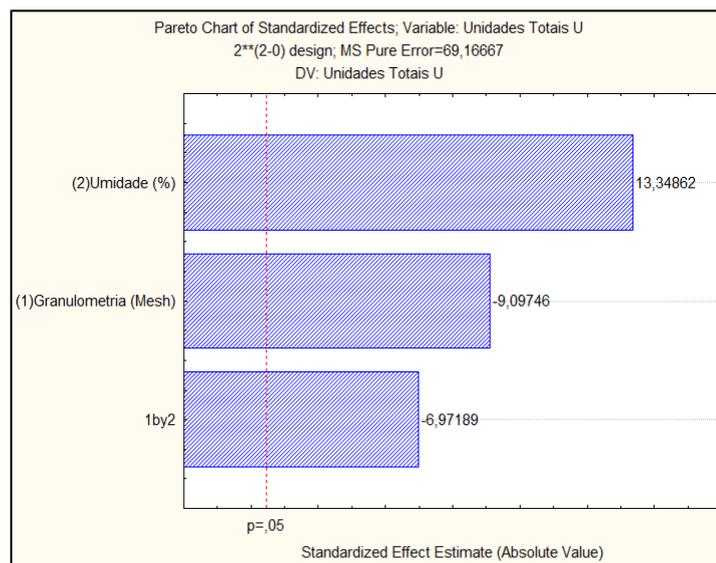
Experimento	Granulometria (Mesh)	Umidade (%)	Unidades Totais (U)
1	-1 (15,0)	-1 (50,0)	110,0/ 105,0
2	+1 (20,0)	-1 (50,0)	97,0/ 93,0
3	-1 (15,0)	+1 (60,0)	235,0/ 219,0
4	+1(20,0)	+1 (60,0)	123,0/ 142,0
5*	0 (17,5)	0 (55,0)	152,0
6*	0 (17,5)	0 (55,0)	147,0
7*	0 (17,5)	0 (55,0)	160,0

Legenda: Os experimentos foram realizados em duplicata. * Pontos centrais.

Os experimentos foram realizados com diferentes combinações das variáveis independentes a fim de encontrar o melhor efeito desses fatores para a produção da lipase.

Com intuito de avaliar o efeito das condições operacionais investigadas foi utilizado o gráfico de Pareto, o qual é apresentado na Figura 17.

Figura 17- Gráfico de Pareto na interação dos efeitos das variáveis na atividade enzimática, com um intervalo de 95% de confiança.



Para este experimento, foi assumido o valor de p igual a 0,05, que indica a probabilidade do resultado obtido ter uma confiança de 95%. O delineamento experimental e as análises dos efeitos gerados pelas variáveis bem como seus valores de p foram calculados empregando-se o software *Statistica 7.0*. Ao analisar a Figura 17 podemos observar que as duas variáveis (umidade e granulometria) foram estatisticamente significativas dentro dos níveis avaliados a 95% de confiança. O modelo foi validado a partir do valor de F calculado obtido (Tabela 6), para o intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6- Análise de variância (ANOVA) para o modelo de atividade enzimática obtida pelo fungo *Penicillium sumatrense*.

	SQ	GL	SM	F
Modelo	21751,91	4,00	5437,9775	78,6175
Erro	415,00	6,00	69,17	
Total	22166,91	10,00		

Legenda: SQ: Soma dos Quadrados; GL: Graus de Liberdade; SM: Soma dos Quadrados Médios; F: Distribuição F de Fisher-Snedecor

Observa-se pela Tabela 6 que o valor F de Fisher-Snedecor obtido para o modelo é 78,6175. Com os valores dos graus de liberdade do modelo e do erro, encontrou-se o valor do F tabelado como sendo 4,534. Como o valor F obtido é superior ao valor F tabela, o modelo é considerado significativo e válido. O modelo obtido, em variáveis codificadas, é apresentado na Equação 01, de Regressão em Unidades Codificadas.

$$U = 143,91 - (26,75 \cdot G) + (39,25 \cdot Umid) - (20,50 \cdot G \cdot Umid)$$

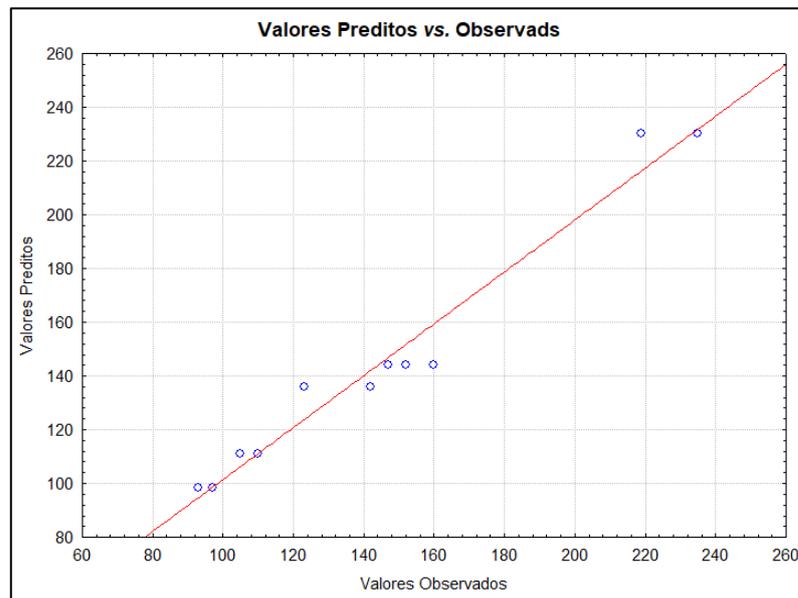
Onde: *UT*= Unidades Totais

Gran= Granulometria

Umi= umidade

Os valores obtidos das atividades enzimáticas observadas e previstas pelo modelo são apresentados na Figura 18 e sugerem uma correlação satisfatória entre valores experimentais e previstos.

Figura 18- Gráfico de paridade para mostrar a distribuição dos observados e os valores previstos para produção de lipase.



Nota-se na Figura 18, que os pontos observados e preditos não se distanciam muito da reta identidade, deste modo, torna-se possível afirmar que o modelo segue uma distribuição normal observando que há um bom ajuste. Além do mais, o modelo apresenta a distribuição do erro de forma aleatória, fato que elimina a existência de erros sistemáticos ou de que a análise seja tendenciosa, o que atribui uma maior confiabilidade ao modelo.

Os gráficos de contorno e de superfícies de respostas obtidas são apresentados nas Figuras 19 e 20, respectivamente, concluindo-se que o processo de produção da enzima é altamente influenciado pelo efeito combinado da granulometria e da umidade do meio fermentativo. Onde podemos notar que com o aumento da umidade e diminuição da granulometria há uma maior produção da enzima lipase.

Figura 19- Superfície de resposta para a influência das variáveis granulometria e umidade na atividade lipásica

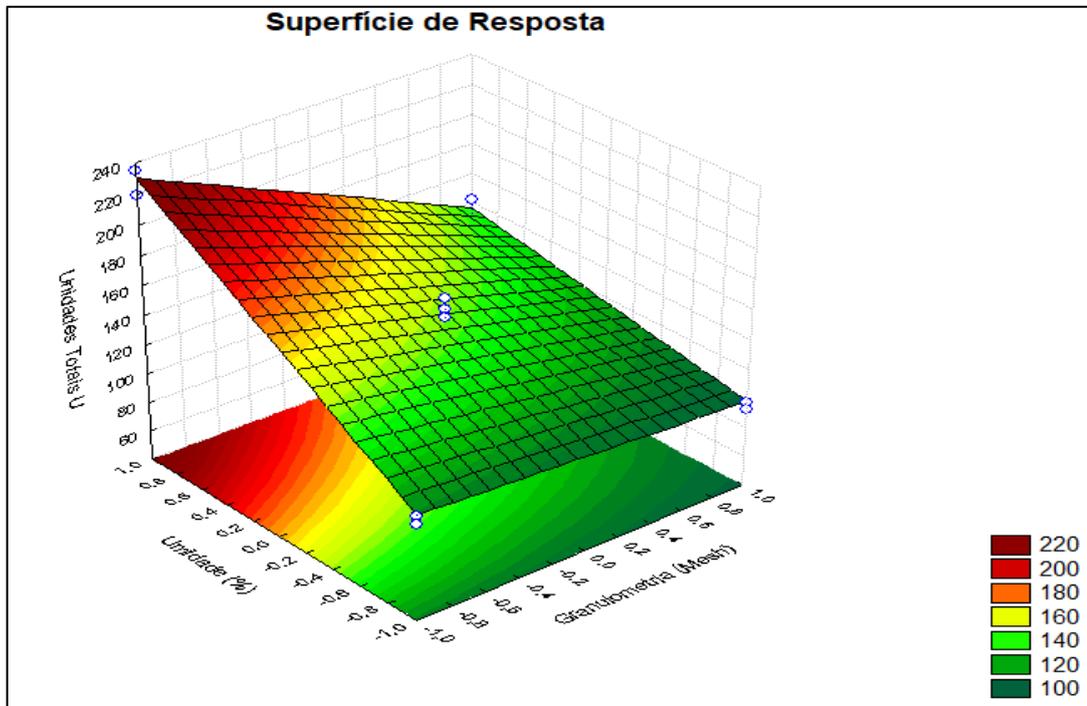
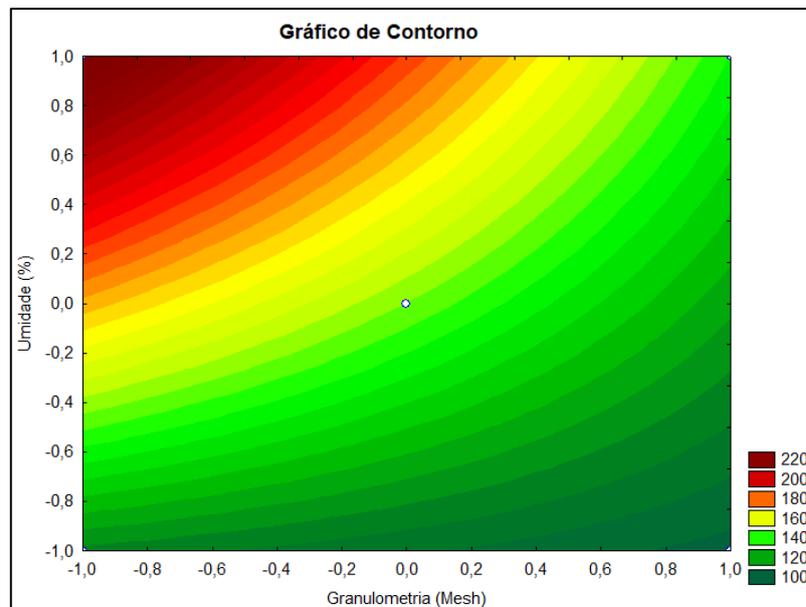


Figura 20- Curva de contorno que apresenta a interação entre as variáveis Granulometria e Umidade para a produção de lipase.



A granulometria é um parâmetro importante para o crescimento e atividade microbiana no substrato. O tamanho das partículas interfere diretamente no crescimento pois as partículas

menores aumentam a superfície de contato ocorrendo um melhor aproveitamento dos nutrientes o que favorece o crescimento fúngico. Porém partículas menores podem dificultar a troca gasosa e dissipação de calor, neste contexto a granulometria deve ser selecionada de acordo com cada estudo e processo em particular (PANDEY *et al.*, 1999). Analisando-se o gráfico de superfícies de resposta, verifica-se que a condição ótima para a granulometria foi de 15 mesh (1,18 mm).

Analisando-se os gráficos de Contorno e de Superfície de Resposta, (Figuras 19 e 20) observa-se que para aumentar o valor da resposta Unidade U, é preciso caminhar em direção ao menor valor da granulometria e para o maior valor da Umidade.

Verifica-se que não obtemos efetivamente um ponto ótimo, pois tem-se uma superfície plana. Indica-se um novo planejamento, onde estes pontos sejam considerados como os novos pontos centrais, no âmbito de encontrar o ponto ótimo.

Porém, dentro das limitações do teor de umidade na FES (entre 50 e 65%) os resultados obtidos foram ótimos. Segundo BINOD *et al.* (2015), a fermentação será classificada como submersa (FS) quando é conduzida com um teor alto de água livre, com uma umidade superior a 65% e, quando a fermentação ocorre com um índice de água livre reduzido, umidade inferior a 65%, a fermentação será caracterizada como fermentação em estado sólido (FES). Portanto, deve-se trabalhar com uma umidade que mantenha o equilíbrio entre a disponibilidade de água, expansão do substrato e efeitos de difusão do oxigênio.

Dutra (2007) estudou o efeito da umidade no processo de FES para produção de lipase utilizando *Aspergillus niger*, em substrato farelo de trigo e como indutor o óleo de mamona. Três condições de umidade (50, 60 e 70%), os resultados mostraram que o melhor teor de umidade para a produção de lipase foi de 60%. Um alto teor de umidade diminui a porosidade do substrato, diminuindo a troca gasosa, e um teor muito baixo de umidade acarreta menor crescimento do microrganismo, o que também diminui a produção de enzima (MAHANTA, GUPTA & KHARE, 2008).

Verifica-se na Tabela 6, que o ponto ótimo do Planejamento Experimental foi obtido com uma granulometria de 15 mesh e umidade de 60%, obtendo-se uma atividade enzimática total de 227 U, durante 72 horas de fermentação. Comparando-se os resultados com Krüger (2017), que realizou um estudo utilizando a torta de crumbe como substrato na FES e fungo *Penicillium sumatrense* como produtor de lipase, verificou-se que os valores obtidos são próximos aos encontrados neste trabalho. A autora obteve atividade enzimática máxima de

243,0 U em 96 horas de fermentação, com 60% de umidade, granulometria de 28 mesh (0,6 mm) e temperatura de 27 °C.

Oliveira *et al.* (2017) produziram lipase de *Aspergillus ibericus* por FES utilizando bagaço de azeitona e farelo de trigo e conseguiram uma atividade final de lipase de 223 ± 5 U, após 168 horas de fermentação. Rigo *et al.* (2009) obtiveram uma produção máxima de lipase de *Penicillium sp.* de 317 U, com o uso de farelo de soja. Souza *et al.* (2017) utilizaram a torta de canola e farelo de soja como matéria-prima para produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* por FES. A atividade máxima lipolítica obtida por FES, com torta de canola, após 28 horas de fermentação, foi de $72,6 \pm 2,4$ U g⁻¹. Já com farelo de soja, após 14 horas de cultivo, a atividade lipolítica máxima foi de $93,9 \pm 2,9$ U g⁻¹.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os estão de acordo com a literatura, e que os substratos são propícios para produção de lipases fúngicas via fermentação em estado sólido (FES).

5.3. ESTUDO DA SÍNTESE

5.3.1. Caracterização da Composição em Ácidos Graxos do Óleo de Semente Baru

Os ésteres analisados foram preparados por transesterificação básica, utilizando metanol como reagente. Na Tabela 7 estão apresentados os dados referentes ao perfil de ésteres do óleo de semente de baru, disponíveis na literatura comparados aos dados obtidos neste trabalho.

Tabela 7- Composição em ácidos graxos da semente de baru, disponíveis na literatura comparados com este trabalho.

Ácidos Graxos	Arakava, 2018	Takemoto <i>et al.</i> 2001	Carrazza e Ávila 2010	Pereira, 2015	Dados do autor, 2020.
Palmítico (C16:0)	7,39-7,60	7,60	7,60	6,28	8,69
Esteárico (C18:0)	4,62-5,40	5,40	5,40	5,87	8,01
Araquídico (C20:0)	1,07-1,10	1,07	1,07	1,38	-
Behênico (C22:0)	2,60-2,64	2,60	2,60	2,77	-
Lignocérico (C24:0)	2,10-3,02	2,10	2,10	0,21	4,31
Oléico (18:1)	48,37-50,40	50,40	50,4	46,66	50,22
Gadoleico (C20:1)	2,70	2,70	2,70	-	-
Linoléico (C18:2)	28,0-30,13	28,0	28,0	30,84	28,77
Linolênico (C18:3)	2,22	-	-	0,21	-

No que se refere ao perfil de ésteres do óleo extraído da semente de baru, pode-se observar na Tabela 7, que o óleo possui elevado grau de insaturação que deve-se a predominância dos ácidos oléico e linoleico, que variam de 48,37 a 50,40 % e 28,00 a 30,13, respectivamente.

Óleos vegetais ou gorduras muito insaturados (óleo de tungue) ou pouco insaturados (sebo de boi) levam à produção de biodiesel de baixa qualidade. No primeiro caso, o excesso de duplas ligações pode levar à polimerização pelo contato com o ar ou, quando aquecidos, à polimerização oxidativa do biodiesel, durante seu armazenamento ou uso. Já o excesso de cadeias completamente saturadas aumenta o ponto de fusão do combustível, o que limita o seu uso em regiões de clima temperado e frio. Estes problemas muitas vezes podem ser contornados com o uso de aditivos, por exemplo, antioxidantes, ou utilização de misturas de duas ou mais matérias-primas, de forma a obter misturas com propriedades que melhoram tanto o seu processamento para gerar o biocombustível quanto as propriedades finais do mesmo (SUAREZ *et al.*, 2009).

O índice de acidez é um dos parâmetros mais importantes para se avaliar a qualidade e estado de conservação dos óleos vegetais (MATA *et al.*, 2012).

Um processo de decomposição por hidrólise, oxidação ou fermentação altera o pH do meio. A decomposição dos triglicerídeos é acelerada pela luz e calor, e a rancidez é um indício da presença de ácidos graxos livres (PEREIRA, 2015).

Pereira (2015) determinou o índice de acidez do óleo de baru. O autor obteve um valor de 2,46% de ácidos graxos livres (AGL), indicando que o óleo de baru pode ser utilizado na produção de biodiesel por transesterificação alcalina, pois o limite recomendável para a etanólise é de 5% de AGL.

A composição de ácidos graxos na semente baru é qualitativamente semelhante à do óleo de amendoim (TAKEMOTO *et al.*, 2001).

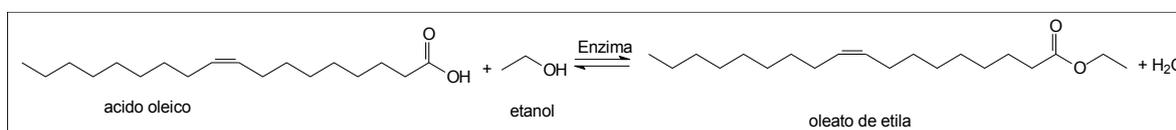
5.3.2. Reação de Esterificação Enzimática por Adição Direta do Material Fermentado

5.3.2.1. Método Espectrofotométrico

Os estudos de síntese foram realizados utilizando-se o sólido fermentado contendo a lipase, por adição direta. Nestes experimentos, a enzima foi produzida por FES com a semente de baru, nas melhores condições do Planejamento Experimental 2², granulometria do substrato de 15 Mesh e umidade 60%. Foram realizados estudos para a verificação de síntese de ésteres do biodiesel.

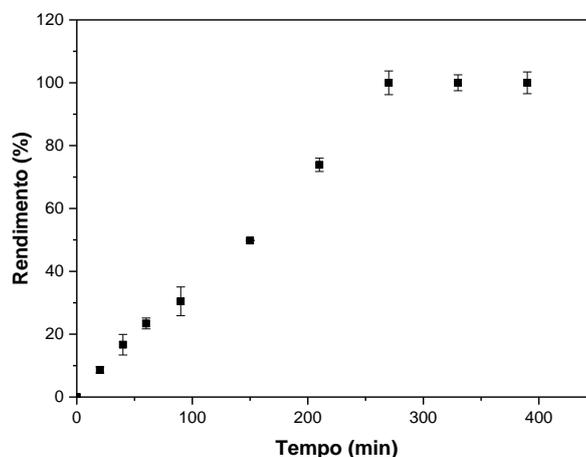
Utilizou-se como reação modelo, a síntese enzimática do oleato de etila (Figura 22), pois o ácido oleico está em maior porcentagem no óleo de baru, segundo a literatura (TAKEMOTO *et al.* (2001); CARRAZZA & ÁVILA, 2010; ARAKAVA, 2018).

Figura 21. Reação de síntese do oleato de etila catalisada pela lipase.



O estudo da cinética enzimática dos ésteres do biodiesel, conforme descrito no item 4.9.2, permite avaliar o rendimento dos reagentes em produtos em função do tempo. A síntese foi realizada com o sólido fermentado (60 U), 50 mM de ácidos graxos livres, 450 mM de metanol e 10 mL de n-hexano. As reações foram realizadas a 37 °C e acompanhadas por 400 minutos (Figura 23), segundo o método espectrofotométrico (4.10.2).

Figura 22- Cinética de rendimento do oleato de etila em função do tempo utilizando-se o sólido fermentado, contendo a lipase de *Penicillium sumatrense* produzida por FES. Condições: 37 °C, 10,0 mL de n-hexano, razão molar 1:9 (ácido:álcool) e 60,0 U.



A reação de esterificação enzimática foi utilizada para verificar qual o tempo necessário para converter os ácidos graxos em ésteres do biodiesel. O método utilizado foi o espectrofotométrico, sendo que esse não é utilizado na literatura para acompanhar reação de síntese de ésteres de biodiesel, apenas os métodos Cromatográficos.

Neste trabalho, utilizou-se o método espectrofotométrico, pois é um método mais econômico que o Cromatográfico. Analisando-se a Figura 23, verifica-se que a reação atinge o equilíbrio químico após 270 minutos de reação, com um rendimento em éster de 100 %.

Batista (2012), estudou a produção de biodiesel com óleo da semente de baru extraída por prensagem mecânica convencional, utilizando o hidróxido de potássio como catalisador na reação de transesterificação. Foi realizada a transesterificação com etanol e metanol, sendo que a utilização do metanol (MEOH) foi mais eficiente para produção do biodiesel (91%) se comparado com a conversão quando utilizado o etanol (86%). Comparando-se estes resultados de testes químicos e físicos com as normas oficiais (ASTM e 1424) para biodiesel, verifica-se que os dados confirmaram a qualidade do óleo de baru.

O fato de esses produtos atenderem aos requisitos oficiais de qualidade do biocombustível é uma evidência que usar óleo de baru para produção de biodiesel é uma abordagem viável.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a viabilidade da produção de lipases por *Penicillium sumatrense* em FES, utilizando o substrato semente de baru. E na conversação de ésteres, o rendimento foi de 100 % após 270 minutos de reação.

Os resultados apresentados neste trabalho são originais em três aspectos fundamentais: (1) na produção de lipases por FES usando um fungo com o substrato semente de baru e (2) na utilização do sólido fermentado contendo a enzima diretamente no meio reacional (3) na aplicação de um catalisador biológico na síntese de biodiesel de baru. O éster produzido poderá ser aplicado, no futuro, em outras reações para geração de produtos de interesse estratégico, como o biodiesel. O baru apesar de suas propriedades nutricionais não é um produto alimentar de rotina, e sendo uma espécie nativa do cerrado pode ser utilizada para reflorestamento ambiental incentivando e gerando renda para agricultura familiar.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este é um trabalho que abre muitas novas perspectivas. Trabalhos futuros poderão abordar temas como, por exemplo:

- Estudar a capacidade de síntese da lipase, em reações de transesterificação livre de solvente orgânico, para a produção do biodiesel.
- Otimizar a reação de transesterificação enzimática do óleo de baru através dos seguintes parâmetros: quantidade de biocatalisador, tempo de reação para obter a conversão do óleo em éster, temperatura, Razão Molar (óleo/etanol) e reutilização do biocatalisador.
- Avaliar os parâmetros químicos e físicos do biodiesel produzido.
- Estudo da capacidade de síntese da lipase de *Penicillium sumatrense*, produzida por FES, utilizando-se a adição direta do sólido fermentado em batelada alimentada em reações de transesterificação do biodiesel.

7. REFERÊNCIA

ALBUQUERQUE, M.H.O. **Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel metílico de girassol com adição diferentes concentrações de BHT pelo método Rancimat e PDSC.** In: **Congresso Brasileiro De Mamona, 4^o Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas,** João Pessoa, Inclusão Social e Energia: Anais - Campina Grande: Embrapa Algodão, v. 1, p. 18-23, 2010.

ALMEIDA, S.P. **Cerrado: Aproveitamento alimentar.** Planaltina, DF: Embrapa CPAC, p. 188, 1988.

ANDRADE, G.S.S. **Produção de biodiesel a partir de óleos vegetais usando células íntegras imobilizadas de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica.** 151f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, 2012.

ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução N° 42, de 19/04/2005.

AOCS - AMERICAN oil chemists society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society.** 4th ed. Champaign, USA, 1990.

ARANDA, D.A.G. *et al.* **The use of acids, niobium oxide, and zeolite catalysts for esterification reactions.** Journal of Physical Organic Chemistry, v. 22, n. 7, p. 709-716, 2009.

ARAKAVA, K.K. **Extração de óleo de amêndoas de baru via solventes alcólicas: avaliação da composição do óleo, das alterações proteicas e estudo de recuperação do solvente.** 212f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2018.

BABICZ, I. **Produção de diacilglicerois via Hidrólise Enzimática do óleo de palma.** 95 f. Dissertação (Mestrado em Química), Escola de Química, UFRJ, 2009.

BARROS, M.J.B.; STEINBERGER, M. **Uma Nova Geopolítica dos Recursos**

Agroenergéticos. Anais do I Congresso Brasileiro de Geografia Política, Geopolítica e Gestão do Território, Rio de Janeiro, p. 415-425, 2014.

BATISTA, A.C.F., de SOUZA RODRIGUES, H., PEREIRA, N.R. et al. **Aproveitamento do Óleo de baru (*dipterix alata* Vog) na produção de Biodiesel e Estudo das Características físicas e químicas das misturas Biodiesel/ óleo diesel**. Chemistry and Technology of Fuel and Oils 48, 13-16, 2012.

BENEVIDES, M.S.L. **Estudo sobre a Produção de Biodiesel a partir das oleaginosas e Análises de Modelos Cinéticos do Processo de Transesterificação Via Catálise Homogênea**. 76f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFRSA, Campus Angicos, 2011.

BEZERRA, J. M; BATISTA, R.O.; DA SILVA, P.C.M.; MORAIS, C.T.S.L.; FEITOSA, A.P. **Aspectos econômicos e ambientais da exploração salinera no Estado do Rio Grande do Norte**. Engenharia Ambiental, Espírito Santo do Pinhal, v. 9, n. 2, p. 003-020, 2012.

BINOD, P.; PANDEY, A.; SINDHU, R. **Solid-State Fermentation for the production of Poly(hydroxyalkanoates)**. Chemical and Biochemical Engineering, v.9, p. 173–181, 2015.

BÓDALO, A.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M. F.; MONTIEL, M. C.; GÓMEZ, M.; ORTEGA, S. **Screening and selection of lipases for the enzymatic production of polyglycerol polyricinoleate**. Biochemical Engineering Journal, Amsterdam, v. 46, p. 217-222, 2009.

BORNSCHEUER, U.T.; KAZLAUSKAS, R.J. **Hydrolases in Organic Synthesis: Regio and Stereoselective Biotransformations**, 2nd edition, Wiley-VCH: Weinheim, 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. 2012, p. 2839-2849, 2012.

CÂMARA DOS DEPUTADOS: **O Biodiesel e a inclusão social**. Brasília: Câmara dos deputados, Coordenação de Publicações, Série de estudos científicos e tecnológicos, n.1, 2003.

CARDENAS, F.; DE CASTRO, F.C; SANCHEZ-MONTERO, J.V.; SINISTERRA, M.; VALMASEDA, S.W.; ALVAREZ, E. **Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media**. Enzyme and Microbial Technology, v. 28, p. 145-154, 2001.

CARRAZZA, L.R.; ÁVILA, J.C.C. 2010. **Manual Tecnológico do Aproveitamento Integral do Fruto do Baru**. Brasília: Instituto Sociedade População e Natureza, 56p, 2010.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. **Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados**. Química Nova, v. 26, n. 1, p. 22-24, 2003.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. Química Nova, v.27, p. 146-156, 2004.

CICONINI, G.; FAVARO, S.P.; ROSCOE, R.; MIRANDA, C.H.B.; TAPETI, C.F.; MIYAHIRA, M.A M., NAKA, M. H. **Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil**. Industrial Crops and Products, p. 208–214, 2013.

COLLA, L.M.; REINEHR, C.O.; COSTA, V.A.J. **Aplicações e Produção de Lipases Microbianas. Applications and Production of Microbial Lipases**. Revista CIATEC – UPF, v.4, n. 2, p.1-14, 2012.

COSTA-FILHO, E.H. **Estudo da Produção Enzimática de Biodiesel Utilizando Óleo Residual de Etanol**. 103f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

COSTA, V.E.U.; DE AMORIM, H.L.N. **O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente.** Química Nova, v.22, n.6, p. 863-873, 1999.

COSTA, D.S. **Uso de óleos vegetais amazônicos da flotação de minério fosfáticos.** 191 f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

CORADI, G.V. **Produção de lipase por *fusarium oxysporum* em fermentação em estado sólido e sua aplicação em reações de síntese de ésteres de biodiesel.** 86f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

CORREIA, I.M.S. **Extração e Pirólise do óleo de girassol (*Helianthus annuus*) visando a produção de biocombustíveis.** 118 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

DRAPCHO, C.M.; NHUAN, N.P.; WALKER, T.H. **Biofuels Engineering Process Technology.** New York: McGraw-Hill, 2008.

DOS SANTOS, F.; REZENDE, C.A.; MARTÍNEZ, J. **Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide.** The Journal of Supercritical Fluids, v.107, p. 170-178, 2016.

DUTRA, J.C.V. **Produção de lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14 através de fermentação em estado sólido para a síntese de biodiesel.** xxxf. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

EGLOF, M.P.; SARDA, L.; VERGER, L. **Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase.** Protein Science, v.4, n.1, p.44-57, 1995.

ENCARNAÇÃO, A.P.G. **Geração de Biodiesel Pelos Processos de Transesterificação e Hidroesterificação, Uma Avaliação Econômica**, Universidade Federal do Rio De Janeiro – UFRJ, 2008.

FERNANDES, M.L.M. **Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistema de micelas reversas**. 2002. 120f. Dissertação (Mestrado)–Programa de Pós-Graduação em Química- Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2002.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 120f. Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Química- Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

FERNANDES, D.C.; FREITAS, J.B.; CZEDER, L.P.; NAVES, M.M.V. **Nutritional composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian Savanna**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 90, n. 10, p. 1650- 1655, 2010.

FOLEY, A; SMYTH, B.H.; PUKŠEC, T.; MARKOVSKA, N.; DUIĆ, N. **A review of developments in technologies and research that have had a direct measurable impact on sustainability considering the Paris agreement on climate change**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 68, p. 835-839, 2017.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S; SCABIO, A. **Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia**. Química Nova, v. 28, n. 1, p. 19-23- 2005.

FRAGUAS, R. M.; SIMÃO, A. S.; LEAL, R. S.; SANTOS, C. M.; ROCHA, D. A.; TAVARES, T. S.; MARQUES, T. R.; DUARTE, M. H.; MARCUSSI, S.; ABREU, C. M. P. **Chemical composition of processed baru (*Dipteryx alata* Vog.) almonds: Lyophilization and roasting**. African Journal of Agricultural Research, v. 9, p. 1061-1069, 2014.

FUREBY, C.; TABOR, G.; WELLER, H.G.; GOSMAN, A.D. **A comparative study of subgrid scale models in homogeneous isotropic turbulence**. Physics of Fluids, v.9, n.5, 1997.

GALLO, W.L.R. **Especificações De Novos Combustíveis: O Papel da ANP**. In Seminário Paranaense de Biodiesel, Londrina-PR, 2003.

GANDHI, N. **Applications of lipase**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.74, n.6, p.621-634, 1997.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; PLÍNIO, M.N.; LUCOND, O. **Ethanol learning curve- the Brazilian experience**. Biomass and Bioenergy, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2004.

GONÇALVES, K.M. **Relação Estrutura-Atividade de Lipases Comerciais Livres e em Micelas Reversas** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

GUTARRA, M.L.E. *et al.* **Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation**. Bioresource Technology, v. 100, p. 5249-5254, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology, v.39, p.235-251, 2006.

HANSEN, G.H. *et al.* **Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation**. Process Biochemistry, v. 50, p. 1327–1341, 2015.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 6th ed., Pergamon Press: Oxford, 1979.**

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology**. Trends in Biotechnology Amsterdam, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. **Bacterial biocatalyst: Molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications as lipases**. Annual Reviews in Microbiology, v. 53, p. 315-351, 1999.

JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, A. **Oily wastewater treatment using a novel hybrid PBR-UASB system.** Chemosphere, v. 67, n. 8, p. 1492-1501, 2007.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual do Biodiesel.** Blusher, 2^o Edição, p.6, 2018.

KRÜGER, C. **Síntese enzimática de éster do biodiesel a partir de lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense* produzidas por fermentação no estado sólido.** 84f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo-PR, 2017.

LAGE, F.A.P.; BASSI, J.J.; CORRADINI, M.C.C.; TODERO, L.M.; LUIZ, J.H.H.; MENDES, A.A. **Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system.** Enzyme Microbiology and Technology, v. 84, p. 56–67, 2016.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. **Rapid colorimetric determination of free fatty acids.** Journal American Oil Chemical Society, v. 53, p. 470-472, 1976.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** 133f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2006.

MACHADO, ACO.; DA SILVA, A.A.T.; BORGES, C.P.; SIMAS, A.B.C.; FREIRE, D.M.G., **Kinetic resolution of (R,S)-1,2-isopropylidene glycerol (solketal) ester derivatives by lipases.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic v.69, p. 42–46, 2011.

MARQUES, E.P. et al. **Metodologia analítica para glicerol em biodiesel: cenário atual.** **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. especial, Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento, 2011.

MATA, T.M.; SOUSA, I.R.B.G.; VIEIRA, S.S.; CAETANO, N.S. **Biodiesel Production from Corn Oil via Enzymatic Catalysis with Ethanol**. *Energy Fuels*, v. 26, p. 3034–3041, 2012.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. **Production of protease by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate**. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1729-1735, 2008.

MELHEM, T.S. **Fisiologia do desenvolvimento de *Dipteryx alata* Vog. 215f**. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

MENDES, L.F B. **Produção de Biodiesel, situação atual e perspectivas futuras**. Dissertação (Mestrado Faculdade de Ciência e Tecnologia), Universidade Nova de Lisboa, 2015.

MESSIAS, J.M. et al. **Lipases microbianas: Produção, Propriedades e Aplicações Biotecnológicas**. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v.32, n.2, p.213- 234, 2011.

MME/EPE. **Plano Decenal de Expansão de Energia Elétrica 2007/2016**. Brasília: MME/EPE, 2007.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M. **Biotransformação de Óleos e Gorduras**. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. n.19, p.28-31, 2001.

OLIVEIRA, F.; SALGADO, J.M.; ABRUNHOSA, L.; PEREZ-RODRIGUEZ, N.; DOMINGUEZ, J.M.; VENANCIO, A.; BELO, I. **Optimization of lipase production by solid-state fermentation of olive pomace: from flask to laboratory-scale packed-bed bioreactor**. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 40, n. 7, p. 1123-1132, 2017.

OLIVEIRA, A.C.D. ; WATANABE, F.M.F. ; FERNANDES, M. L. M ; VARGAS, J.V.C.; MARIANO, A.B. **Lipase production by endophytic yeast through factorial design**. *Academia Journal of Microbiology Research*, v. 1, p. 16-21, 2013.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. **New developments in solid state fermentation: I. Bioprocesses and products.** Process Biochemistry. v. 35, p. 1153–1169, 1999.

PEREIRA, N.R. **Estudos Oleoquímicos e Obtenção de Ésteres Metílicos e Etilícos a partir do Óleo Extraído do *Dipteryx Alata Vog (baru)*.** Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

PEREIRA, R. N. **Otimização do Processo de Produção de biodiesel pelas rotas Convecional e *in situ* a Partir das Amêndoas do *dipterix alata Vog (baru)* Utilizando Metodologia de Superfície Resposta.** Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação de Química Universidade Estadual de Uberlândia, 2015.

PIGHINELLI, A.L; MONTENEGRO T. et al. **Otimização da prensagem a frio de grãos de amendoim em prensa contínua tipo expeller.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, p. 66-71, 2008.

PORTELA, H.E. **Avaliação técnico-econômica de um empreendimento produtivo de biodiesel.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola Politécnica, 2008.

RAMOS, L.P. et al. **Tecnologias de Produção de Biodiesel.** Revista Virtual de Química, v.3, n.5, p. 385-405,2011.

RAMOS, L.P. et al. **Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis.** Revista Virtual de Química., v. 9, n 1, p. 317-369, 2017.

RIBEIRO, M.D. **Potencial para produção de biodiesel de algas verdes da ordem *Chlorellales* cultivadas em meio de baixo custo Blue Green Nitrogen Mix (BGNIM).** Anais do 7º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel, Florianópolis-SC, 2019.

RIGO, E. **Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), UFSC, Florianópolis-SC, 2009.

RODRIGUES, R.C. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleo vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual.** 183f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2009.

RODRIGUES, M.L F.; BORBA, C.E. ; SILVA, E.A. ; Oliveira, A.C.D. ; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R.W. ; SILVA, L.P. ; SILVA, M.G.V. ; STUANI, B. T. **Produção De Enzimas Hidrolíticas pelo Fungo Endofítico *Penicillium Sp.* isolado das Folhas de *Ricinus communis L.*** Revista Brasileira de Energia Renováveis, v. 4, p. 129-145-145, 2015.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. **Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

SALIHU, A.; ALAM, M. **Solvent tolerant lipases: A review.** Process Biochemistry, v. 50, n.1, p.86-93, 2015.

SANTOS A.F.X.G. **Catalisadores Heterogêneos para a Produção de Biodiesel.** Dissertação (Mestrado), Universidade Técnica de Lisboa, 2007.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato.** 148f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte-Natal, 2007.

SANTOS, J.R.D.J. et al. **Biodiesel de babaçu": avaliação térmica, oxidativa e misturas binárias biodiesel de babaçu".** Journal of chemical information and modeling, v. 53, n. 9, p. 1689-1699, 2008.

SCHRAG, J.; CYGLER, M. **Lipases and $\alpha\beta$ hydrolase fold**. *Methods in Enzymology*, v.284, p.85-107, 1997.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y.C. **Production, purification, characterization and applications of lipases**. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

SAXENA, R.K. et al. **Purification strategies for microbial lipases**. *Journal Microbiology Methodology*, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2003.

SBRT (Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas). **Fabricação do biodiesel a partir de sebo**. Junho, 2006.

SILVA, N.L. **Produção de biodiesel: Processo e caracterizações**. 201f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.

SILVA, L.C.M. **Processo de Produção de Biodiesel e Análise de Parâmetros de Qualidade**. Instituto Politécnico de Bragança Escola Superior de Tecnologia e Gestão. Bragança. 2014.

SILVA, J.C.T.; GONDIM, A.D.; GALVÃO, L.P.F.C.; EVANGELISTA, J.P.C.; ARAUJO, A. S.; JÚNIOR V.J.F. **Thermal stability evaluation of biodiesel derived from sunflower oil obtained through heterogeneous catalysis ($\text{KNO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$) by thermogravimetry**. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 119, p. 715–720, 2015.

SOUZA, C.E.C. **Adding Value to Agro-industrial Co-products from Canola and Soybean Oil Extraction Through Lipase Production Using *Yarrowia lipolytica* in Solid State Fermentation**. *Waste and Biomass Valorization*, v. 8, n. 4, p. 1163-1176, 2017.

SUAREZ, P.A.Z.; SANTOS, A.L.F.; RODRIGUES, J.P.; ALVES, M.B. **Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los**. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M.N. **Enzymatic transesterification for biodiesel production**. *Indian J. Biochem. Biophys*, v.40, p.392-399, 2003.

STRINGARI, D. **Sistemática e Diversidade Genética de Isolados de *Guignardia spp.* e *Phyllosticta sp.* nos Estados do Paraná e São Paulo**, Universidade Federal do Paraná, 2009.

STORCH, T.T.; CRUZ, J.M.; GETTENS, C.S.; OLIVEIRA, T.P.; SILVA, M.T. **Grau de acidez em óleo de girassol por prensagem**. In: XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2008.

TAKEMOTO, E.; OKADA, I.A.; GARBERLOTTI, M.L.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S. **Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 60, n. 2, p. 113-117, 2001.

TEIXEIRA, C. V. **Análise de Emissões e Desempenho de Motores Diesel Utilizando Óleo Diesel Comercial, Biodiesel de Palma (B100) e Misturas (BX)** Dissertação – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2010.L

TEIXEIRA, E.L. **Produção de biodiesel através de hidroesterificação do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*, Aubl.) via Catálise Heterogênea Ácida**. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2011.

TOGASHI, M. (1993). **Composição e caracterização química e nutricional do fruto do baru (*Dipteryx alata*, Vog.)**. Repositório da Produção Científica Unicamp: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255665>

UNPAPROM, Y.TS.; RAMESHPRABU, R. **Biodiesel from Green Alga *Scenedesmus acuminatus***. *International Journal of Sustainable and Green Energy*. Special Issue: Renewable Energy Applications in the Agricultural Field and Natural Resource Technology, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2015.

XIA, Y.; TANG, Z. **A novel perspective for techno-economic assessments and effects of parameters on techno-economic assessments for biodiesel production under economic and technical uncertainties**. *RSC Advances*, v. 7, p. 9402–9411, 2017.

ZORN, K.; GUINEA, I.; BRUDIEK, H.; BORNCHEUER, U. **Engineering and application of enzymes for lipid modification, an update.** Progress in Lipid Research, v. 63, n.1, p.153-164, 2016.