



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

MAXSUEL DA COSTA LEAL

**EFICIÊNCIA DO EXTRATO BRUTO DE ASPERGILLUS SP NA
CONVERSÃO DE ÓLEO DE BABAÇU EM BIODIESEL.**

**SUMÉ - PB
2019**

MAXSUEL DA COSTA LEAL

**EFICIÊNCIA DO EXTRATO BRUTO DE ASPERGILLUS SP NA
CONVERSÃO DE ÓLEO DE BABAÇU EM BIODIESEL.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Professora Dr^a Glauciane Danusa Coelho.

**SUMÉ - PB
2019**

L435e Leal, Maxsuel da Costa.
Eficiência do extrato bruto de *Aspergillus sp* na conversão de óleo de babaçu em biodiesel. / Maxsuel da Costa Leal. - Sumé - PB: [s.n], 2019.

48 f.

Orientadora: Professora Dr^a Glauciane Danusa Coelho.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Extrato bruto enzimático. 2. Enzimas. 3. *Aspergillus sp*. 4. Micologia. 5. Óleo de coco babaçu. 6. Transesterificação de óleo de babaçu. 7. Biodiesel. I. Coelho, Glauciane Danusa. II. Título.

CDU: 60(043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

MAXSUEL DA COSTA LEAL

**EFICIÊNCIA DO EXTRATO BRUTO DE ASPERGILLUS SP NA
CONVERSÃO DE ÓLEO DE BABAÇU EM BIODIESEL.**


Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:



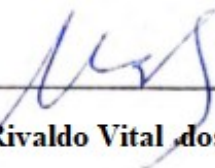
Professora Dr^a. Glauciane Danusa Coelho

Orientadora - UAEB/CDSA/UFCG



Professora Dr^a. Norma Maria de Oliveira Lima

Examinador I - UAEB/CDSA/UFCG



Professor Dr. Rivaldo Vital dos Santos

Examinador II - UAEB/CDSA/UFCG

Aprovado em: Dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Maria José por todo carinho e esforço dedicados a mim, sempre servindo como minha pequena grande fonte de amor, esperança e lucidez, me lembrando todos os dias os motivos pelos quais todas as lutas fazem sentido.

As minhas sobrinhas Maria Julia (mostrinha) e Maria Isys (mostrenga) por serem a melhor parte de mim e os maiores amores de uma vida.

Ao meu amado e inestimável “Quilombo” Amanda, Caroline, Crisostomo, Tamires, Thereza e Maria Emília pelas mais sinceras amizades ao longo desses últimos anos, que me garantiram inúmeros momentos de felicidade e alegria. Por toda a diversão, dramas, conversas e gargalhadas. A imagem de todos nós em meio a uma perfeita tarde de chuva é como eu me lembrarei dessa amizade por todo o sempre.

Aos meus queridos Rafaela e Jaildo por todo o suporte e amizade sem aos quais não seria possível chegar até aqui. Por todo carinho e sensibilidade com que sempre me trataram.

As maravilhosas amigas Antônia Isadora, Priscilla e Sabrina por todas as noites de comilança e risadas. Por sempre ficarem ao meu lado quando todo o resto se punha contra mim.

Aos meus melhores amigos Anna Karla, Diogo, Jailson e Everton por todas as conversas de incentivo, todas as risadas e momentos de alegria capazes de amenizar todas as dores e potencializar todas as alegrias.

A Eliel, George, Judieldo e Emanuelle pela amizade e incentivo e por serem os mais estranhos extremos emocionais que pude juntar num cômodo. Foi muito divertido.

As inesquecíveis Rita de Cassia, Dona Rita e Regina pela acolhida e aconchego que somente uma mãe poderia me dar, e claro pelas suas comidas deliciosas que sempre aqueceram o coração e o estômago.

A “tia” Conceição e Belinha por me receberem em sua casa durante meu estágio em João Pessoa.

A todos aqueles que mesmo me decepcionando, me fizeram lembrar de quem eu era antes de toda essa batalha começar e serviram de degraus para que eu soubesse quem quero ser, quando tudo isso acabar.

Aos professores Arianne, Bruno, Jean que me mostram o quanto aprender pode ser árduo e ao mesmo tempo um grande prazer, mesmo que eles tenham me trago as maiores dificuldades dessa jornada.

A minha orientadora de TCC Glauciane Danusa Coelho, por todo aprendizado, por todo conhecimento compartilhado e todo auxílio concedido durante a elaboração deste trabalho.

A professora Antônia Lucia por todo o suporte a mim concedido na realização deste trabalho.

Também, não posso deixar de ser grato ao Laboratório de Alimentos (LBA) e ao Laboratório de combustíveis e materiais (LACOM) da UFPB por me cederem espaço para minha pesquisa. E todos que lá me auxiliaram.

Ao Laboratório de Microbiologia da UFCG/CDSA, pelo apoio nas atividades de pesquisa.

Ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido - Universidade Federal de Campina Grande.

Deixo a todos os meu mais sincero obrigado por todos os ensinamento e aprendizados que tive o prazer de ter com cada um vocês.

“Ninguém além de nós mesmos pode libertar nossas mentes. ”

Bob Marley

"Um cientista é um homem tão débil e humano como qualquer outro; no entanto, a busca científica pode enobrecê-lo, inclusive na contramão de sua vontade."

Isaac Asimov

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do extrato bruto de *Aspergillus sp* no processo de transesterificação do óleo de coco babaçu. O coco babaçu foi obtido na cidade de Coelho Neto no Estado do Maranhão. O óleo foi extraído com o auxílio de uma prensa hidráulica (prensagem descontínua). O óleo foi devidamente caracterizado. Para a obtenção do extrato bruto enzimático contendo lipase, o fungo *Aspergillus sp*, isolado a partir do efluente de uma Indústria de Laticínio, foi inoculado (10^8 esporos.mL⁻¹) em farelo de casca de banana, suplementado com óleo de soja residual (1%) em fermentação no estado sólido, durante 120h. A determinação da atividade lipolítica foi realizada por titulação, segundo Pastore *et al.* (2003). Para a produção do biodiesel foi realizada a esterificação do ácido oléico e a transesterificação do óleo de babaçu via catálise enzimática. As reações foram realizadas em erlenmeyers de 125 ml contendo o óleo de babaçu (5,0 g, 5,4 mL) e extrato enzimático (1mL) e foram mantidas em agitador orbital (Tecnal) a temperatura ambiente e 130 rpm. Após os períodos de 0,1,2 e 3 horas foi adicionado o etanol (15,0 mL) a cada uma das amostras do experimento realizado em quadruplicata. A caracterização da análise do produto gerado foi avaliada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O óleo de babaçu apresentou parâmetros dentro do padrão de qualidade estabelecido de acordo com os parâmetros indicados pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 270 de 22/09/2005 da ANVISA. O fungo produziu extrato bruto contendo 170 U.mL⁻¹ de lipase e 4,75 de pH. O produto gerado pela ação da lipase indicando que não houve a conversão do óleo, sendo constituído basicamente de etanol.

PALAVRAS-CHAVE: Extrato Bruto Enzimático. Enzimas. Biodiesel. Transesterificação. Babaçu.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the potential of the raw extract of *Aspergillus* sp in the process of transesterification of babassu coconut oil. The babassu coconut was obtained in the city of Coelho Neto in the interior of the State of Maranhão. The oil was extracted with the help of a hydraulic press (discontinuous pressing). The oil was duly characterized. To obtain the crude extract containing lipase, the fungus *Aspergillus* sp, isolated from the effluent of a Dairy Industry, was inoculated (10^8 spores.mL⁻¹) in banana peel bran, supplemented with residual soybean oil (1%) in fermentation in solid state, during 120h. The determination of lipolytic activity was performed by titration, according to Pastore et al. (2003). For the production of biodiesel, the esterification of oleic acid and the transesterification of babassu oil via enzymatic catalysis were performed. Reactions were performed in 125-ml Erlenmeyers containing babassu oil (5.0 g, 5.4 mL) and enzymatic extract (1 mL) and were maintained in an orbital agitator (Tecnal) at room temperature and 130 rpm. After the periods of 0.1.2 and 3 hours, ethanol (15.0 mL) was added to each of the samples in the quadruplicate experiment. The quality of the product generated was evaluated by infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR). The babassu oil presented parameters within the quality standard established in accordance with the parameters indicated by the Resolution of the Collegiate Board of Directors - RDC n° 270 of 22/09/2005 of ANVISA. The fungus produced raw extract containing 170 U.mL⁻¹ of lipase and 4.75 of pH. The product generated by the action of lipase indicating that there was no oil conversion, being basically ethanol.

KEYWORDS: Enzymatic Raw Extract. Enzymes. Biodiesel. Transesterification. Babaçu...

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

atm	Atmosfera
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	Sociedade Americana dos Químicos de Óleo
ASTM	American Society for Testing Materials
ATR	Reflectância Total Atenuada
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CEN	Comité Europeu de Normalização
EC	<i>Enzyme Commission Numbers</i>
EN	Norma Europeia
FES	Fermentação em Estado Sólido
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier
g	Gramma
h	Hora
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
KOH	Hidróxido de potássio
Kpa	Quilopascal
LAT	Laticínio
m	Massa
M	Mol
meq	Miliequivalentes
mg	Miligrama
mi	Massa inicial
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
NaOH	Hidróxido de sódio
NBR	Norma Brasileira
PB	Paraíba
PI	Período de Indução
PNPSB	Plano Nacional de Promoção das Cadeias de Produtos da Sociobiodiversidade
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação Por Minuto
SMAOFD	Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives
sp	Espécie Indeterminada
T	Temperatura
t	Tempo
U _{B.U.}	Umidade em Base Úmida
U	Unidade de Atividade Enzimática
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
v	Números de onda de alongamento de ligação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVOS GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 CARACTERÍSTICAS DO BABAÇU (<i>Attalea speciosa</i>)	14
3.2 USO DE ÓLEOS VEGETAIS COMO BIOCOMBUSTÍVEIS	17
3.3 BIODIESEL.....	18
3.4 ESPECIFICAÇÕES DO BIODIESEL.....	20
3.5 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO BIODIESEL.....	22
3.6 TRANSESTERIFICAÇÃO	24
3.6.1 Fatores de influenciam na reação de transesterificação	24
3.6.2 Catalise enzimática	28
3.6.3 Transestrificação enzimática	32
3.7 FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE BABAÇU	36
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO OLEO DE BABAÇU.....	37
4.2.1 Índice de iodo	37
4.2.2 Índice de acidez	38
4.2.3 Peróxido	38
4.2.4 Saponificação	39
4.2.5 Viscosidade	40
4.2.6 PetroOxy	41
4.2.7 Rancimat	42
4.3 MICRO-ORGANISMOS	43
4.3.1 Reativação do microrganismo	44
4.3.2 Preparo do inóculo	44
4.4 PRODUÇÃO DE LIPASES	45
4.4.1 Preparo do substrato	45
4.4.2 Fermentação em estado sólido (FES)	45
4.4.3 Extração das enzimas	46
4.4.4 Determinação do teor de umidade	46

4.4.5 Determinação do pH	47
4.4.6 Determinação da atividade enzimática.....	47
4.5 PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	48
4.5.1 Separação do biodiesel do coproduto	48
4.5.2 Determinação de parâmetros de qualidade do biodiesel	49
5 RESULTADOS E DISCURSÕES	49
6 CONCLUSÕES.....	55
REFERENCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A maior parte de toda a energia consumida no mundo é proveniente do carvão, do gás mineral e do petróleo, combustíveis fósseis que correspondem a cerca de 80% do consumo energético global. O uso constante desses combustíveis ocasiona a liberação na atmosfera de fuligem, material particulado de carbono e gases tóxicos tais como o monóxido de carbono, óxido de enxofre e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (LIMA, 2005). Além da queima dos combustíveis fósseis produzir gases diretamente ligados ao efeito estufa, o esgotamento das fontes de energia fóssil, tem ocasionado a crise mundial do petróleo, e por isso, países industrializados têm sido pressionados e motivados a buscar por fontes alternativas e “limpas” de energia, como por exemplo o biodiesel, biocombustível produzidos a partir da reação entre óleos vegetais/gordura animal com álcoois (metanol e etanol), assumindo assim na convenção de Kyoto de 1997 metas para redução de emissão de gases na atmosfera (PARENTE, 2003). No final do século XIX foram iniciados os estudos de produção de biodiesel e desde então, diversas pesquisas tem sido realizadas com o objetivo de criação de melhores alternativas do uso dos óleos vegetais em motores do ciclo diesel, dentre as quais pode-se destacar: microemulsão com metanol ou etanol, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com álcoois de cadeia pequena (LIMA et al., 2007), sendo que a última, atraiu a atenção por constituir um processo relativamente simples e pelo fato do produto obtido (biodiesel) possui propriedades muito similares às do petrodiesel (GARDNER et al., 2004).

O biodiesel é uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis, capaz de contribuir para a diminuição na emissão de CO₂, SO_x e hidrocarboneto aromático durante o processo de combustão (ABREU et al., 2004). O uso de biodiesel como combustível vem crescendo aceleradamente no mundo inteiro, pois a cadeia de produção deste tem um potencial promissor em vários setores, tais como social, ambiental e tecnológico (SRISVASTAVA et al., 2000).

No contexto global, diversos países como Alemanha, França, Brasil, Argentina, Estados Unidos, Itália e Malásia já possuem uma produção e comercialização do biodiesel, bem como políticas para o desenvolvimento de biodiesel, em escala industrial. Sendo a Alemanha o maior produtor e consumidor mundial de biodiesel a partir do óleo de colza (SANTOS, 2008).

O Brasil por sua vez, vem buscando o desenvolvimento sustentável de combustíveis alternativos que possam ser utilizados em substituição ao diesel de petróleo, por meio da exploração de sua grande biodiversidade vegetal. Dentre as diversas espécies nativas de oleaginosas para a produção, pode-se destacar o babaçu (*Orbignya martiniana*), que vem sendo amplamente explorada devido a sua alta produção principalmente nos estados do Pará,

Tocantins, Piauí e Maranhão, sendo este último responsável por cerca de 80% da produção nacional que gira em torno de 60 mil toneladas por ano segundo dados de 2004 obtidos pelo SINDOLEO.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

Avaliar o potencial de produção de biodiesel a partir do óleo de coco babaçu, utilizando lipases do fungo *Aspergillus sp.*, isolado de efluente de laticínio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir extrato bruto de *Aspergillus sp.* contendo lipase por fermentação semissólida;
- Obter e caracterizar o óleo de babaçu;
- Realizar a transesterificação do óleo de babaçu utilizando a lipase de *Aspergillus sp.* como catalizador enzimático;
- Caracterizar o produto gerado via enzimática

3 REFERENCIAL TEÓRICO.

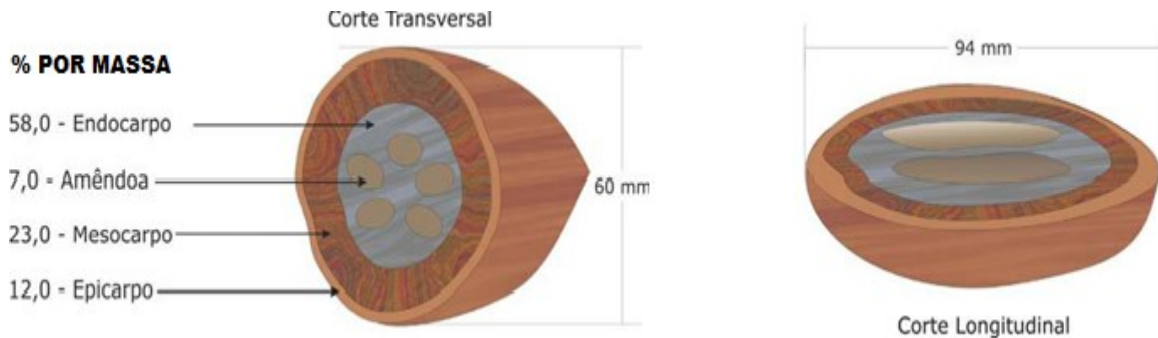
3.1 CARACTERÍSTICAS DO BABAÇU (*Attalea speciosa*)

A palmeira do babaçu (*Attalea speciosa*) é uma planta nativa das regiões Norte e Nordeste e áreas de cerrado com ocorrência nos estados do Maranhão, Tocantins e Piauí na região conhecida como Mata dos Cocais (formada pelos biomas: Cerrado, Caatinga e Amazônia). (LEITMAN, et al., 2012) Além de sua predominância nesses três estados, o babaçu pode ser encontrado em regiões do Amazonas, Pará, Bahia e Ceará. Os babaçuais ocupam uma área cerca de 196 mil Km² ao longo do território brasileiro, sendo o Maranhão o principal produtor de amêndoas de babaçu e, responsável por mais de 90% da produção nacional. A árvore pode chegar 10 a 30 metros de altura, com cada palmeira podendo apresentar de três a cinco cachos que produzem entre 300 e 500 cocos (SOUZA, 2017a).

Segundo CARAZZA (2012), de acordo com o censo agropecuário, a amêndoa do babaçu está em segundo lugar como o produto florestal não madeireiro mais comercializado no Brasil, produzindo entorno de 120 mil toneladas anuais. A venda dessa produção chega a ultrapassar a produção do açaí (que é o produto não madeireiro mais vendido no país) em valores comerciais, alcançando quase R\$ 150 milhões. A área de abrangência da palmeira babaçu (13 a 18 milhões de hectares em 279 municípios, situados em 11 Estados), bem como as diversas potencialidades e atividades econômicas que podem ser desenvolvidas a partir dessa planta demonstram a importância para as famílias que dela sobrevivem, e trazem à tona a relevância da forte mobilização político-social em prol do acesso livre aos babaçuais. Essas características favoreceram a estruturação de uma estratégia nacional com foco no fortalecimento da cadeia produtiva do coco babaçu, entre o Plano Nacional de Promoção das Cadeias de Produtos da Sociobiodiversidade (PNPSB), que visa a solução dos gargalos da cadeia produtiva, para o fortalecimento e consolidação. (PLANAFE/MMA,2017)

O coco babaçu mede aproximadamente de 8 a 15 cm de comprimento, é composto fisicamente por uma parte externa fibrosa (epicarpo), uma parte intermediária fibrosa-amilácea (mesocarpo) e, uma parte interna lenhosa (endocarpo), onde estão inseridas as amêndoas conforme descrita e ilustrada na Figura.1

Figura 1 - Tamanho e estrutura média de frutos do babaçu.



Fonte: (MAY, 1990)

O coco babaçu tem formato elipsoidal, mais ou menos cilíndrico, com massa variando entre 40 a 400g com média de 3 a 4 amêndoas, sendo que em alguns casos pode ser encontrado um número maior de amêndoas (Junior, 2003). O babaçu ainda é considerado uma das plantas mais ricas em óleo vegetal, sendo este extraído diretamente das amendoas. O óleo de babaçu, assim como todos os óleos vegetais, é constituído majoritariamente da condensação entre o glicerol e ácidos graxos que formam ésteres, os triacilgliceróis. Os ácidos graxos naturais encontrados com maior frequência são conhecidos pelos seus nomes comuns, como o ácido butírico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico e araquídico entre os saturados, e os ácidos oleico, linoleico, linolênico e araquidônico entre os insaturados (MORETTO e FETT, 1998; BOBBIO e BOBBIO, 2001). No óleo de babaçu, o ácido láurico (C 12:0) é predominante, o que parece facilitar a reação de transesterificação, pois os ácidos láuricos possuem cadeias carbônicas curtas que permitem uma interação mais efetiva com o agente transesterificante, de modo que se obtém um produto com excelentes características físico-químicas inclusive quando na transesterificação é utilizado um catalisador é heterogêneo (LIMA et al., 2007).

As gorduras láuricas, como as existentes no óleo de babaçu, são de grande importância no setor industrial, visto que apresentam resistência à oxidação não enzimática e ao contrário de outras gorduras saturadas, possuem temperatura de fusão baixa e bem definida (Robinson, 1991). De acordo com Machado et al (2006), atualmente gorduras láuricas são muito utilizadas na indústria de cosméticos, mas por causa de suas propriedades físicas e de resistência à oxidação, são ainda muito empregadas na preparação de gorduras especiais para confeitaria, sorvetes, margarinas e substituintes de manteiga de cacau (Haumann, 1992; Lawson, 1995; Soares & Franco, 1990). A Tabela 1 demonstra o alto teor de ácido láurico do coco babaçu (Bezerra, 1999)

Tabela 1 - Composição em ácidos graxos e índice de iodo do óleo de coco babaçu de acordo com diferentes autores.

Ácido graxo (%)	MARTIN & GUICHARD (1979)	WHITE(1992)	ROSSEL(1993)
Capróico	nd	0,4	nd
Caprílico	nd	5,3	5,5
Cáprico	nd	5,9	5,5
Láurico	44-47	44,2	43
Mirístico	15-18	15,8	16
Palmítico	6-9	8,6	9
Esteárico	3-5	2,9	3,5
Oléico	12-16	15,1	15
Linoléico	1-2	1,7	2,6

Fonte: Bezerra (1999). nd = não determinado

Na extração do óleo do coco babaçu utiliza-se inicialmente a prensagem para reduzir o teor de óleo na torta a cerca de 12% a 15%, nas prensas mais modernas. O que sobra é extraído por solvente (Tandy, 1991; Wan, 1991). Na extração por solvente, os equipamentos mais modernos chegam a extrair até 98% do óleo, deixando um teor de óleo residual inferior a 1% no farelo e pode, em alguns casos, chegar a 0,5% (MACHADO, 2006).

No Brasil, não há um órgão responsável pela regulamentação do padrão de qualidade de óleos e gorduras destinados a produção de biodiesel. Contudo, para isso adotam-se normas de alguns órgãos internacionais tais como: da ISO, do SMAOFD, do AOCS e da ABNT. Ainda se verifica que o óleo de babaçu tem o uso quase que exclusivo para a produção de materiais de higiene e limpeza. E a utilização no setor alimentício, principalmente para a produção de margarina, aparece como secundário. No entanto, há um interesse no desenvolvimento de novos mercados e alternativas para uso do óleo de babaçu.

Informações da literatura sobre a viabilidade econômica para a produção de energia a partir dos recursos da biomassa disponíveis no Brasil apontam o babaçu como uma possível fonte sustentável de biomassa para a geração de biocombustíveis (TEIXEIRA, 2005; TEIXEIRA, e CARVALHO, 2007).

Conforme dados da ANVISA o óleo de babaçu apresenta propriedades físico-químicas de grande interesse para o mercado de energias renováveis (Tabela 2).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do óleo de babaçu.

PROPRIEDADES	LIMITES
Índice de refração	1,448 - 1,451
Densidade relativa, 40°C / 25°C	0,911 – 0,914
Índice de iodo (wijs)	10-18
Matéria insaponificável g / 100g	Máximo 1,2%
Acidez/ g de ácido oleico / 100g	0.3% (óleo clarificado) 5,0% (óleo bruto)
Índice de peróxido, meq/kg	Máximo de 10

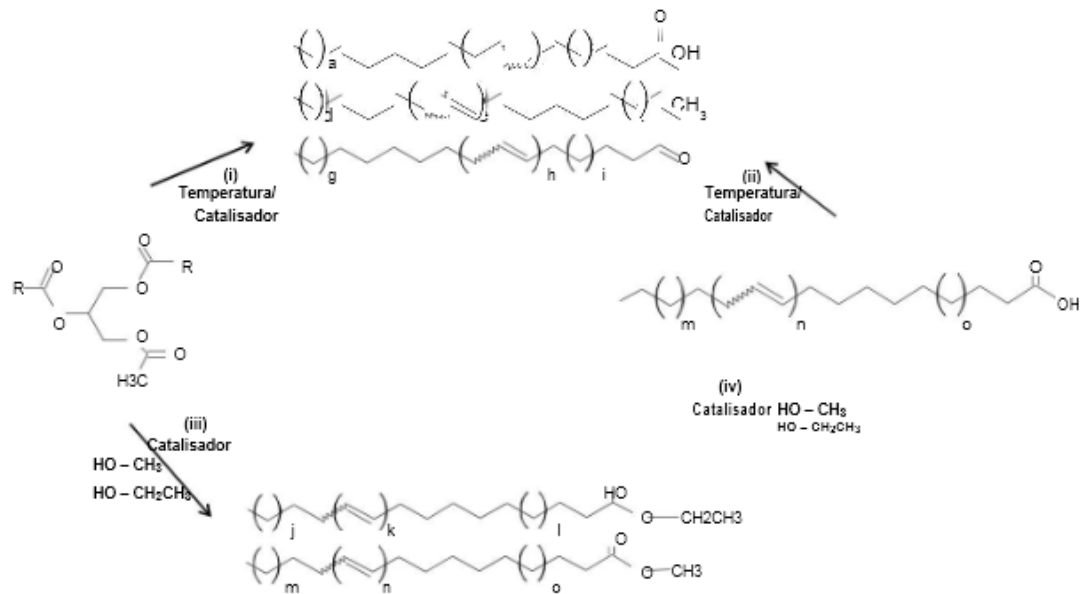
Fonte: (OLEAMA, 2007)

3.2 USO DE ÓLEOS VEGETAIS COMO BIOCOMBUSTÍVEIS

Cerca de 25 anos após a descoberta do petróleo, em 1895 Rudolf Diesel criava o motor de ignição por compressão, que mais tarde foi denominado, em sua homenagem, como motor diesel. No decorrer da Exposição Mundial de Paris, em 1889, um motor diesel foi apresentado ao público funcionando com óleo de amendoim. (PARENTE, 2003). Contudo, devido a sua abundância e baixo preço na época, o petróleo foi eleito como fonte de energia. A utilização de óleos vegetais como combustível passou então a ser restrito a situações de emergência, como durante as 1ª e 2ª Guerras Mundiais. (MA e HANNA, 1999).

Estudos efetuados com diversos óleos vegetais mostraram que a sua combustão direta conduz a uma série de problemas, tais como carbonização na câmara de injeção, resistência a ejeção nos segmentos dos êmbolos, diluição do óleo do cárter, contaminação do óleo lubrificante, entre outros problemas. (KNOTHE e STEIDLEY, 2005). A eficiência de motores que utilizam óleo vegetal quando comparados com o diesel também são relativamente díspares, mostrando que o rendimento energético para o óleo vegetal é menor que o diesel fóssil (SANTOS, 2007). Por não ser possível a utilização direta dos óleos vegetais como combustível é necessário que o óleo vegetal passe por processos de transformação como transesterificação, esterificação e craqueamento. As principais transformações químicas de óleos, gorduras ou ácidos graxos, em espécies que possam ser usadas como biocombustíveis estão ilustradas na Figura 2.

Figura 2 - Obtenção de biocombustíveis a partir de ácidos graxos e triacilglicerídeos.



Fonte: (MA. HANNA, 1999).

O processo de **pirólise ou craqueamento** de óleos, gorduras ou ácidos graxos, ilustrado de forma genérica nas reações i e ii, ocorre em temperaturas acima de 350 °C, na presença ou ausência de catalisador. Nesta reação, há a quebra de moléculas que levam à formação de uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados, lineares ou cíclicos, tais como alcanos, alcenos, cetonas, ácidos carboxílicos e aldeídos, além de monóxido e dióxido de carbono e água. A segunda rota para transformar triacilglicerídeos em combustível é a **transesterificação**, ilustrada na reação iii, que envolve a reação destes com monoálcoois de cadeias curtas em presença de um catalisador, dando origem a monoésteres de ácidos graxos. Uma terceira rota é conhecida por **esterificação** (reação iv), na qual um ácido graxo reage com um mono-álcool de cadeia curta, também na presença de catalisador, dando origem a monoésteres de ácidos graxos (SUAREZ et al. 2007).

3.3 BIODIESEL

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, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico nº 4/2012 da ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e diesel). Ainda de acordo com a Resolução 7/2008 da ANP, a reação para a obtenção do biodiesel, pode ser a

reação de transesterificação dos triacilglicerídeos. Esta reação tem como produto, uma mistura de mono-álquil ésteres.

Segundo a Lei nº 11.097/2005, classifica-se como biodiesel qualquer biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2005).

O biodiesel é formado por ésteres alquílicos de ácidos graxos, fabricado a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois de cadeia curta, gerando glicerina como subproduto (PINTO et al., 2005). É um substituto natural do diesel derivado do petróleo e tem composição similar ou até melhor no que diz respeito à densidade, número de cetano, viscosidade entre outros (BALAT; BALAT, 2008), sendo esta última a propriedade mais importante do biodiesel, particularmente em baixas temperaturas quando um aumento da viscosidade afeta a fluidização do combustível (DERMIBAS, 2009).

Uma das maiores vantagens do biodiesel é sua capacidade de se adaptar aos motores do ciclo diesel, pois ao contrário de outros combustíveis limpos, como o gás natural ou biogás, a combustão de biodiesel não necessita de adaptação dos motores, sendo uma alternativa técnica capaz de atender a frota movida a diesel (PINTO et al., 2005; RAMOS et al., 2003). O biodiesel pode ser utilizado como combustível puro, designado de B100, na forma de mistura, como complemento ao diesel extraído de petróleo, ou em baixas proporções como aditivo (DU et al., 2008).

A possível substituição do diesel de petróleo pelo biodiesel afetará positivamente a qualidade do ar, tornando-o significativamente melhor, visto que a utilização do biodiesel possibilita: a) redução das emissões de particulados; b) redução das emissões de monóxido de carbono; c) redução da quantidade de hidrocarbonetos não queimados; d) redução das emissões de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; e) redução da quantidade de óxidos de enxofre (MDCI, 1985).

A utilização de etanol na produção do biodiesel, lhe confere a característica de um produto 100% verde, pois o etanol apresenta baixa toxicidade. No Brasil, um dos maiores produtores de etanol do mundo, estimula-se estudos de seu uso em substituição ao metanol (DANTAS et al., 2007). Além disso o potencial do biodiesel reside nos seguintes fatos: o Brasil apresenta uma grande diversidade de matérias-primas oleaginosas, e as unidades industriais empregadas para o processo de transesterificação possuem grande flexibilidade com relação a dimensões, com pequena ou nenhuma necessidade de modificação. Portanto, é possível que

esse combustível renovável, se adapte às peculiaridades regionais do país e seja desenvolvido em programas não excludentes, sob os pontos de vista social ou regional (SANTOS, 2008)

No entanto, ainda se discute alguns aspectos negativos da produção dessa forma de energia alternativa. Entre esses aspectos estão o risco da falta e a elevação dos preços dos alimentos. De fato, isto pode ser um problema para países pequenos em extensão territorial e situado em regiões com condições de clima e solo adversas. No contexto mundial, o Brasil ocupa uma situação privilegiada de extensão territorial, de diversidade de plantas oleaginosas e de condições de clima e solo para a agricultura.

3.4 ESPECIFICAÇÕES DO BIODIESEL

No Brasil, o biodiesel é regulamentado, pela ANP. A determinação das características físico-químicas é feita conforme as normas nacionais da NBR e da ABNT, e das normas internacionais da ASTM, da ISO, e do CEN. A Tabela 3. apresenta a especificação do biodiesel B100, segundo a Resolução ANP nº 7/2008, que é exigida para que o produto seja utilizado no mercado brasileiro, com os seus respectivos limites de contaminantes e os métodos que devem ser empregados no seu controle de qualidade.

Tabela 3 - Especificação do Biodiesel (B-100)

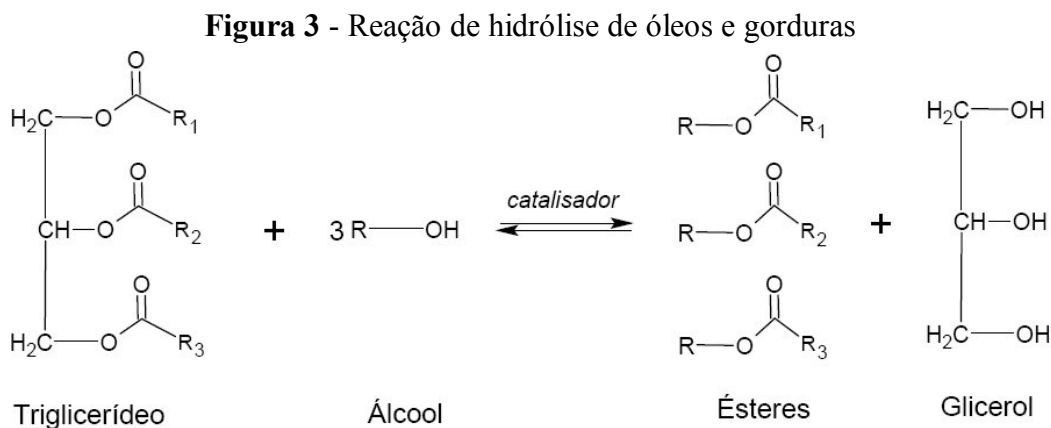
CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE LII(1)	MÉTODOS		
			ABNT NBR-	ASTM D-	EN /ISO
Aspecto					
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850-900	7148; 14065	1298 4052	EN ISO 3675 ENISSO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de Água, máx. (2)	mg/kg	500	-	6304	EN ISSO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	EN ISSO 12662
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15342 (4) (5)	-	EN 14103
Resíduo de carbono (6)	% massa	0,050	-	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	50	--	5453	EN ISSO 20846; EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554; 15555 15553; 15556	-	EN 14108 EM 14109 EM 14538
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553; 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao Cu, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número de Cetano (7)	-	Anotar	-	613 6890(8)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19 (9)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	EN 14104 (10)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 (5)	6584 (10)	EN 14105 (10); EN 14106 (10)
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344 (5)	6584 (10)	EN 14105 (10)
Mono, di, triacilglicerol (7)	% massa	Anotar	15342(5); 15344 (5)	6584 (10)	EN 14105 (10)
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de Iodo (7)	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.(2)	H	6	-	-	EN 14112 (10)

Fonte: (ANP), 2008 EN= Norma Europeia

3.5 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO BIODIESEL

A tecnologia mais utilizada para obtenção de biodiesel é a transesterificação (ou alcoólise) alcalina homogênea de óleos e gorduras. Nessa reação, o óleo ou gordura, compostos basicamente de tri-ésteres da glicerina com ácidos graxos, é misturado a um álcool (metanol ou etanol) e, na presença de um catalisador, fornece uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e glicerina (SUAREZ et al., 2009). A reação de transesterificação com álcool está representada na equação geral ilustrada na Figura 3.

A produção de biodiesel é realizada em um processo constituído das seguintes etapas: preparação da matéria-prima, reação de transesterificação, separação de fases, recuperação e desumidificação do álcool e purificação do biodiesel. A transesterificação é um dos métodos mais empregados, visto que utiliza baixas temperaturas e tem como agentes transesterificantes, álcoois comuns, como etanol e o metanol. Isto diminui os custos e viabiliza o processo. (SANTOS, 2008)



Fonte: (SUAREZ et al., 2009).

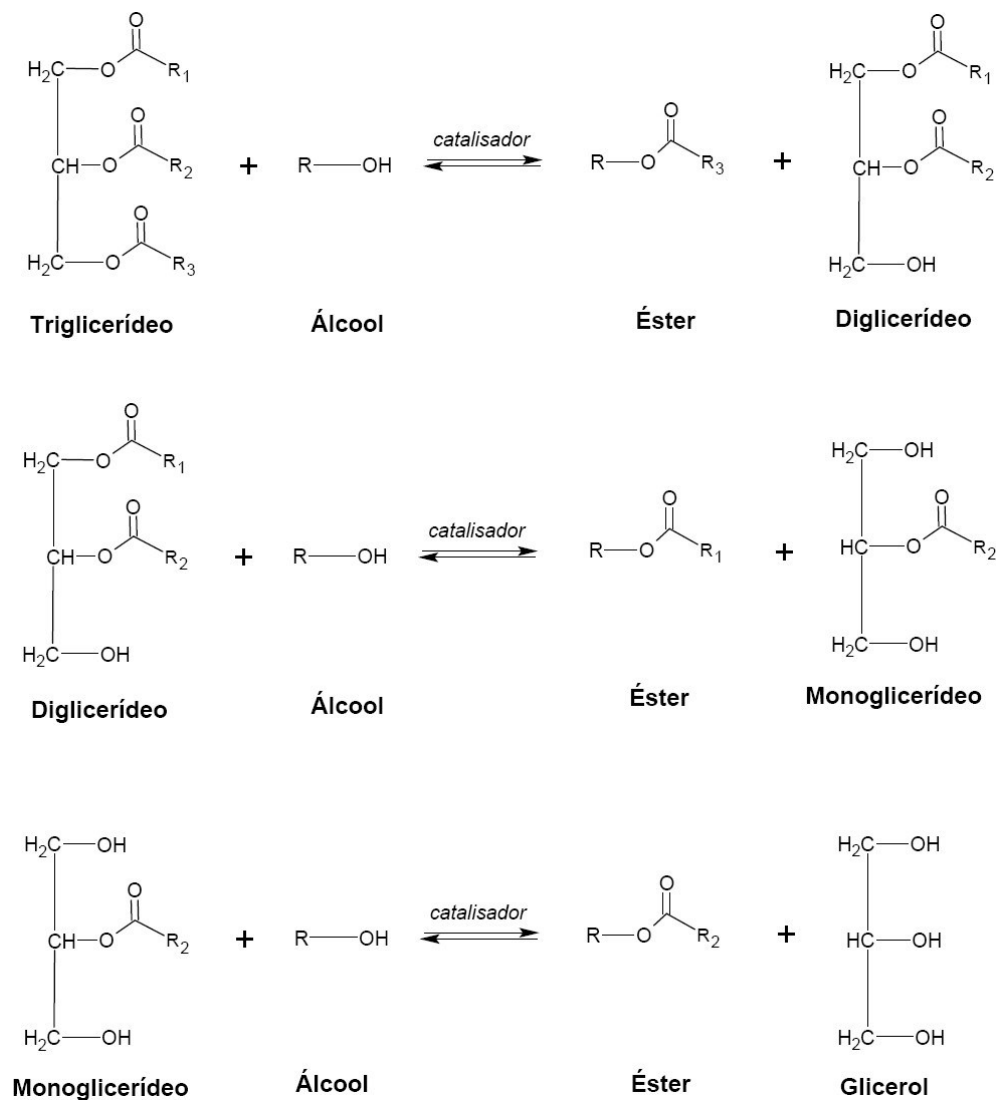
A reação é reversível, sendo assim, utiliza-se excesso de álcool para induzir o equilíbrio da reação para o lado do produto (PARAWIRA, 2009). Na primeira etapa ocorre a conversão do triglicerídeo para diglicerídeo, seguido pela conversão do diglicerídeo para monoglicerídeo, e do monoglicerídeo para glicerol, fornecendo uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada etapa (Figura 4) (GANESAN; RAJENDRAM; THANGAVELU, 2009).

Em uma reação de transesterificação, alguns parâmetros devem ser levados em conta, como: o efeito da razão molar, temperatura e tempo de reação e o tipo de catalisador (químico ou bioquímico).

A razão molar entre álcool e triglicerídeo é um dos parâmetros que mais afeta o rendimento de uma reação de transesterificação. Embora a razão molar estequiométrica seja 3:1, razões molares mais altas normalmente são utilizadas com intuito de promover melhores conversões de ésteres em menor tempo. Com relação à temperatura e tempo reacional, as reações de transesterificação podem ocorrer em diferentes temperaturas dependendo do tipo de óleo e do catalisador empregado, em que rendimentos maiores são alcançados com maior tempo reacional (BALAT; BALAT, 2008).

Quanto ao tipo de catalisador, o processo comercial mais utilizado para a produção do biodiesel é a transesterificação química que utiliza catalisadores alcalinos (hidróxido de sódio ou potássio) com custo relativamente baixo, para converter óleo vegetal ou gordura e metanol em ésteres metílicos (AKOH et al., 2007).

Figura 4 - Mecanismo da reação de transesterificação do triglicerídeo com álcool, mediante catalisador, envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos ésteres alquílicos. R1, R2, R3 e R, representam os grupos alquila.



Fonte: (GANESAN; RAJENDRAM; THANGAVELU, 2009).

Embora a transesterificação química tenha proporcionado a industrialização da produção do biodiesel em muitos países, visto que resulta em altos níveis de conversão de triglicerídeos em seus correspondentes ésteres metílicos ou etílicos em curto espaço de tempo, essa reação ainda se depara com diversos problemas como dificuldade na separação do catalisador e remoção do glicerol formado, alta demanda de energia e necessidade de tratamento da água e catalisadores residuários (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006). Essas desvantagens têm impulsionado muitas pesquisas por novos catalisadores, com destaque especial, para os catalisadores heterogêneos bioquímicos (lipases).

3.6 TRANSESTERIFICAÇÃO

A transesterificação de óleos vegetais é uma sequência de três reações reversíveis e consecutivas, onde cada etapa produz uma molécula de éster alquílico de ácido graxo, sendo o mono- e diacilglicerídeos, os intermediários da reação, e o glicerol, também chamado de glicerina, o subproduto. (MAIA et al., 2006)

3.6.1 Fatores de influenciam na reação de transesterificação

Os principais fatores que influenciam a reação de transesterificação são: tipos de óleo, tipo de álcool, razão molar óleo:álcool, quantidade e tipo de catalisador, e tempo de reação.

De acordo com SANTOS, 2008. Dentre os álcoois comumente utilizados, destaca-se o metanol e o etanol. O metanol é obtido de gás natural ou extraído do petróleo, sendo assim não renovável. O etanol é um álcool considerado 100% verde, mas a produção dos ésteres etílicos é um pouco mais complexa que a dos ésteres metílicos, exigindo maiores quantidades de álcool, mais etapas e uso de equipamentos tais como centrífugas específicas e, otimizadas para uma boa separação da glicerina dos ésteres, algumas vantagens e desvantagens do uso de metanol e etanol na transesterificação de óleos, são mostradas na Tabela 4.

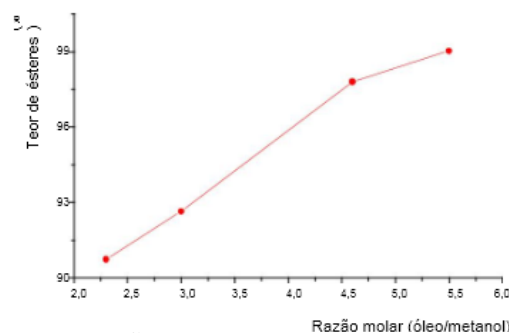
Tabela 4 - Vantagens e desvantagens do uso de metanol e etanol na transesterificação de óleos vegetais.

VANTAGENS	DESVANTAGENS
METANOL	
Menor quantidade utilizada no processo	É obtido a partir de gás natural
Possui uma melhor purificação de ésteres metílicos por decantação e lavagens	ou do petróleo
Melhor recuperação de excessos residuais do álcool por destilação	É mais tóxico que o etanol
ETANOL	
É 100% obtido de matéria vegetal (obtido da biomassa) Maior oferta desse álcool no Brasil	Maior quantidade utilizada no processo
Sua produção pode favorecer a integração social	Maior complexidade na produção dos ésteres e exige um maior número de etapas
	Difícil recuperação dos excessos residuais do álcool devido a azeotropia da mistura etanol-água

Fonte: SANTOS, 2008

A seguir são mostradas algumas divulgações sobre a produção de biodiesel: Na transesterificação metílica do óleo de babaçu foram reportados os melhores resultados em teor de ésteres quando a reação se processa, com excesso de metanol. De fato, devido à reversibilidade da reação que estequiometricamente requer 1 mol de triacilglicerídeo para 3 mols de metanol, faz-se necessário o excesso do álcool para que os equilíbrios das etapas da reação sejam deslocados para a produção de ésteres. O Gráfico 1 ilustra o efeito da variação do volume de metanol com relação a 100 g do óleo de babaçu e 2 % de KOH (BRANDÃO et al., 2006).

Gráfico 1 - Efeito da relação Óleo: MeOH no teor de ésteres na produção do biodiesel metílico de babaçu



Fonte: BRANDÃO et al. (2006)

Já no caso da transesterificação etílica do óleo de babaçu, o rendimento em teor de ésteres é maior quando é utilizada uma razão molar óleo: etanol superior a 1:9. O aumento da quantidade de álcool tende a compensar um provável bloqueio estérico do mecanismo da reação, visto que o íon etóxido é maior que o íon metóxido da transesterificação metílica.(LACERDA *et al.*,2005).

Outras variáveis a serem avaliadas para a essa reação são o tipo e a quantidade de catalisador. A catálise homogênea em meio alcalino é a rota tecnológica predominante, no meio industrial para a produção de biodiesel, devido a sua rapidez e facilidade que tornam esta opção economicamente viável (MA e HANNA, 1999; ZAGONEL e RAMOS, 2001).

Os catalisadores alcalinos são mais utilizados que os ácidos, porque as reações catalisadas por ácidos requerem maiores quantidades de álcool, tempo reacionais elevados e temperatura em torno de 70 °C. Os catalisadores básicos mais usados são os hidróxidos de sódio e de potássio. A quantidade de catalisador adicionada é extremamente importante, pois dependendo da sua origem e do estado de conservação do óleo, boa parte da substância pode ser consumida por ácidos graxos livres desfavorecendo a transesterificação com a formação de sabão (SANTOS, 2008)

Conforme LIMA *et al.* (2007) a transesterificação alcalina do óleo de babaçu produziu respectivamente 71,8% e 62,2% de biodiesel metílico e etílico de babaçu puro. Estes valores baixos de rendimentos foram atribuídos à formação de sabão e perdas de biodiesel durante às etapas de purificação (lavagens).

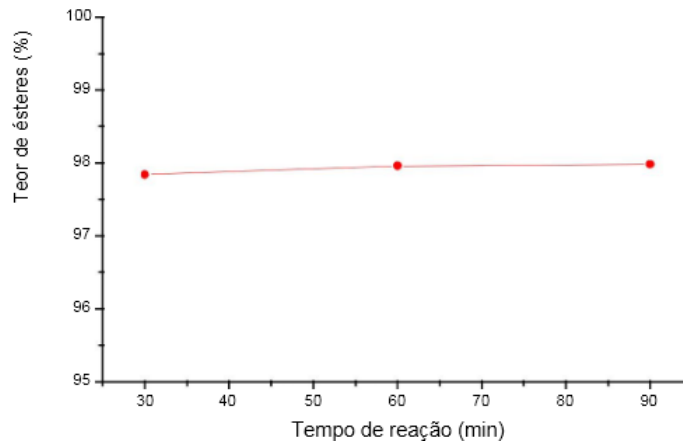
Alguns estudos foram realizados utilizando catalisadores heterogêneos, tais como os complexos de estanho, chumbo e zinco na transesterificação de diversos óleos vegetais. Os óleos de babaçu e soja apresentaram maiores rendimentos na reação. Estes estudos concluíram que devido a fatores estéricos, a atividade catalítica foi mais efetiva em óleos vegetais constituídos em grande parte por triacilglicérides de cadeia curta ou com elevado grau de insaturação (PETER *et al.*, 2002; ABREU *et al.* 2004; BARBOSA *et al.* 2005; SUAREZ *et al.*, 2007).

O tempo de reação é outra variável importante, pois a transesterificação é um processo reversível e o equilíbrio reacional pode acontecer em tempos variáveis.

BRANDÃO *et al.* (2006) e LACERDA *et al.* (2005) observaram que no processo de produção de biodiesel metílico e etílico de babaçu, considerando a razão óleo:álcool e teor de catalisador constante, não foram verificadas variações significativas no teor de ésteres em

tempos reacionais superiores a 60 minutos. O Gráfico 2 ilustra a influência do tempo de reação no teor de ésteres na produção do biodiesel metílico de babaçu.

Gráfico 2 - Efeito do tempo de reação no teor de ésteres na produção do biodiesel metílico de babaçu



Fonte: BRANDÃO et al. (2006)

Além dessas variáveis, destaca-se ainda outros fatores importantes tais como, a umidade e o teor de ácidos graxos livres.

A presença de umidade provoca a hidrólise dos ésteres monoalquílicos na transesterificação e os ácidos carboxílicos, produtos da hidrólise, reagem com o catalisador alcalino formando sabão. O rendimento da transesterificação etílica em meio alcalino (2 % de NaOH) cai de 95,8 % para 73,2 % quando a concentração de água é alterada de 0,15 % à 0,66 % (BRANDÃO et al., 2006)

Na catálise ácida, o teor elevado de ácidos graxos livres é uma alternativa interessante para a obtenção de ésteres monoalquílicos. Entretanto na catálise básica, um teor elevado desses ácidos no óleo leva à produção de sabão e água, o que diminui consideravelmente o rendimento da reação principal para níveis inferiores a 90 %, principalmente quando a concentração de ácidos graxos livres é superior a 5 %.

As substâncias não transesterificantes presentes no óleo, quando em teores maiores que 2% afetam a qualidade do biocombustível contribuindo para o depósito de materiais em bicos injetores, aumento da viscosidade, e conseqüentemente aumento da capacidade de cristalização do biodiesel a baixas temperaturas (TECBIO, 2006).

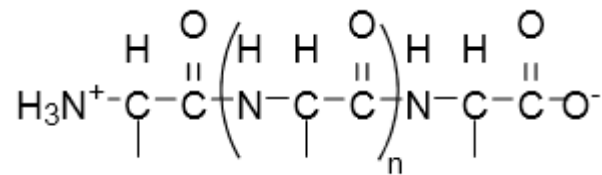
Para fins de praticidade e economia de recursos a reação de transesterificação metílica do óleo de babaçu deverá ser realizada à temperatura em torno de 25 °C, visto que, não foi

observada variação significativa do efeito da temperatura sobre o rendimento do biodiesel.(SANTOS, 2008)

3.6.2 Catalise Enzimática

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores acelerando a velocidade das reações nos processos biológicos. Quimicamente, as enzimas são macromoléculas de alta massa molecular (entre 62 a 2500 resíduos de aminoácidos) formadas por subunidades de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas (Figura 5). Os resíduos de aminoácidos formam ligações covalentes entre si, pelo grupo amino de um aminoácido com o grupamento carboxílico de outro aminoácido, constituindo cadeias polipeptídicas extensas, que assumem um arranjo espacial e estrutural complexo (VOET; VOET, 1995).

Figura 5 - Estrutura geral de um polipeptídio



Fonte: SANTOS, 2008

As enzimas são altamente versáteis na catálise de vários tipos de reações que ocorrem sob condições brandas, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo da neutralidade. As velocidades de algumas reações catalisadas por enzimas podem chegar até 10^{12} vezes maiores do que as não catalisadas. Uma enzima geralmente catalisa uma única reação química ou um conjunto de reações intimamente ligadas e o grau de especificidade para o substrato é normalmente alto. A velocidade de uma reação enzimática é influenciada pela concentração do substrato, pH, concentração da enzima (NELSON; COX, 2004).

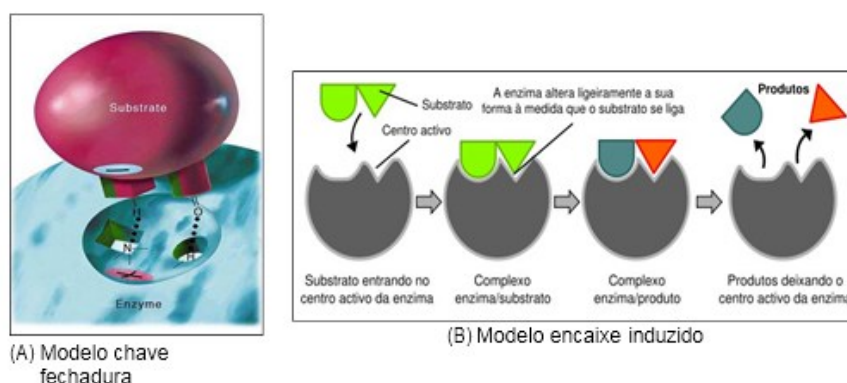
Muitas reações enzimáticas, em concentrações muito baixas, a reação procede vagarosamente. Por outro lado, com o aumento da concentração do substrato, a velocidade aumenta proporcionalmente em função da frequência de colisões entre a enzima e as moléculas dos reagentes. Quando a enzima se aproxima da velocidade máxima em que ela pode combinar com o reagente e formar produtos, o efeito do aumento da concentração do substrato diminui. Nesse ponto, a enzima estabelece uma interação com o reagente que mesmo aumentando a

concentração deste ela não terá efeito na velocidade da reação e, portanto, estará saturada. Porém, para reações não catalisadas por enzimas, a velocidade é aumentada quase que indefinidamente com o aumento da concentração dos reagentes. Tal como ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações catalisadas por enzimas aumenta geralmente com a temperatura, dentro de certa faixa na qual ela é estável e mantém a sua atividade intacta (NELSON; COX, 2004).

Grande parte do poder catalítico das enzimas deve-se à capacidade delas em interagirem com o substrato em orientações favoráveis na formação dos complexos enzima-substrato (ES). As enzimas possuem um “sítio ativo”, onde se processam as reações químicas. Este é constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia proteica que se encontra em íntima e mútua proximidade espacial. O substrato liga-se ao centro ativo da enzima e parte da especificidade catalítica da mesma depende também da natureza das ligações envolvidas. Acredita-se que os aminoácidos do sítio ativo formam na superfície da enzima uma espécie de “fenda”, na qual o substrato pode ajustar-se. Este sítio deve possuir um formato definido e ajustável, que acomoda algumas moléculas, como os substratos e inibidores, mas que dificulte outras espécies de entrar em contato com o sítio ativo da enzima (PALMER, 1995) (NELSON; COX, 2004).

Para adaptar-se ao sítio ativo, um substrato deve ter uma forma complementar a este, conhecido como modelo chave e fechadura (Figura 6 A). No entanto, as formas dos sítios ativos de algumas enzimas são levemente modificadas pela interação com o substrato. Os sítios ativos dessas enzimas têm formas que são complementares à do substrato, mas somente depois de ligado. Esse processo de reconhecimento dinâmico é chamado de encaixe induzido (Figura 8 B) (CAMPBELL; FARRELL, 2005).

Figura 6 - Modelos de interação do substrato com a enzima. (A) Modelo de chave e fechadura. (B) Modelo de encaixe induzido



Fonte: (CAMPBELL; FARRELL, 2005).

Pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology), as enzimas podem ser classificadas de acordo com a tabela 5

Tabela 5 - Classificação das enzimas

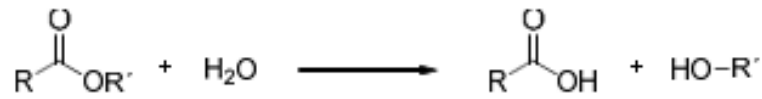
Classe de enzimas	Algumas subclasses	Tipos de reação
Oxiredutases	Desidrogenases; oxidases; redutases	Reações de oxidação e redução, formação de ligação dupla por eliminação de H ₂ , oxigenação de ligações C-H, C-C e C=C
Transferases	Quinases; transaminases	Transferência de grupo aldeídico, cetônico, acil, glicosídeo, fosforil, amino
Hidrolases	Lipases; nucleases; proteases	Hidrólise-formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos
Liasas	Descarboxilases; desidrases	Adição-eliminação de pequenas moléculas nas ligações C=C, C=N, C=O
Isomerases	Epimerases	Isomerização de um centro estereogênico, epimerização
Ligases		Formação-rompimento de ligações C-O, C-S, C-N, C-C.

Fonte: IUBMB

As lipases são enzimas que são produzidas por diversas plantas, animais e microrganismos (GHALY et al., 2010). Classificadas como enzimas hidrolíticas, ou seja, podem hidrolisar triglicerídeos para ácidos graxos e glicerol, são muito importantes para a biotecnologia, não somente para a indústria de alimentos e óleos, mas também na preparação de intermediários quirais. As lipases também são muito úteis em síntese orgânica, pois promovem diversos tipos de reações em condições brandas e seletivas (Figura 7) (FABER, 2004).

Figura 7 - Tipos de reações promovidas por lipases.

Reação de Hidrólise

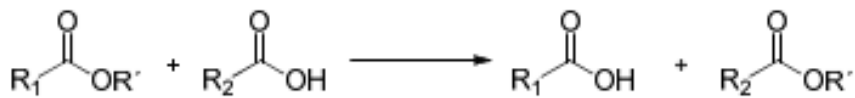


Reação de Esterificação

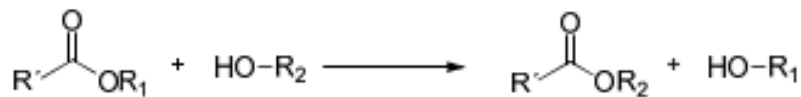


Reações de Interesterificação

Acidólise (reação de éster com ácido)



Alcólise (reação de éster com álcool)



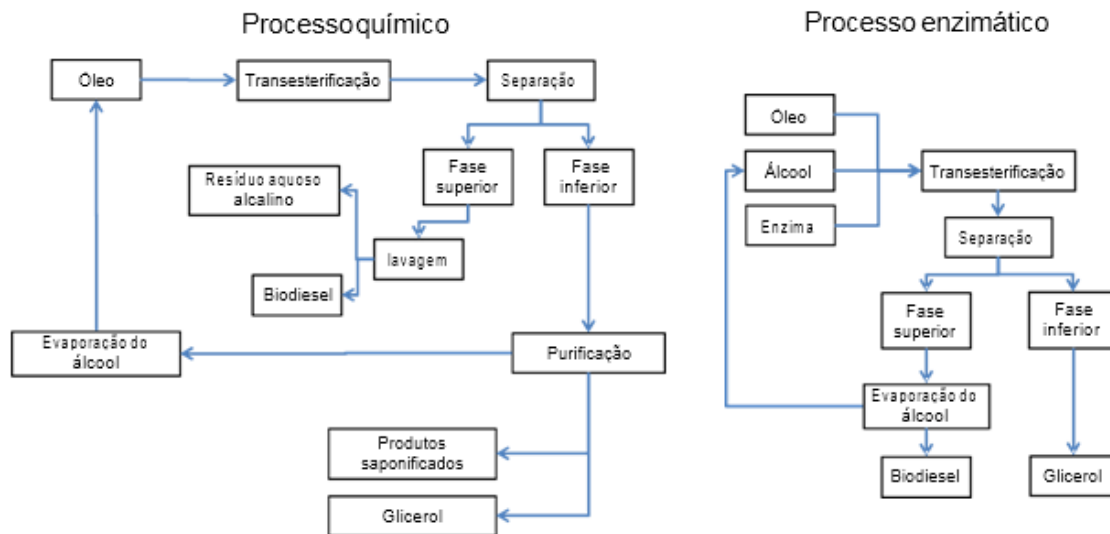
Interesterificação (reação de éster com éster)



As vantagens de se utilizar lipases para a produção de biodiesel são: habilidade de se trabalhar em diferentes meios, tanto na presença de solventes hidrofílicos quanto hidrofóbicos; a capacidade de catalisar reações de transesterificação com alcoóis de cadeia longa ou ramificada, o que é difícil se usar catalisadores alcalinos; se a enzima for imobilizada, poderá ser reutilizada (GHALY *et al.*, 2010).

Atualmente, a produção comercial de biodiesel é por via química, o que passa por várias etapas, encarecendo o produto final, mas o processo enzimático tem despertado o interesse da comunidade científica, pois emprega menos etapas no processo de produção (Figura 8).

Figura 8 - Fluxogramas do processo de produção do biodiesel por via química e enzimática

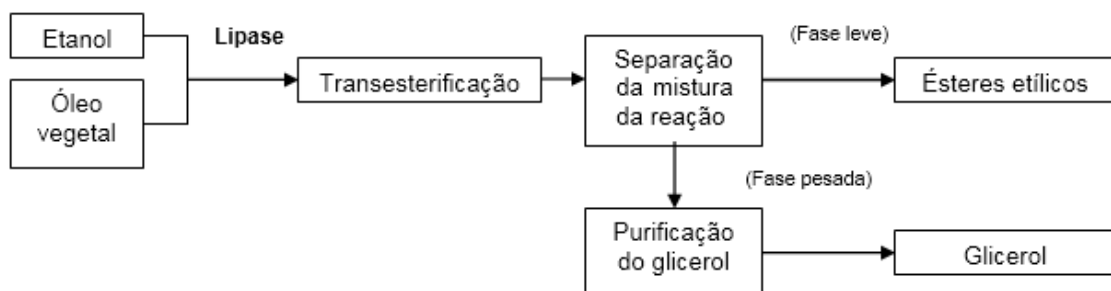


3.6.3 Transestrificação enzimática

A transesterificação enzimática consiste na modificação lipídica realizada pelas lipases e tem a vantagem de permitir maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regiões de especificidade das lipases.

No processo de transesterificação enzimática, a fase pesada (glicerol) é simplesmente separada da fase leve (biodiesel) e não há necessidade de desodorização nem neutralização do produto final, o que reduz a duração do processo. Um excesso de álcool promove elevados rendimentos na síntese do biodiesel e o biocatalisador imobilizado pode ser utilizado diversas vezes. As reações podem ser conduzidas na presença ou não de solventes orgânicos (ANTCZAK et al., 2009). A Figura 9 ilustra o processo enzimático da produção de biodiesel.

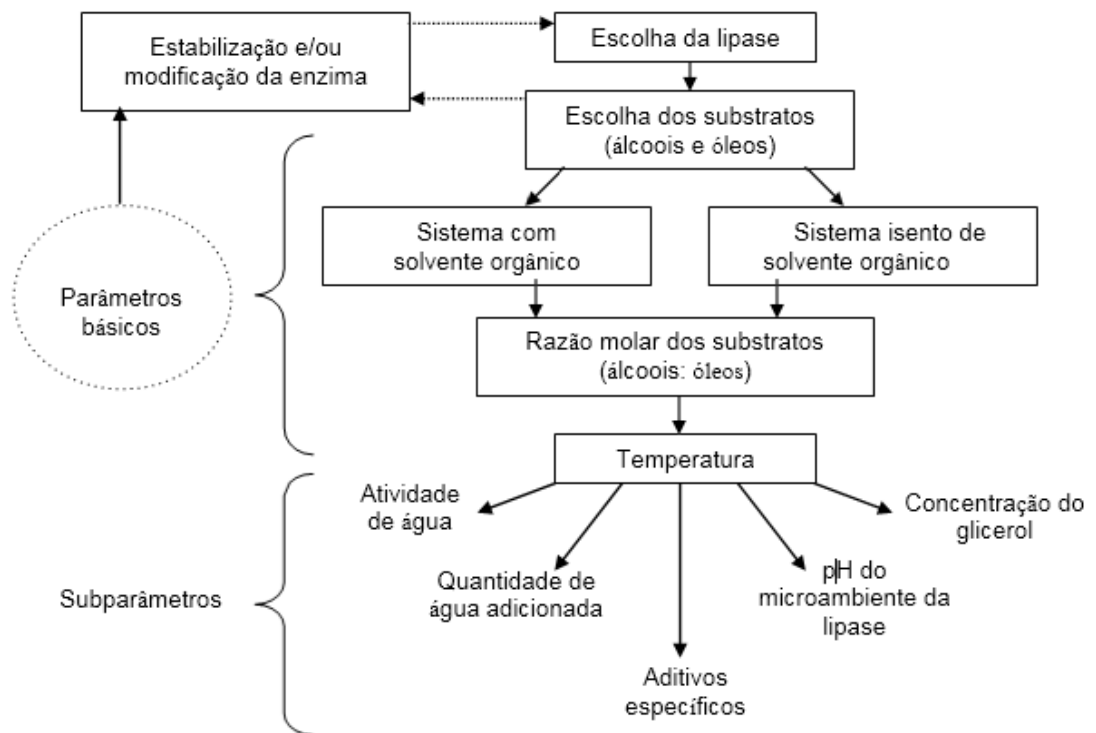
Figura 9 - Diagrama da produção de biodiesel utilizando lipases como biocatalisador.



Fonte: (REIS, 2009).

Os fatores cruciais que afetam a produção enzimática do biodiesel estão ilustrados na Figura 10. Para alcançar a viabilidade econômica, deve-se optar por matéria-prima e preparações de lipase adequadas, sendo que esta última pode ser modificada a fim de aumentar sua estabilidade e eficiência catalítica. Além disso, devem-se avaliar alguns parâmetros importantes como seleção do solvente orgânico, otimização da razão molar, temperatura, atividade de água, pH do microambiente da enzima e a máxima concentração de glicerol nos produtos de reação (ANTCZAK et al., 2009).

Figura 10 - Parâmetros cruciais que afetam o rendimento da síntese enzimática do biodiesel



Fonte: (REIS., 2009).

De acordo com a definição de biodiesel, não só o metanol, mas outros álcoois podem ser utilizados na transesterificação enzimática, sendo o mais comum deles o etanol, além de outros álcoois primários como propanol, butanol e doadores acila alternativos, como acilacetato ou dimetil-carbonato (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2009).

A síntese enzimática do biodiesel também pode ser otimizada pela utilização de solventes no meio reacional, como terc-butanol. A primeira planta em escala industrial do mundo a utilizar tecnologia enzimática está operando na China com a capacidade de 20 milhões de toneladas por ano utilizando terc-butanol como co-solvente, o qual protege a enzima e proporciona alta produtividade (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2009).

O processo enzimático é uma alternativa biotecnologicamente sustentável com relação à catálise química, e é mais apropriada para a produção de biodiesel a partir de matérias-primas que contem alto valor de ácidos graxos livres e água, como óleos e gorduras residuais, pois esses ácidos graxos livres são completamente convertidos a biodiesel (PARAWIRA, 2009). Além disso, biocompatibilidade, biodegradabilidade e aceitabilidade ambiental obtida por procedimentos biotecnológicos utilizando lipases, são propriedades desejadas neste método alternativo de produção do biodiesel (DEVANESAN; VIRUTHAGIRI; SUGUMAR; 2007; MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

3.7 FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES

Um grande número de micro-organismos produtores de lipases é conhecido, entretanto, este número representa um percentual muito baixo da biodiversidade estimada dos micro-organismos que potencialmente podem ser produtores de enzimas em geral e que ainda não foram caracterizados: cerca de 0,2 a 0,6% para bactérias e de 5% para fungos. Esta grande abundância de micro-organismos existentes na natureza torna importante o *screening* e o isolamento de novas cepas produtoras de enzimas com características desejáveis em biocatálise (WUBBOLTS; BUCKE; BIELECKI, 2000).

Nesse contexto, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe) (JAEGER et al., 1994).

Os fungos filamentosos são amplamente reconhecidos como as melhores fontes de lipases (Tabela 6), com várias patentes de aplicação da enzima tendo sido desenvolvidas (CARDENAS et al., 2001).

Tabela 6 - Principais fungos produtores de lipase.

Micro-organismo (Fungo)	Referência
<i>Rhizopus</i> sp.	
<i>R. chinensis</i>	YASUDA et al., 1999.
<i>R. delemar</i>	HAAS; CICHOWICZ; BAILEY, 1992.
<i>R. homothallicus</i>	RODRIGUEZ et al., 2006; DIAZ et al., 2006.
<i>R. microsporus UZLT-4B</i>	DAVRANOV; KUILIBAEV, 1993.
<i>R. niveus</i>	KERMASHA; SAFARI; BISAKOWSKI, 1998.
<i>R. oligosporous</i>	DALSENTER et al., 2005;
<i>R. oryzae</i>	GHAMGUI; KARRA-CHAÂMOUNI; GARGOURI, 2004; MINNING; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1998.
<i>Aspergillus</i> sp.	
<i>A. carneus</i>	SAXENA et al., 2003
<i>A. niger</i>	MAHADIK, et al., 2002
<i>A. repens</i>	KAMINISHI; TANIE; KUNIMOTO, 1999.
<i>A. oryzae</i>	TOIDA et al., 1995.
<i>A. nidullans</i>	MAYORDOMO; RANDEZ-GIL; PRIETOISOLATION, 2000.
<i>A. terreus</i>	GULATI et al., 1999
<i>Fusarium</i> sp.	
<i>F. solani</i>	MAIA et al., 1999.
<i>F. oxysporum F sp vasinfectum</i>	RAPP, 1995.
<i>F. heterosporum</i>	NAGAO et al., 1996.
<i>Geotrichum</i> sp.	
<i>G. candidum</i>	GOPINATH et al., 2003;
<i>Geotrichum sp</i>	MACEDO; PASTORE, 1997.
<i>Galactomyces geotrichum</i>	PHILLIPS; PRETORIUS, 1991.
<i>Mucor</i> sp.	
<i>M. hiemalis f. hiemalis</i>	HIOL et al., 1999.
<i>Mucor sp</i>	ABBAS et al., 2002.
<i>M. hiemalis</i>	AKHTAR; MIRZA; CHUGHTAI, 1980.
<i>M. javanicus</i>	SAIKI et al., 1969.
<i>Rhizomucor miehei</i>	UVARANI et al., 1998.
<i>Neurospora</i> sp.	
<i>Neurospora sp. tt-241</i>	LIN; LEE; CHIOU, 1996.
<i>N. crassa</i>	KUNDU et al., 1987.
<i>Penicillium</i> sp.	
<i>P. abeanum</i>	SUGIHARA et al., 1996.
<i>P. aurantiogriseum</i>	LIMA et al., 2004.
<i>P. candidum</i>	RUIZ et al., 2001.
<i>P. chrysogenum</i>	FERRER et al., 2000.
<i>P. citrinum</i>	KRIEGER, 1995;
<i>P. coryophilum</i>	BARON et al., 2005.
<i>P. cyclopium</i>	CHAHINIAN et al., 2000;
<i>P. restrictum</i>	CASTILHO et al., 2000
<i>P. roqueforti IAM 7268</i>	MASE; MATSUMIYA; MATSUURA, 1995.
<i>P. simplicissimum</i>	SZTAJER et al., 1992.
<i>P. wortanii</i>	COSTA; AMORIM, 1999.

Fonte: FERNANDES (2007)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE BABAÇU

Do ponto de vista químico, na escolha do método mais eficaz, diversos fatores devem ser levados em consideração tais como a natureza do vegetal, o solvente empregado na extração, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração, pois esses fatores influenciam diretamente na extração do óleo. Já sob o ponto de vista ambiental, o método da prensagem é o mais indicado, produz um óleo de melhor qualidade e não gera resíduos tóxicos (ECYCLE, 2014)

O método de extração escolhido foi a prensagem para extrair o óleo das amêndoas do coco babaçu. A extração foi realizada em uma prensa hidráulica (prensagem descontínua) modelo SL-10 do laboratório de alimentos da UFPB, ilustrada na Imagem 1 em que as amêndoas a serem submetidas à extração de óleo foram colocadas em um cilindro perfurado por onde um pistão se desloca realizando pressão sob a matéria-prima que foram esmagadas, liberando o óleo.

Imagem 1 - Prensa hidráulica modelo SL-10.



Fonte: Próprio autor, 2019

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO OLEO DE BABAÇU

A caracterização do óleo de babaçu foi realizada no Laboratório de Combustíveis e Materiais da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2.1 Índice de iodo

Segundo REDA, 2004. O índice de iodo é usado para medir o grau de insaturação de óleos e gorduras pela absorção de halogênios nas cadeias graxas através da análise de triglicerídios e de ácidos graxos livres e seus produtos hidrogenados. É um importante indicador de provável desenvolvimento de degradação da matéria graxa, sendo usado para determinar as propriedades químicas e físicas dos óleos. A obtenção de altos valores para o índice de iodo podem ser indicativos de maior tendência à ocorrência de processos oxidativos em moléculas do ácido graxo insaturado. Os ácidos graxos que possuem ligações duplas carbono-carbono reagem com iodo, assim, quanto maior o número de insaturações maior é o índice de iodo, e pode ser apresentado em termos do número de centigramas de iodo absorvido por grama da amostra (% iodo absorvido), em condições específicas de ensaio (IAL, 2008).

Fazendo uso da metodologia Cd 1-25 (AOCS), foram pesados 0,25 g em frasco Erlenmeyer de 500 mL tampados, em seguida foram adicionados 10 mL de ciclohexano, para então acrescentar 25 mL da solução de Wijs. A mistura foi posta em repouso abrigada da luz e em temperatura ambiente, por 30 minutos. Passado o repouso, adicionou-se 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água em fervura. Para realização da titulação fez-se uso de solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol/L, até que se notasse uma fraca coloração amarela. Foram adicionadas em torno de 1 a 2 mL de solução indicadora (amido 1%), continuando a titulação até que se completasse o desaparecimento da cor azul. Uma determinação em branco sem amostra do óleo, foi realizada seguindo as mesmas condições anteriores.

Cálculo

$$\frac{(V_B - V_A) \times M \times 1,27}{P} = \text{Índice de Iodo} \quad (1)$$

M = molaridade da solução de Na₂S₂O₃

V_B = mL gasto na titulação do branco

V_A = mL gasto na titulação da amostra

P = n° g da amostra

4.2.2 Índice de acidez

A determinação da acidez pode proporcionar um dado essencial na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, causado por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. A decomposição dos glicerídios é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Estes são freqüentemente expressos em termos de índice de acidez, podendo sê-lo também em mL de solução normal por cento ou em g do componente ácido principal, geralmente o ácido oléico. Os regulamentos técnicos normalmente adotam esta última forma de expressão da acidez. O índice de acidez pode ser definido como o número de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar um grama da amostra. O método pode ser aplicado a óleos brutos e refinados, vegetais e animais, e gorduras animais. Os métodos que avaliam a acidez titulável resumem-se em titular, com soluções de álcali-padrão, a acidez do produto ou soluções aquosas/alcoólicas do produto, assim como os ácidos graxos obtidos dos lipídios.

Foram aferidas por gravimetria 2 g da amostra de óleo de coco babaçu em um Erlenmeyer e foram adicionados 25 mL de solução de éter – álcool (2:1) anteriormente neutralizado com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L. Então foram adicionadas duas gotas de fenolftaleína como indicador e, titulou-se com solução de KOH 0,1 mol/L, previamente padronizada com solução de H₂SO₄ 0,1 mol/L, até se obter uma coloração rósea.

Cálculo

$$\frac{v \times f \times 6.61}{P} = \text{Índice de acidez} \quad (2)$$

v = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação

f = fator da solução de hidróxido de sódio

P = nº de g da amostra

4.2.3 Peróxido

Trata-se de uma técnica que determina todas as substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra, capazes de oxidar o iodeto de potássio

nas condições do teste. Estas substâncias são comumente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares resultantes da oxidação da gordura. É aplicada a todos os óleos e gorduras normais, incluindo margarina e creme vegetal, porém é susceptível, logo, qualquer variação no procedimento do teste pode alterar o resultado da análise.

O índice de peróxido, expresso como o número de mili-equivalentes de oxigênio ativo (ou peróxido) por 1000 gramas de gordura, foi determinado de acordo com o método Cd 8-53 da AOCS (2004). Foram pesados 5g do óleo, depois dissolvidos em 30 mL da solução de ácido acético-clorofórmio (3:2 v/v), em seguida se adicionou 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Após o intervalo de 5 minutos, em que esteve abrigada da luz, foram adicionados 30 mL de água destilada realizando uma titulação até que a coloração amarela tenha quase desaparecida, em seguida adicionou-se 0,5 mL de solução de amido 1%, à mistura. O iodo liberado foi titulado com solução de tiossulfato de sódio 0,1 mol/L, até a completa perda da coloração azulada. Um teste em branco foi realizado nas mesmas condições descritas, sem a presença da amostra.

Cálculo

$$\frac{(A-B) \times N \times f \times 1000}{P} = \text{Índice de peróxido em meq por 1000g de amostra} \quad (3)$$

A = nº de mL da solução de tiossulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação da amostra

B = nº de mL da solução de tiossulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação do branco

N = normalidade da solução de tiossulfato de sódio f = fator da solução de tiossulfato de sódio.

P = nº de g da amostra

4.2.4 Saponificação

O índice de saponificação é tido como a quantidade de álcali necessário para saponificar uma quantidade definida de amostra. Este método é aplicado a todos os óleos e gorduras e expressa o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para saponificar um grama de amostra (AOCS, 1993).

A amostra foi filtrada em papel de filtro para remover impurezas e traços de umidade até estar completamente seca. Uma quantidade de amostra foi pesada, de tal modo que sua

titulação corresponda de 45 a 55% da titulação do branco. Esta massa normalmente é de (4-5) g. Adicionou-se então 50 mL da solução alcoólica de KOH. Um branco foi preparado e o procedimento analítico foi realizado simultaneamente com a amostra. O condensador foi conectado e deixado para ferver suavemente até a completa saponificação da amostra (aproximadamente uma hora, para amostras normais). Após o resfriamento do frasco, a parte interna do condensador foi lavada com um pouco de água. Desconectando do condensador, forão adicionados 1 mL do indicador e titulado com a solução de ácido clorídrico 0,5 M até o desaparecimento da cor rósea.

Cálculo

$$\frac{(B-A) \times 28,06 \times f}{P} = \text{Índice de saponificação} \quad (4)$$

A = volume gasto na titulação da amostra

B = volume gasto na titulação do branco

f = fator da solução de HCl 0,5 M

P = n° de g da amostra

4.2.5 Viscosidade

A viscosidade foi realizada em um Viscosímetro Capilar, que é basicamente um tubo em U, onde um dos seus ramos é um tubo capilar fino ligado a um reservatório superior. Sendo que o tubo é mantido na vertical e colocou-se uma quantidade conhecida do óleo no reservatório, deixando-o escoar sob a ação da gravidade através do capilar. A medida da viscosidade foi calculada pelo tempo que a superfície de líquido no reservatório demorou a percorrer o espaço entre duas marcas gravadas sobre o mesmo.

Numa solução o aumento da viscosidade devido ao soluto pode ser expresso pela viscosidade cinemática: Viscosidade Cinemática:

Cálculo

$$V = K \times T \quad (5)$$

$$K = \frac{T}{V}$$

$\eta_{cin} = \eta_{din}/\rho = kt$ (Stokes ou mm^2/s). Onde: η_{din} = viscosidade dinâmica (Pa.s) ρ = densidade do fluido (g/cm^3) k = constante geométrica (mm^2/s^2), t = tempo de escoamento (s)

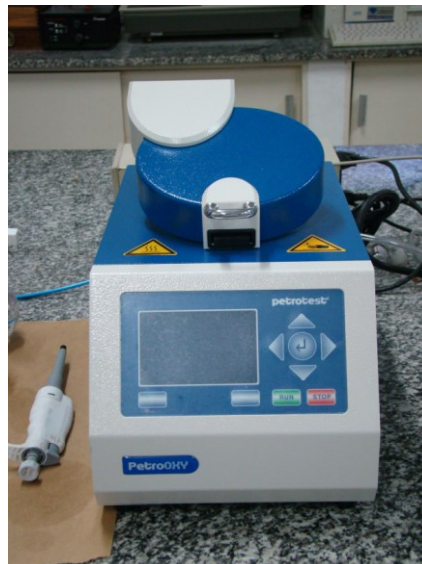
4.2.6 PetroOxy

O método petroOXY, baseia-se no consumo de oxigênio pela amostra, quando esta é aquecida a uma temperatura de 110 °C sobre pressão de 700 kPa. O ensaio considera o tempo necessário para uma queda de pressão total de 10 % e obtém-se o OIT pela curva pressão x tempo (GALVÃO, 2007).

A análise para determinação da estabilidade oxidativa do óleo foi realizada utilizando o equipamento modelo PetroOxy da petrotest ilustrado na Imagem 2.

Para realização do procedimento foram utilizadas 5 ml do volume do óleo, sobe uma pressão de oxigênio puro a 700 kPa, a temperatura ambiente. Depois de ter a pressão estabilizada, elevou-se a temperatura até 110 °C. O período de indução oxidativa é determinado como o tempo necessário para que 10% da pressão de oxigênio disponibilizada para o teste, seja absorvida pela amostra.

Imagem 2 - Equipamento PetroOxy da UFPB.



Fonte: Próprio autor, 2019

4.2.7 Rancimat

Para avaliar a estabilidade à oxidação dos óleos, foi utilizado o equipamento Rancimat, marca Metrohm, modelo 743, segundo metodologia AOCS Cd 12b-92 e EN 14112, Imagem 3.

Imagem 3 - Equipamento Rancimat modelo 743 da UFPB.



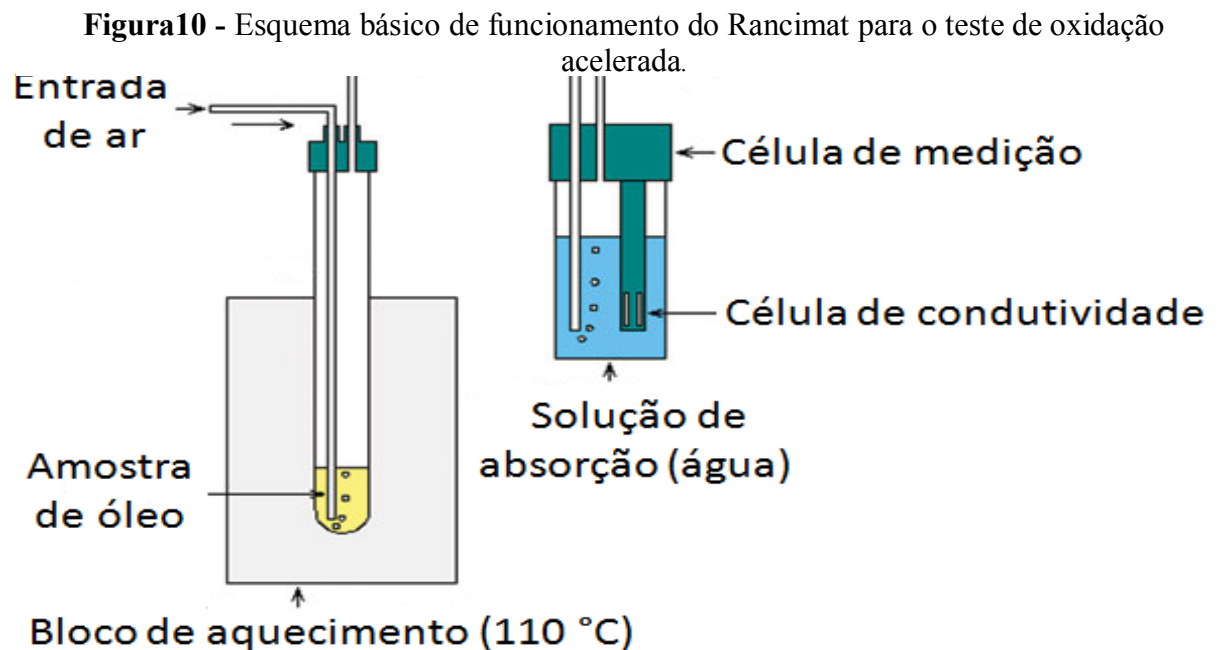
Fonte: Próprio autor, 2019

O equipamento foi usado para avaliar a qualidade dos óleo e de seus derivados, suas capacidades de armazenagem e estabilidade que foram verificadas em intervalos freqüentes.

Pelo método já citado, fez-se uso do equipamento Rancimat, para que o óleo do babaçu fosse prematuramente envelhecidos pela decomposição térmica e fluxo de ar. A formação dos primeiros compostos do processo de degradação térmica e oxidativo, tais como peróxidos, hidroperóxidos, aldeídos, cetonas, dentre outros voláteis, soprados por um fluxo de ar para dentro da célula de medição abastecida por água bidestilada, foram detectados pelo aparelho como aumento na medida da condutividade, mostrando dessa forma o período de indução (PI).

Para que seja considerado estável, o óleo deve estar dentro do critério de exposição à programação de teste no Rancimat que estipula um período mínimo de 6,0 horas, de acordo com a norma EN 14112, já as amostras de óleo que não atingiram o período de indução de no mínimo de 6,0 horas são consideradas menos estáveis. (MELO, 2010)

Para se obter os dados referentes a estabilidade oxidativa pelo equipamento Rancimat, foram envelhecidas 3 g de amostra por um fluxo de ar (10 L/h a 110° C) em uma célula de medição abastecida por água bidestilada. O período de indução (PI) foi estabelecido pela medida da condutividade mostrado na ilustra a Figura 10.



Fonte: SANTOS, 2008.

4.3 MICRO-ORGANISMOS

O cultivo do Micro-organismo, bem como as fermentações em estado sólido (FES) e a transesterificação do óleo de babaçu foram realizadas no laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA-UFCG).

A produção do extrato bruto foi realizada pela aplicação do fungo filamentosos *Aspergillus sp.* armazenado na Coleção de Fungos do CDSA/UFCG. O fungo foi isolado a partir do efluente da Indústria Laticínio Monteiro, localizada na cidade de Monteiro-PB, sendo assim denominado LAT 01. O microrganismo foi selecionado por apresentar um Índice Enzimático (IE) de 10,75 em meio sólido, o que o caracteriza como um bom produtor de lipase. A conservação do microrganismo foi realizada em frascos tipo *ependorf*, contendo água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939), mantidos em temperatura ambiente.

4.3.1 Reativação do microrganismo

O fungo *Aspergillus sp.* (LAT 01) foi reativado a partir de uma alíquota da suspensão de esporos que foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura de aveia, Tabela 7. As placas foram incubadas em *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) a 30°C até preenchimento das placas (Imagem 4).

Tabela 7 - Composição do meio de cultura de aveia

COMPONENTE	QUANTIDADE
Ágar	20 g
Farinha de aveia	20 g
Água destilada	1 L

Fonte: ROZENDO, 2016

Imagem 4 - Placa de Petri com o microrganismo *Aspergillus sp.*, após 120 horas em BOD a 30°C



Fonte: Próprio autor, 2019

4.3.2 Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo, foi realizado uma suspensão dos conídios em água destilada e, filtrados em algodão e gaze removendo segmentos de hifas. A suspensão obtida foi ajustada para a concentração de 10^8 mL^{-1} esporos. A realização da quantificação de esporos contidas na suspensão foi realizada em câmara de Neubauer. Para inocular o substrato contido em frascos de Erlenmeyer foram utilizados 1,0 mL dessa suspensão.

4.4 PRODUÇÃO DE LIPASES

4.4.1 Preparo do substrato

Os fragmentos das cascas de banana (*Musa sp*) foram secos em secador solar artesanal, até massa constante e, posteriormente triturados em liquidificador. O farelo obtido permaneceu armazenado em recipiente fechado até a utilização.

4.4.2 Fermentação em estado sólido (FES)

As FES foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 150 mL contendo 10 g de farelo de casca de banana umedecidos com água destilada (40% de umidade), 1% de óleo residual de fritura foi utilizado como indutor da atividade de lipase (m/m). Os frascos foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm, por 40 minutos. Após o resfriamento, o substrato foi inoculado com 1 mL da suspensão de esporos na concentração de 10^8 esporos. mL⁻¹ e incubado a 28°C. O cultivo foi interrompido após 120 horas para extração das enzimas e avaliação das variáveis pH e atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A análise do crescimento foi determinada por observação visual durante os ensaios, de acordo com o padrão adaptado da ASTM (American Society for Testing Materials), *Standard Methods* G21-90 (1990).

Imagem 5 - Fermentação semissólida do farelo da casca de banana em frascos de Erlenmeyer

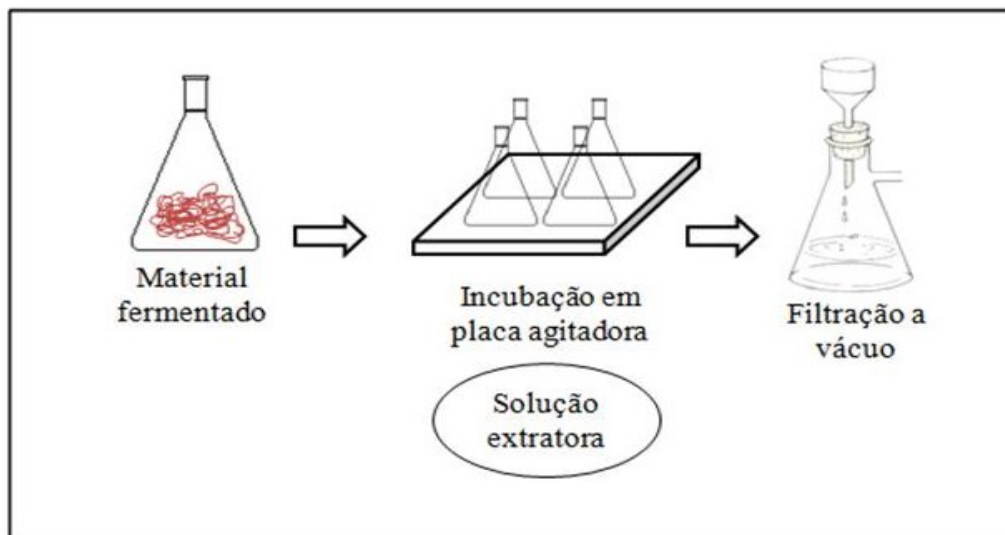


Fonte: ROZENDO, 2016.

4.4.3 Extração das enzimas

Para a obtenção do extrato enzimático foi realizada uma adição de 20 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (SANTOS *et al.*, 2012). O conteúdo de cada frasco foi homogeneizado manualmente por 5 min, seguido de agitação em agitador orbital durante 20 min, a 150 rpm a temperatura ambiente (AMORIM, 2011). O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro qualitativo com auxílio de uma bomba a vácuo e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática (Figura 11).

Figura 11 - Etapas do processo de extração das enzimas lipases



Fonte: (ROZENDO, 2016).

4.4.4 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade das amostras foi medido com o auxílio de uma balança determinadora de umidade modelo MOC-63U/marca SHIMADZU, sendo utilizados para análise uma amostra de 0,5 g do material, permanecendo durante 15 min. a 105 °C. O ajuste da umidade da massa do meio a ser umidificado foi obtido pela Equação 1.

$$\text{VAA (g.cm}^{-3}\text{)} = \text{mAA} = [\text{m}_i \cdot (\text{U}_2 - \text{U}_1)] / (1 - \text{U}_2) \quad (6)$$

Sendo que:

VAA = volume de água a ser adicionada ao meio;

m_i = massa do meio a ser umidificado;

U_1 = umidade do meio;

U_2 = umidade do meio desejada.

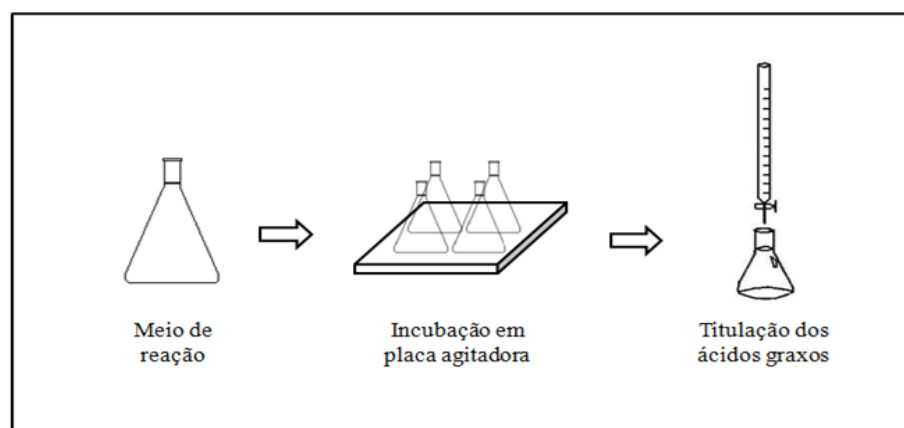
4.4.5 Determinação do pH

A determinação do pH no extrato bruto obtido, foi realizada em um equipamento pHmetro devidamente calibrado.

4.4.6 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade lipolítica foi realizada seguindo o método de (PASTORE *et al.*, 2003; DANTAS; AQUINO, 2010) com modificações. O meio de reação foi composto de: 1 mL de extrato enzimático; 4 mL de tampão fosfato de sódio (pH=7,0, 50 mM) e 1g de azeite de oliva comercial. Foram emulsionados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com auxílio de aparelho vórtice o tampão fosfato e o azeite de oliva. Adicionou-se a este sistema 1 mL de extrato enzimático e o sistema foi mantido sob incubação em temperatura ambiente por 30 minutos a 130 rpm. A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de acetona:etanol (1:1 v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,05M tendo fenolftaleína como indicador. Preparou-se um branco contendo o mesmo meio de reação sem o extrato enzimático, o qual foi mantido nas mesmas condições descritas anteriormente. O branco recebeu o extrato enzimático logo em seguida à adição de acetona:etanol e então foi titulado. As etapas do processo são mostradas na Figura 12.

Figura 12 - Etapas do processo de determinação da atividade enzimática



Fonte: (ROZENDO, 2016).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μM de ácido graxo por minuto nas condições de reação. A atividade enzimática no meio de extração pode ser calculada segundo a Equação 2 (CORTÁS, 2008).

$$U = \frac{(V_a - V_b) * M * 1000}{t * V_c} \quad (7)$$

Sendo:

U = Atividade enzimática da lipase ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$);

V_a = Volume de NaOH gasto para titular a amostra (mL);

V_b = Volume de NaOH gasto para titular o branco (mL);

V_c = Volume da amostra (mL);

M = Concentração da solução de NaOH ($\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$);

t = Tempo de reação (min).

4.5 PRODUÇÃO DE BIODIESEL

A esterificação do ácido oléico e a transesterificação do óleo de babaçu foi realizada via catálise enzimática para a produção de biodiesel utilizando procedimento descrito na literatura para as diversas lipases comerciais com algumas modificações (SHIMADA et al., 1999). Para o estudo da transesterificação enzimática do óleo de babaçu foi utilizado o extrato enzimático bruto produzido a partir do fungo *Aspergillus sp.* As reações foram realizadas em erlenmeyers de 125 ml com adição de óleo de babaçu (5,0 g, 5,4 mL) e o extrato bruto enzimático contendo lipase (1mL). As reações foram executadas em agitador orbital (Tecnal) a temperatura ambiente a 130 rpm. Após os períodos de 0, 1, 2 e 3 horas foi adicionado o etanol (15,0 mL) a cada uma das amostras do experimento realizado em quadruplicata, devido a inibição enzimática causada pelo álcool.

4.5.1 Separação do biodiesel do coproduto

O produto da reação enzimática foi separado da glicerina por meio de um funil de separação, que foi deixado em repouso por 24 h. Em seguida, a glicerina, coproduto da reação de transesterificação, que se encontrava na fase inferior do funil de separação foi removida. O

álcool e o hidróxido que não reagiu na reação de transesterificação foram removidos junto com a glicerina.

4.5.2 Determinação de parâmetros de qualidade do biodiesel

Para a determinação das concentrações das misturas biodiesel:diesel foi utilizado um espectrofotômetro de infra-vermelho (IV) da marca Shimadzu modelo IR Prestige-21, com reflectância atenuada (ATR) acoplado, com as seguintes condições de análise: Região 4000 - 600 cm^{-1} ; Resolução: 4 cm^{-1} ; N° acumulações: 20; Modo: transmitância. Para verificar a qualidade do biodiesel foi realizado espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), que permite a determinação semi-quantitativa de componentes de uma amostra ou mistura, esteja ela no estado sólido, líquido, gasoso ou em solução (não-aquosa).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As determinações das características físico-químicas do óleo foram necessárias para verificação do estado de conservação em que a matéria-prima a ser utilizada na reação de transesterificação se encontrava, e conseqüentemente garantir a produção de um biodiesel de boa qualidade. Embora não exista uma especificação definida para óleos vegetais destinados a produção de biodiesel, considera-se como referência a especificação dos parâmetros gerais definidos pela ANVISA. A Tabela 8 ilustra os dados de análises físico-químicas obtidos a partir das equações referidas em cada uma das metodologias utilizadas.

Tabela com caracterização físico-química do óleo de babaçu.

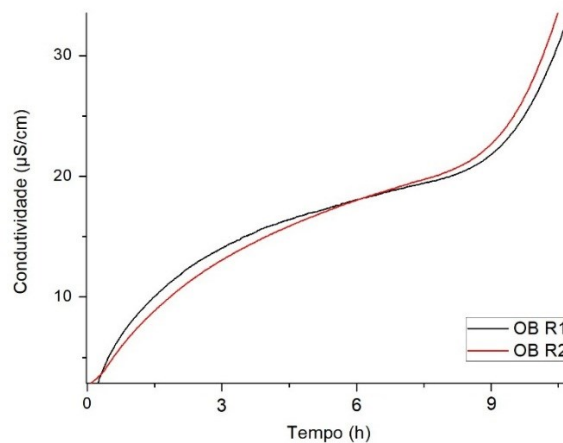
PARAMETROS	ÓLEO DE BABAÇU	ANVISA
Índice de Iodo (Wijs)	13,30	10 - 18
Índice de acidez (mg KOH/g óleo)	0,35	Máximo de 0,4
Índice de peróxido (meq/Kg óleo)	1,9	Máximo de 10
Índice de saponificação	149	189-195
Viscosidade cinemática	30,38	30

Fonte: Próprio autor, 2019

A estabilidade Oxidativa foi realizada em dois equipamentos sendo eles o PetroOxy e o Rancimat. A estabilidade térmica e oxidativa do óleo de coco babaçu a 110°C foi de 6,40 h para

o equipamento PetroOxy e 9,18 h para o Rancimat. O Gráfico 3 mostra os resultados de análises de cada amostra de óleo comprovando que a composição química do óleo vegetal influencia na estabilidade a oxidação do óleo vegetal, e conseqüentemente na estabilidade do Biodiesel produzido. Além disso, os gráficos demonstram que o período de indução do óleo antes do início da oxidação é um tempo relativamente extenso se comparado com óleos vegetais brutos que em geral apresentam período de indução muito curto ou apresentam oxidação desde o início da análise de estabilidade oxidativa.

Gráfico 3 - Gráfico da estabilidade oxidativa do óleo babaçu realizado em duplicata no Rancimat.

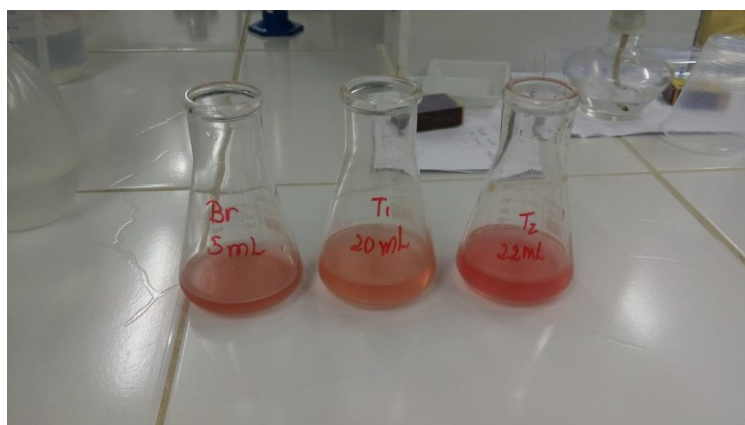


Fonte: Próprio autor, 2019

OB R1= Amostra 1

OB R2= Amostra 2

O pH do extrato obtido após 120 h apresentou valor estável de 4,76. A produção enzimática média nos extratos produzidos por *Aspergillus sp* foi de 170 U.mL⁻¹. Na Figura 22 é mostrado o resultado da titulação realizada para determinar a produção enzimática por *Aspergillus sp*. em farelo de casca de banana.

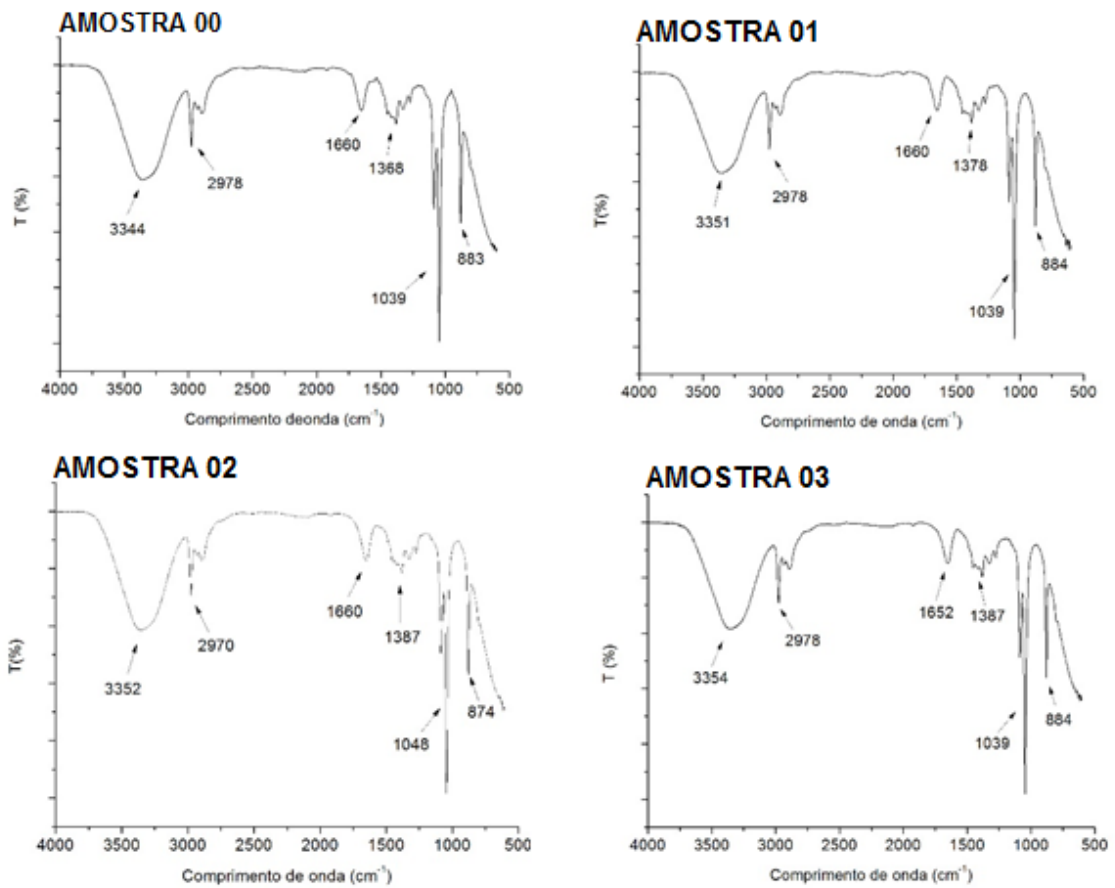
Imagem 6 - Determinação da atividade enzimática.

Fonte: Próprio autor, 2019

O teste de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizado para verificar a qualidade do produto da transesterificação do óleo de babaçu pela lipase de *Aspergillus sp* biodiesel foi realizado nos comprimentos de onda entre 500 e 4000 cm^{-1} para as quadruplicatas (Gráfico 4). Um gráfico comparativo para análise é mostrado na figura 24, em que se observa que os grupos funcionais responsáveis pelas bandas de absorção típicas dos triacilglicerídeos no infravermelho é um sinal de intensidade média próximo de 1000 cm^{-1} característico da deformação axial do grupo C-O do éster. Bandas intensas com absorbâncias em 2978 cm^{-1} são atribuídas respectivamente, as vibrações de deformação axial simétrica e assimétrica dos grupos CH_2 de ácidos graxos em triacilglicerídeos. Os espectros de infravermelho das amostras oxidadas revelaram depressões próximos a 3.300 cm^{-1} indicando a presença de hidroperóxidos, os quais são normalmente formados durante a oxidação. A presença de uma banda de absorção em 1682 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$) associada com absorção entre 1300 e 1000 cm^{-1} (νCO) é indicativa da função éster. As absorções entre 1300 e 1100 cm^{-1} (νCO) e a presença de banda de absorção a 3344 a 3354 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$) permitem assinalar que a substância tem função mista - éster e fenol. A absorção em 2970 a 2978 cm^{-1} é característica de $\nu\text{Csp}^3\text{-H}$ e as absorções em 1660 e em 3354 cm^{-1} ($\nu\text{Csp}^2\text{-H}$) confirmam a presença de estrutura aromática. A absorção DE 874 a 864 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$, ArH) indica o padrão 1,4-dissubstituído, concluindo-se que as amostras poder corresponder ao 4-hidróxi-benzoato de metila (I) ou ao monoacetato de hidroquinona (II). Por meio do ponto de fusão (pf) e pela comparação com o espectro de infravermelho de uma amostra autêntica é possível concluir que se trata do 4-hidróxi-benzoato de metila (I). Esses resultados indicam que não houve formação de biodiesel e que o material analisado é constituído basicamente de etanol, o que pode indicar que a

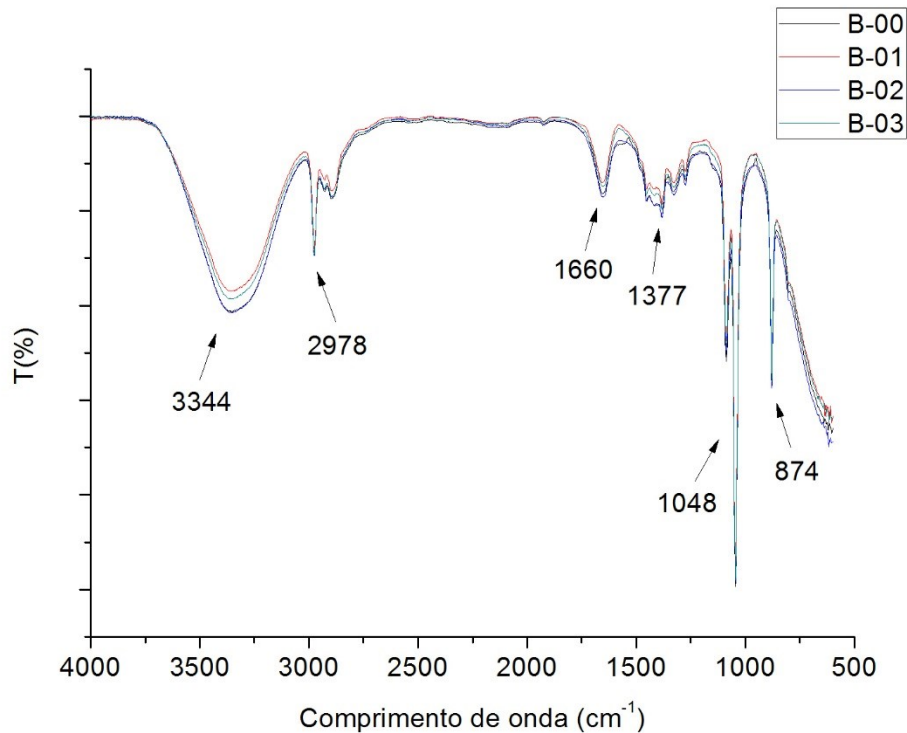
quantidade de álcool adicionada ao sistema tenha sido excessiva, impedindo a reação enzimática.

Gráfico 4 - Espectro de infravermelho das quadruplicatas (amostras 00, 01, 02 e 03).



Fonte: Próprio autor, 2019

Gráfico 5 - Espectro infravermelho comparativos entre as amostras 00, 01, 02 e 03.



Fonte: Próprio autor, 2019

5.1 DISCUSSÃO

De acordo com os parâmetros indicados pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 270 de 22/09/2005 da ANVISA para óleos vegetais, os valores do índice de iodo, índice de acidez, índice de peróxido e viscosidade encontram-se enquadrados nas suas devidas especificações. Embora o índice de saponificação esteja abaixo do especificado este não altera significativamente o rendimento em ésteres do biodiesel produzido. Logo, o óleo de babaçu utilizado é uma boa matéria prima para a produção de biodiesel. Dessa forma, a matéria prima apresenta rendimentos em ésteres para a produção do biodiesel, e que este não será afetado por este fator.

Os resultados alcançados por meio dos equipamentos Petro-OXY e Rancimat indicaram que o óleo de babaçu apresenta boa estabilidade oxidativa e pode ser utilizado na produção de biodiesel, uma vez que o valor mínimo para estabilidade térmica e oxidativa para o uso de óleo vegetal é de 6 h na produção de biodiesel, de acordo com OCS Cd 12b-92 (AOCS – American Oil Chemists' Society), ISO 6886, CDM.

A atividade de lipase do extrato bruto de *Aspergillus sp* apresentou atividade alta e adequada para a produção de biodiesel, mostrando que o extrato em condições favoráveis pode ser utilizado em processos de esterificação e transesterificação, segundo Andrade *et al.* (2012), que consideram como uma alta atividade lipolítica valores acima de 60 U.mL⁻¹.

Apesar da qualidade do óleo de babaçu e da alta atividade enzimática, a ausência de biodiesel pode na produção ter ocorrido pela falta de controle da temperatura, que pode ter impedido a enzima de agir na transesterificação.

6 CONCLUSÕES

O óleo de babaçu obtido apresenta características apropriadas para a produção de biodiesel;

O extrato bruto de *Aspergillus sp* apresentou quantidade de lipase suficiente para realização da esterificação e transesterificação;

No entanto o processo utilizado necessita de ajustes, como controle de temperatura, imobilização da enzima e dosagem do etanol a ser adicionada ao sistema.

Como sugestão para novos trabalhos, seria interessante a experimentação para controle e determinação da temperatura, bem como o uso de diferentes tipos de fungos da coleção do laboratório de microbiologia do CDSA.

REFERENCIAS

- ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 968-975, 2002.
- ABREU, F. R.; LIMA, D. G.; HAMÚ, E. H.; WOLF, C.; SUAREZ, P. A. Z. Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols. *Journal of Molecular Catalysis*, **29: 209, 2004**.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GAS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Regulamento Técnico ANP N° 3/2014. Resolução ANP N° 45, de 25.8.2014 - DOU 26.8.2014. BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Plano Nacional de Agroenergia. Brasília, 2005. 120p.
- AKHTAR, M. W.; MIRZA, A. Q.; CHUGHTAI, M. I. D. Lipase induction in *Mucor hiemalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 257-263, 1980.
- AKOH, C. C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995-9005, 2007.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L. ; OLIVEIRA, P. C. ; CASTRO, Heizir Ferreira de . Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic (Print) JCR**, v. 84, p. 183-188, 2012.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Review: Enzymatic
- AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign: Champaign: AOCS, 1993
- BALAT, M.; BALAT, H. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. **Energy Conversion and Management**, v. 49, p. 2727-2741, 2008.
- BARBOSA, S. L.; DABDOUB, M. J.; HURTADO, G.R.; KLEIN, S.I.; CUNHA, C. R.; BARONI, A. C.M.; SANTANA, B. M.; ANDRADE, P.B.; ARAÚJO, M. L.; BOTOLETO, D. A. Catalisadores ácidos de fase sólida em reações de esterificação. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005.
- BARON, A. M.; SARQUIS, M. I. M. ; BAIGORÍ, M. ; KRIEGER, N. . A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic JCR*, Estados Unidos, v. 34, p. 25-32, 2005.
- BEZERRA, J. B. Babaçu: As guerreiras do Mearin. Revista Globo Rural. São Paulo: Editora Globo, 1999; 6:38-45.
- BRANDÃO, K. S. R.; SILVA, F. C.; LOUZEIRO, H. C.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; MOURA, K. R. M. Otimização do processo de produção de biodiesel metílico e etílico de babaçu. I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, artigos técnicos-científicos, 2006.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. *Química do Processamento de Alimentos*. São Paulo, Livraria Varela, p.33-39, 2001.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. *Biochemistry*. 5. ed. Harlow: Brooks Cole, 2005. p. 415-418.

CARDENAS, F.; CASTRO, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; VALMASEDA, M.; ELSON, 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, Luis Roberto; SILVA, Mariane Lima da; ÁVILA, João Carlos Cruz. Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto do Babaçu. Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). Brasil, 2012.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA, G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, p. 239-247, 2000.

UVARANI, G.; JAGANATHAN, L.; SHRIDAS, P.; BOOPATHY. Purification and characterization of lipase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 57, p. 607-610, 1998.

COSTA, V.E.U.; AMORIM, H.L. 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. 863-864, 1999.

DALSENTER, F.D.H.; VICCINI, G.; BARGA, M.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.A. mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of growth in solid-state culture. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 801-807, 2005.

DANTAS, H. J.; SOUZA, A. G.; SILVA, M. C. D.; SANTOS, I. M. G.; FERNANDES Jr, V. J.; SINFRÔNIO, F. S. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; NOVAK, C. S. Thermal and kinetic evaluation of cotton oil biodiesel. *Journal of thermal Analysis and calorimetry*, v. 90, p. 945, 2007.

DAVRANOV, K.; KUILIBAEV, I. Characteristics of the molecular forms of lipases synthesized by the fungus *Rhizopus microsporus*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 29, p. 788-790, 1993.

DERMIBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, v. 50, p. 14-34, 2009.

DEVANESAN, M. G.; VIRUTHAGIRI, T.; SUGUMAR, N. Transesterification of *Jatropha* oil using immobilised *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, p. 2497-2501, 2007.

DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, A.; ABOUSALHAM.; CARRIÈRE, F.; BARATTI, J. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: a textbook**. 5. ed. New York: Springer, 2004. p. 212-234.

FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, p. 569-576, 2000.

GANESAN, D.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. An overview on the recent advances in the transesterification of vegetable oils for biodiesel production using chemical and biocatalysts. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 8, p. 367– 394, 2009.

GARDNER, R.; KASI, S.; ELLIS, E. M. Detoxication of the environmental pollutant acrolein by a rat liver aldo-keto reductase. *Toxicology Letters* 148: 65, 2004.

GHALY, A. E.; DAVE, D.; BROOKS, M. S.; ET AL. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 103-110, 2010.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 335-363, 2004.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 459-464, 1999.

HAAS, M. J.; CICHOWICZ, D. J.; BAILEY, D. G. Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. **Lipids**, v. 27, p. 571-576, 1992.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 1-2, p. 80-87, 1999.

JAEGER, K.E.; RANASK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JUNIOR, A. S.; Substituição parcial do farelo de soja e milho por farelo de babaçu na terminação de ovinos. 2003. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2003.

KAMINISHI, Y.; TANIE, H.; KUNIMOTO, M. Purification and characterization of lipases from *Aspergillus repens* and *Eurotium herbariorum* NU-2 used in "Katsuobushi" molding. **Fisheries Science**, v. 65, p. 274-278, 1999.

KERMASHA, S.; SAFARI, M.; BISAKOWSKI, B. Characterization of purified lipase fractions from *Rhizopus niveus*. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 46, p. 4451-4456, 1998.

Knothe, G.; Steidley, K. R.; *Fuel* **2005**, *84*, 1059.

- KRIEGER, N. **Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- KUNDU, M.; BASU, J.; GUCHHAIT, M.; CHAKRABARTI, P. Isolation and characterization of an extracellular lipase from the conidia of *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 149-153, 1987.
- LACERDA, F. B.; SILVA, F. C.; MELO, C. K.; BRANDÃO, K. S. R.; CARDIAS, H. T. C. Otimização das condições reacionais do processo de produção de biodiesel etílico a partir do óleo de babaçu (*Orbignya martiana*) Encontro Nacional dos estudantes de Química, São Luís, **2005**.
- LEITMAN, P.; Henderson, A.; Noblick, L. & Martins, R.C. 2012. Arecaceae. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: . Acesso em 30 nov. 2019.
- LIMA, J. R. O; SILVA, R. B.; SILVA, C. M. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. *Química Nova*, 30: 600, 2007.
- LIMA, P.C.R. Biodiesel: Um novo combustível para o Brasil, Brasília (DF): Consultoria legislativa, Fev. 2005.
- LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potencial for use in biocatalysis of lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam, v. 31, p. 53-61, 2004.
- LIN, S. F.; LEE, J. C.; CHIOU, C. M. Purification and characterization of a lipase from *Neurospora* sp TT-241. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 6, p. 739-745, 1996.
- MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v.70, n.1, p.1-15, 1999.
- MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 17, p. 115-119, 1997.
- MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P.;MAGALHÃES, F. A. R.; FURTADO, M. M. Utilização de óleo de coco babaçu, concentrado protéico de soro lácteo e leite em pó desnatado na produção de sorvetes. 2005. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.
- MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300–1311, 2007.
- MAIA, M. M.; MORAIS, M. M. C.; MORAIS Jr., M. A.; MELO, E. H. M.; LIMA, F. J. L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 304-309, 1999.
- MAIA, I. S. ; SANTOS, N. A. C. ; AMARAL, B. A. ; CASTRO, V. D. ; CARVALHO, J. R. M. ; SANTOS, R. M. G. . BIODIESEL DE SOJA - Prática Experimental de Transesterificação para Aulas de Química Organica. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade

Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Livro de resumos da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo: SBQ, 2006

MASE, T.; MATSUMIYA, E.; MATSUURA, A. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 329-330, 1995.

MAYORDOMO, I.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETOISOLATION, J. A. Purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 105–109, 2000.

MDCI - Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior. Secretaria de Tecnologia Industrial. Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais. Brasília: STI/CIT, 1985.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification- A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248-268, 2006.

MINNING, S.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R.D. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 147-156, 1998.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Plano Nacional de Fortalecimento das Comunidades Extrativistas e Ribeirinhas–PLANAFE: 2017-2019. Brasília, DF: MMA, 2017

MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na industria de alimentos. São Paulo: Ed. UFSC: Florianópolis, 1989.

NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Expression of lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: high-level production and purification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, p. 488- 492, 1996

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2004. p. 367.

CASTRO, H. de F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

PALMER, T. **Understanding enzymes**. 4. ed. Oxford: Prentice Hall, 1995, p. 1-411.

PARAWIRA, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**; v. 29, p. 82–93, 2009.

PARENTE, E. J. de S.; *Biodiesel – Uma aventura tecnológica num país engraçado*, Unigráfica: Fortaleza, 2003.

PARENTE, E.J. de S.; SANTOS JUNIOR, J.N.; PEREIRA, J.A.B.; PARENTE JUNIOR, E.J. de S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza: Tecbio, 68p. 2003.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TAKADA, N.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. *Penicillium abeanum* lipase: Purification, characterization, and its use for docosahexaenoic acid enrichment of tuna oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 5, p. 498-501, 1996.

- PETER, S. K. F.; GANSWINDT, R.; NEUNER, H. P.; WEIDNER, E.; Alcoholysis of triacylglycerols by heterogeneous catalysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **104, 324, 2002.**
- PHILLIPS, A.; PRETORIUS, G. H. J.; Purification and characterization of an extracellular lipase of *Galactomyces geotrichum*. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 833-838, 1991
- PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; MICHELLE, J. C. R.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, B. A. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p.1313-1330, 2005.
- MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, J.M.K.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.
- CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRIK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L.C.2000. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium*: purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 215-222, 2000.
- TOIDA, J.; KONDOH, K.; FUKUZAWA, M.; OHNISHI, K.; SEKIGUCHI, J. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 7, p. 1199-1203, 1995.
- SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMIDT, R. Purification and some properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1124, p. 253-261, 1992.
- GOPINATH, S. C. B.; HILDA, A.; PRIYA, T. L.; ANNADURAI, G.; ANBU, P. Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 7, p. 681-689, 2003.
- RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A K.; WILHELM, H. M. Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 31, p. 28-37, 2003.
- RAPP, P. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 832-838, 1995.
- REDA, S. Y. **Estudo Comparativo de Óleos Vegetais Submetidos a Estresse Térmico**. Dissertação (Avaliação tecnológica de matérias primas). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.153p.
- ROBINSON, M.L. Cultivated Palm Seed Germination. Cooperative Extension Bulletin. University of Nevada. 1991. Disponível em: Acesso em outubro de 2019.
- RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264-2269, 2006.

ROSSEL, J.B. Grassas y alimentos grassos. In: RANKEN, M.D. Manual de Indústria de los Alimentos. Editora Acríbia, Zaragoza, 2. ed., 1993. p. 195-225.

ROZENDO, A. S. Produção de lipase por fungo *aspergillus sp.* em fermentação no estado sólido utilizando farelo de casca de banana. 2016. 53p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de biotecnologia e Bioprocessos) –Universidade Federal de Campina Grande, Sumé –PB, 2016.

RUIZ, B.; FARRÉS, A.; LANGLEY, E.; MASSO, F.; SÁNCHEZ, S. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. **Lipids**, v. 36, p. 283-289, 2001.

SANTOS, J. R. de J. BIODIESEL DE BABAÇU: Avaliação Térmica, Oxidativa e Misturas Binárias, 2008. 117 f. Tese (Doutorado em Química) – Curso de PósGraduação em Química. Universidade Federal da Paraíba. 2008.

SANTOS, N. A. Propriedades termooxidativas e de fluxo de Biodiesel de Babaçu – Orbignya Phalerata. João Pessoa, Programa de Pós-graduação em Química, UFPB, 2008. Dissertação de mestrado, 159p.

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiology Methods**, v. 52, p.1-18, 2003.

SOUZA, E. C. M. Babaçu. Boletim da Sociobiodiversidade. Volume 1, nº1, p. 23-28, Conab. ISSN: 2527-1598. 2017^a

SRISVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy*, 4: 111, 2000.

SAIKI, T.; TAKAGI, Y.; SUZUKI, T.; NARASAKI, T.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Studies on lipoprotein lipases of microorganisms: Purification and general properties of lipoprotein lipase produced by *Mucor javanicus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 414, 1969.

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, p. 768-775, 2009

SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMIDT, R.

TANDY, D. Oilseed extraction. In: TANDY, D. Introduction to facts and oils technology. Illinois: American Oil Chemists' Society, 1991.

TECBIO. Disponível em: <Http://www.tecbio.com.br/biodieselnobrasil> Acessado em 30.10.2019.

TEIXEIRA, M. A. Heat and Power demands in babassu palm oil extraction industry in Brazil. *Energy Conversion and Management* **46: 2068, 2005.**

TEIXEIRA, M. A.; Departamento de Energia - FEM- UNICAMP. Biomassa de babaçu no Brasil.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2. ed. New York: Wiley, 1995, p. 94.

WAN, P.J. Oilseed extraction. In: WAN, P.J. Introduction to facts and oils technology: properties in facts and oils. Illinois: American Oil Chemists' Society, 1991. 112 p.

WUBBOLTS, M.G.; BUCKE, C.; BIELEKI, S. How to get the biocatalyst. In: STRAATHOF, A.J.J.; ADLERCREUTZ, P. **Applied Biocatalysis**. 2nd ed. Amsterdam: Academic Publishers, Cap. 5, p. 153-211, 2000.

YASUDA, M.; OGINO, H.; KIGUCHI, T.; KOTANI, T.; TAKAKURA, S.; biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleos vegetais. **Revista de Química Industrial**, 717: 17, 2001.