



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
UFAM **PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**
EM BIOTECNOLOGIA

**SELEÇÃO DE LIPASE MICROBIANA PARA APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE
HIDRÓLISE E DE ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DA AMÊNDOA DE INAJÁ
(*Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude) VISANDO PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Manaus-AM

2015

ALESSANDRA KARISA COSTA LIMA DO NASCIMENTO

**SELEÇÃO DE LIPASE MICROBIANA PARA APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE
HIDRÓLISE E DE ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DA AMÊNDOA DE INAJÁ
(*Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude) VISANDO PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia para área agroflorestal.

Orientadores: Dr. Jamal da Silva Charar (UFAM)

Dra. Ires de Paula Andrade Miranda (INPA)

Manaus-AM

2015

N244s Nascimento, Alessandra Karisa Costa Lima do
Seleção de lipase microbiana para aplicação em reações de hidrólise e esterificação do óleo da amêndoa do inajá (*Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude) visando produção de biodiesel. / Alessandra Karisa Costa Lima do Nascimento. 2015
105 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Jamal da Silva Chaar
Coorientadora: Ires de Paula Andrade Miranda
Tese (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Óleo de inajá. 2. lipase bacteriana. 3. hidroesterificação. 4. biodiesel. I. Chaar, Jamal da Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



184ª. ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 02 de outubro de 2015 às 14h, na Sala de Aula do Bloco “G” Setor- Sul- UFAM, **Alessandra Karisa Costa Lima do Nascimento**, defendeu sua Tese de Doutorado intitulada “**Seleção de lipase microbiana para aplicação em reações de hidrólise e esterificação do óleo da amêndoa de inajá (*Maximiliana maripa*) visando a produção de biodiesel**”.

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Jamal da Silva Chaar (orientador)	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dra. Sonia Maria da Silva Carvalho (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dr. André Luis Willerding (CBA)	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dra. Márcia Neiva (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ()	

Manaus, 02 de outubro de 2015.

Resultado Final: Aprovado (X)
Reprovado ()

Coordenador do PPGBIOTEC- UFAM

*Aos meus filhos Sofia Elena e Artur Benício e, ao meu
companheiro Edí, amores da minha vida!*

Dedico

Observei outra coisa debaixo do sol:

Não é o mais veloz que ganha a corrida, nem o mais forte que vence na batalha. O pão não é para os mais sábios, nem as riquezas para os mais inteligentes, nem o favor para os mais cultos, porque tudo depende do tempo e do acaso.

(Eclesiastes 9, 11)

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda humanidade”.

Marie Currie (1867-1934)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais. A oportunidade está sendo bem aproveitada, agradeço a vocês por ter chegado até aqui.

Ao Dr. André Willerding por disponibilizar os isolados bacterianos lipolíticos e ser um colaborador 100% efetivo. Muito obrigada!

A Dra. Ires de Paula Miranda, um agradecimento especial, pois além de harmonizar o estudo com seus conhecimentos em palmeiras também tem sido um exemplo de integridade, sensatez e dedicação.

A todo grupo de alunos de Iniciação Científica do Labpalm-Inpa pela energia jovem e salutar. E aos colegas Marcelo Lima do Laboratório Técnico de Triagem do INPA e Hítalo Viana por todo auxílio na etapa de beneficiamento dos frutos. Foi uma empreitada.

Ao Dr. Jamal da Silva Char pela oportunidade oferecida para o desenvolvimento do projeto.

Ao Sr. Beto Kimura por gentilmente fornecer e transportar a matéria prima para este estudo.

Aos trabalhadores da Agroindústria de Extração de Óleos de Manaquiri pelo apoio na extração do óleo da amêndoa do inajá.

Ao grupo de alunos de pós-graduação do Bloco G-CAM pelos momentos, ora de descontração ora de bancada, mas sempre em ambiente amistoso.

A Dra. Dina do Laboratório de Tecnologias de DNA, amiga e parceira de bancada. Conseguimos!

A Dra. Relem Cativo pela importante ajuda na primeira fase do estudo, mas sobretudo pela amizade.

Aos queridos professores Dr. José Odair Pereira e Dr. Spartaco Astolfi Filho, que há muito me inspiram admiração e que, nesse estudo, me agraciaram com suporte financeiro e laboratorial. Muito obrigada!

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia e aos avaliadores da banca pela apreciação, disponibilidade e importantes sugestões.

E, finalmente, ao CNPq e FAPEAM, pelo importante apoio financeiro na forma de bolsas de pós-graduação.

Agradeço de coração!

RESUMO

As reações de hidrólise e esterificação têm grande importância nas indústrias biotecnológicas e recentemente, têm sido utilizadas como etapas de uma nova tecnologia para produção de ésteres de biodiesel. O biodiesel a partir de oleaginosas é uma importante estratégia para o uso sustentável da biomassa, compreendida como principal fonte de matérias primas para geração de combustíveis renováveis. O estado do Amazonas dispõe de várias espécies de palmeiras oleaginosas nativas ainda pouco exploradas, mas com potencial para produção de agroenergia. Entre elas, a palmeira de inajá (*Maximiliana maripa* (Aubl.)Drude) tem sido reportada como potencial matéria prima para compor a base da cadeia produtiva desse biocombustível. Mediante algumas desvantagens do processo químico, como a dificuldade de separação dos produtos e a necessidade da utilização de elevados níveis de energia na reação, nos últimos anos aumentou significativamente o interesse pela biocatálise utilizando lipases. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi determinar a produção de lipase dentre 44 isolados bacterianos a fim de selecionar aquele com melhor atividade hidrolítica por meio de fermentação submersa aliando o aproveitamento do óleo da amêndoa do inajá, não refinado e de caráter saturado como substrato. Inicialmente, fez-se obtenção da matéria prima e sua caracterização química e de constituição em ácidos graxos. Posteriormente, foram realizados testes com as bactérias em meio de cultura sólido com rodamina B para detecção de halos lipolíticos. A atividade enzimática foi determinada pelo método de hidrólise do p-nitrofenil laurato (p-NPL) e confirmada pelo método titulométrico empregando o óleo de inajá. Dentre as bactérias testadas a produtora da LIPB17 apresentou a melhor afinidade ao óleo de inajá e sua preparação bruta mostrou atividade hidrolítica 349,8 U/mL e atividade específica 8587,8 U/mg. Essa lipase com cerca de 45kDa (SDS – PAGE) foi selecionada para os testes de hidrólise do óleo de inajá e esterificação do ácido láurico. Foram realizados ensaios para o estudo do efeito da temperatura, tempo, pH e porcentagem de enzima, nas reações de hidrólise do óleo de inajá, utilizando um delineamento fatorial completo 2^4 com triplicata do ponto central. A reação atingiu uma conversão de 57,49% na temperatura de 28 °C, tempo de 48 horas, pH 6 e o máximo de enzima (7,5%), sendo a temperatura a variável mais significativa ($p < 0,05$). No caso da esterificação, foi aplicado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para análise da influência da temperatura, concentração de enzima (E %) e RM ácido láurico:etanol. A reação atingiu conversão de 55,59% de ácido láurico em ésteres etílicos 30 °C, com 7,5% de lipase previamente liofilizada e delipidada, razão molar ácido:etanol (1:4), mais uma vez a temperatura e também a razão molar foram as variáveis mais significativas ($p < 0,05$). A LIPB17 foi caracterizada como um bacilo Gram-negativo e mostrou 99,5% de identidade com

Pseudomonas fluorescens linhagem KC30 (KF733015). Estes resultados permitiram verificar que a lipase não comercial de *P. fluorescens* (LIPB17) tem potencial para ser aplicada como biocatalisador em reações de hidrólise e de síntese de ésteres etílicos, o que permite concluir que estes processos enzimáticos são meios eficazes para a obtenção de monoalquil ésteres (biodiesel).

Palavras-chave: Óleo de inajá, lipase bacteriana, hidroesterificação, biodiesel.

ABSTRACT

The hydrolysis reactions and esterification have great importance in biotechnology industries and recently, has been used as steps of a new technology for production of biodiesel esters. The biodiesel from the oilseeds is important strategy for the biomass sustainable use, comprehended as main source of raw material to generate of renewable fuels. The Amazonas state dispose of many native oil palm still unexplored, but as great potential for agroenergy production. Between them, the inajá palm tree (*Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude) has been reported as potential raw material for compose the base productive chain these biofuel. Through some disadvantages of chemical process, as a difficulty to separate from products and the need of use of high levels of reaction energy, in the last years increased significantly the interest by the biocatalyst using lipases. Therefore, the goal of this work was to determine the production of lipases between 44 bacterial isolates in order to select that with better active hydrolytic by means of submerged fermentation combining the use of inajá almond oil, do not refined and the saturated character as substrate. Initially, do itself obtaining the raw material and yours chemical characterization and the constitution in fatty acids. Posteriorly were realized test with the bacteria in solid culture medium with rhodamine B for detection of lipolytic halos. The enzymatic activity was determined by the of hydrolysis of p-nitrophenyl laurate (p-NPL) and confirmed by the titration method using the oil of inajá. Among the bacteria tested the producer of LIPB17 presented the best affinity to inajá oil and its crude preparation showed activity hydrolytic 349.8 U/mL and specific activity 8587.8 U/ mg. This lipase with about 45kDa (SDS-PAGE) was selected for inhalation oil hydrolysis tests and esterification of lauric acid. Tests were carried out to study the effect of temperature, time, pH and percentage of enzyme, in the hydrolysis reactions of Inajá, using a complete factorial design 24 with triplicate of the central point. The reaction reached a conversion of 57.49% at the temperature of 28°C, time of 48 hours, pH 6 and the maximum enzyme (7.5%), the temperature being the most significant variable ($P < 0.05$). In the case of esterification, a central composite design was applied (DCCR) 23 for the analysis of the influence of temperature, enzyme (E%) and RM lauric acid: ethanol. The reaction reached conversion of 55.59% of lauric acid in ethyl esters 30°C, with 7.5% of lyophilized lipase and molar ratio: acid: ethanol (1: 4), once again the temperature and also the molar ratio were the most significant variables ($p < 0.05$). LIPB17 was characterized as a Gram-negative bacillus, and showed 99.5% identity with *Pseudomonas fluorescens* strain KC30 (KF733015). These results showed that non-commercial lipase of *P. fluorescens* (LIPB17) has potential to be applied as biocatalyst in reactions of hydrolysis and synthesis of ethyl esters,

which allows conclude that these enzymatic processes are effective means of obtaining monoalkyl esters (biodiesel).

Keywords: Inajá oil, bacterial lipase, hydroesterification, biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Reação geral de hidrólise de um triacilglicerídeo.....	20
Figura 2- Reações catalisadas por lipases. Fonte: Almeida (2005).	21
Figura 3- Uso do biodiesel no Brasil. Fonte: www.biodieselbr.com	26
Figura 4- Produção de matérias primas por região. Fonte: MAPA (2008) e UBRABIO (2009).	30
Figura 5 Distribuição de populações da palmeira inajá (Adaptado do Google).	32
Figura 6- Palmeira oleaginosa <i>M. maripa</i> (A) e detalhes da inflorescência e cachos de inajá (B). Fotos: Beto Kimura (2012).	33
Figura 7- Partes integrantes do fruto de inajá (<i>M. maripa</i>). Fonte: Matos (2010).	33
Figura 8- Reações de síntese do biodiesel. Fonte: Bastos (2013).	35
Figura 9- Processo de hidroesterificação	36
Figura 10- A e B: área de inajazal em Parintins – AM. C e D: coleta da matéria prima. Fotos: Beto Kimura (2012).	42
Figura 11- Etapas do beneficiamento dos frutos de inajá (<i>M. maripa</i>).	43
Figura 12- Etapas para extração e filtração do óleo das amêndoas do inajá.	43
Figura 13- Formação do halo ao redor das colônias de isolados bacterianos indicando a ação da lipase em meio contendo óleo de inajá como substrato.	63
Figura 14- Variação média do IAL para os doze isolados bacterianos selecionados em placa de Petri a 30 °C por 72 horas.	65
Figura 15- Hidrólise de p-nitrofenil laurato para seleção da lipase em função das atividades das preparações lipásicas dos nove isolados.	66
Figura 16- Atividade da lipásica e atividade específica da LIPB17 por titulometria	68
Figura 17- Perfil eletroforético de SDS-PAGE 12% da proteína secretada pelo isolado LIPB17. 1-Marcador de massa molecular; 2- amostras do sobrenadante de LIPB17; 3- lipase comercial de <i>Pseudomonas cepacia</i> (Sigma-Aldrich).	69

Figura 18- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, da amplificação da região 16S do rDNA dos isolado B17. Poço 1 – Marcador de peso molecular de 1Kb da fermentas; Poço 2 – Amostra 1 (B17).....	70
Figura 19-Figura 18- Diagrama de Pareto para a varável resposta em % de hidrólise do óleo de inajá com a preparação lipásica bruta LIPB17.	74
Figura 20- Curva de contorno dos efeitos estimados para variáveis tempo e pH estudadas na conversão do ácido láurico utilizando lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i> (LIPB17).	74
Figura 21- Curva de contorno dos efeitos estimados para variáveis tempo e pH estudadas na conversão do ácido láurico utilizando lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i> (LIPB17).	75
Figura 22- Consumo de AGL no meio reacional pela LIPB17.	76
Figura 23-Gráfico comparativo da conversão em éster (%) da LIPB17 e <i>B. cepacia</i>	76
Figura 24- Curva de contorno para a Reação de Esterificação com relação à Temperatura e Razão Ácido:Álcool.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Aplicações potenciais de lipase	25
Tabela 2- Estudos de produção de ésteres por hidroesterificação utilizando lipases	38
Tabela 3- Variáveis e níveis para o planejamento fatorial completo com três níveis e quatro variáveis para ensaios de hidrólise do óleo de inajá com enzima do isolado LIP 17.....	52
Tabela 4- Matriz do planejamento fatorial completo 2^4 com valores reais e respectivos valores codificados para as variáveis temperatura, tempo (horas), pH e concentração de enzima lipase.	52
Tabela 5- Variáveis e níveis dos planejamentos experimentais para atividade de esterificação.	56
Tabela 6- Matriz do delineamento composto central rotacional 2^3 com seus níveis codificados e reais para avaliação das variáveis temperatura, concentração da enzima e razão molar ácido láurico:etanol da lipase LIPB-17.	57
Tabela 7- Resultados das análises físico-químicas do óleo.	59
Tabela 8- Composição em ácidos graxos (%) do óleo da amêndoa de frutos de inajá oriundos de Parintins-AM.	61
Tabela 9. Seleção primária dos isolados bacterianos lipolíticos em função dos Índices de Ativação da Lipase (IAL) no período de 72 horas a 30 °C (valores médios de cinco replicatas e duas repetições).	64
Tabela 10- Atividade lipolítica total e específica, biomassa e proteínas totais dos nove isolados bacterianos selecionados para análises quantitativas.	67
Tabela 11- Matriz para o planejamento fatorial completo 2^4 com seus níveis reais e codificados e com as respostas da conversão de hidrólise (%).	72
Tabela 12- Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial completo para reação de hidrólise enzimática do óleo de inajá com lipase de LIPB17.	73
Tabela 13- Coeficientes de regressão do planejamento fatorial completo 2^4 para resposta hidrólise (%) enzimática do óleo de inajá com a lipase de LIPB17.	73

Tabela 14 - Matriz para o DCCR 2³ com seus níveis reais e codificados e com as respostas da conversão de esterificação (%).77

Tabela 15- Análise de variância (ANOVA) para o DCCR 2³ para reação de hidrólise enzimática do ácido láurico com lipase de LIPB17.....78

Tabela 16- Coeficientes de regressão para a resposta esterificação (%) do ácido láurico 79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 LIPASES	20
2.1.1 <i>Características e propriedades</i>	20
2.1.2 <i>Lipases de origem microbiana e produção</i>	22
2.1.3 <i>Aplicações potenciais das lipases</i>	24
2.1.4 <i>Determinação da atividade lipásica</i>	25
2.2 BIODIESEL	26
2.2.1 <i>Matérias primas para produção de biodiesel</i>	28
2.2.2 <i>Oleaginosas nativas da Amazônia</i>	30
2.2 CARACTERÍSTICAS DA <i>MAXIMILIANA MARIPA</i> (AUBL.) DRUDE	31
2.2 TECNOLOGIAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	35
2.2.1 <i>Produção de ésteres de biodiesel por hidroesterificação utilizando lipases</i>	38
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	42
4.1.1 <i>Beneficiamento dos frutos</i>	43
4.2 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE INAJÁ	44
4.2.1 <i>Índice de acidez</i>	44
4.2.3 <i>Índice de saponificação</i>	44
4.2.4 <i>Índice de peróxido</i>	45
4.2.5 <i>Densidade</i>	46
4.2.6 <i>Viscosidade</i>	46
4.2.7 <i>Derivatização do óleo da amêndoa de inajá</i>	46
4.3 PRODUÇÃO DE LIPASE BACTERIANA EXTRACELULAR	47
4.3.1 <i>Fonte de lipase</i>	47
4.3.2 <i>Seleção primária dos isolados bacterianos produtores de lipase</i>	47
4.3.3 <i>Deteção da atividade lipásica em placa de Petri (análise qualitativa)</i>	47
4.3.4 <i>Manutenção dos micro-organismos</i>	48
4.3.5 <i>Preparação de lipase via fermentação submersa</i>	48
4.4 DOSAGEM DE PROTEÍNA	48

4.5 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA (MASSA CELULAR SECA) -----	49
4.6 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO MOLECULAR DA ENZIMA -----	49
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PREPARAÇÃO LIPÁSICA BRUTA -----	49
4.7.1 Método da hidrólise do p-NPL em meio aquoso -----	49
4.7.2 Método titulométrico -----	50
4.8 REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE INAJÁ -----	51
4.8.1 Planejamento experimental -----	51
4.9 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE CO-SOLVENTE (SLS) -----	53
4.9.1 Secagem e delipidação da preparação enzimática -----	53
4.9.2 Cromatografia em camada delgada (CCD) -----	54
4.9.3 Determinação da atividade de esterificação da lipase LIPB-17 -----	54
4.9.4 Síntese de ésteres por esterificação utilizando LIPB-17 -----	55
4.9.5 Planejamento experimental -----	56
4.10 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DO ISOLADO BACTERIANO LIPB17 -----	58
4.11 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR -----	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	59
5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DA AMÊNDOA DO INAJÁ -----	59
5.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS -----	61
5.3 SELEÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS PRODUTORES DE LIPASE COM ATIVIDADE HIDROLÍTICA -----	62
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DAS PREPARAÇÕES LIPÁSICAS SOBRE O SUBSTRATO SINTÉTICO P-NPL -----	65
5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA PELO MÉTODO TITULOMÉTRICO -----	67
5.6 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LIPB17 -----	69
5.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL – REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE INAJÁ -----	71
5.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A CONVERSÃO DE ÁCIDO LÁURICO EM ÉSTER ETÍLICO -----	75
REFERÊNCIAS -----	81
ANEXO -----	102

1 INTRODUÇÃO

O biodiesel é partícipe do conjunto de energias alternativas que se relacionam com um regime energético mais sustentável. Este biocombustível pode se tornar um dos substitutos dos combustíveis de origem fóssil, e tem como principais componentes ésteres obtidos a partir de álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol) e misturas de ácidos graxos de cadeia longa (ácidos palmítico, oleico, láurico, entre outros) derivados de óleos vegetais, em especial da soja. Emergindo no Brasil cada vez mais consistente, o biodiesel vem estimulando a produção de melhores tecnologias tanto na produção de insumos agrícolas como na indústria, gerando muitos estudos conexos aos vários seguimentos do contexto biodiesel pelo país.

A síntese do biodiesel em processos industriais já estabelecidos é normalmente feita por transesterificação alcalina devido aos altos rendimentos (acima de 95%) obtidos em tempos curtos de reação. No entanto, este processo requer o uso de fontes de triacilglicerídeos (TAGs) com baixo teor de ácidos graxos livres (AGLs) (< 1%) e umidade (< 0,5%) o que inviabiliza o uso de matérias-primas de baixo custo, que contêm quantidades significantes de AGLs e água. AGLs consomem com facilidade o catalisador alcalino, formando sabão, e a água pode hidrolisar os TAGs diminuindo o rendimento da reação. Além disso, o sabão emulsiona os produtos, dificultando o processo de recuperação do biodiesel.

Como alternativa ao processo convencional de transesterificação, o processo de hidroesterificação envolve uma etapa de hidrólise seguida de esterificação e tem como principal característica a utilização de óleos com elevado percentual de ácidos graxos livres e elevada umidade. Neste processo, todos os TAGs são convertidos em AGLs que podem ser submetidos a um processo de esterificação. Com isso, é possível obter altos rendimentos em monoésteres totalmente livres de glicerol, uma vez que este componente é removido na etapa preliminar de hidrólise. As etapas de hidrólise dos TAGs e de esterificação dos AGLs podem ser catalisadas por via química ou por via enzimática, ou ainda pela combinação das duas vias (ARANDA, 2003; VYAS et al., 2010; CEBIN et al., 2012).

A catálise enzimática para síntese de biodiesel utilizando lipases possui vantagens que estão relacionadas à utilização de condições brandas, biodegradabilidade do catalisador e redução do volume de efluentes resultantes do processo de purificação do biodiesel. As principais limitações do uso da via enzimática estão ligadas ao alto custo de produção de enzimas e sua baixa estabilidade nos meios reacionais de síntese e

aos tempos elevados de reação. A maioria dos estudos de síntese de ésteres catalisada por lipases faz uso de co-solventes hidrofóbicos, pois estes aumentam a solubilidade dos substratos e pode aumentar também a estabilidade da enzima. Contudo, processos de síntese de biodiesel realizados em sistemas livres de co-solventes (SLC) são recomendados para viabilizar a aplicação industrial das lipases (SOARES, 2014).

Assim como para o desenvolvimento de processos, existe o interesse em diversificar as matérias primas (óleos e gorduras) para produção de biodiesel. Com base nisso, a *Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude é uma palmeira nativa do norte brasileiro que apresenta alta produtividade em solos quimicamente pobres, tolerância aos períodos inundados, alta resistência ao fogo; e, frutos com elevado teor de óleo (60%). Uma palmeira de inajá produz de 5 a 6 cachos por ano, e cada cacho, pode ter de 500 a 3.000 frutos (MIRANDA et al., 2008). De acordo com a literatura, estima-se que o inajá produza cerca de 3.690 litros de óleo por hectare ano (LOPES, 2014).

No Amazonas, o inajá de permeio com outras palmeiras oleaginosas nativas compõem o conjunto florestal circunjacente as áreas rurais com atividade pecuarista, e assim como outros frutos amazônicos, pode ser aproveitado de forma integral considerando seus óleos, principalmente o das amêndoas que têm características indicadoras de uma fonte potencial para provimento de energia primária. Sendo esta a principal motivação para selecioná-la como matéria prima para o desenvolvimento da tese.

Compartilhando dessas premissas, este estudo apresenta dois desdobramentos. No primeiro, o uso do óleo vegetal de uma palmeira nativa pouco explorada e com boa adaptabilidade em áreas degradadas como potencial matéria prima para produção de biodiesel. E o segundo, na área biotecnológica com a aplicação da catálise enzimática em reações de hidrólise e de esterificação em sistema livre de co-solvente utilizando etanol e lipase extracelular selecionada e produzida por fermentação submersa como alternativa para síntese deste composto de alto valor agregado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lipases

2.1.1 Características e propriedades

As Lipases (triacilglicerol hidrolases E.C.3.1.1.3) são definidas classicamente como carboxilesterases que catalisam a hidrólise de ligações éster de TAGs de cadeia longa liberando ácidos graxos e glicerol (Figura 1).

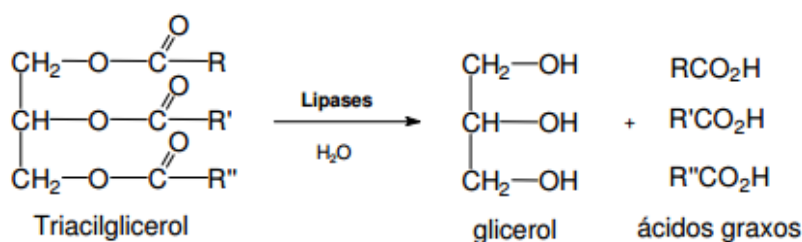


Figura 1- Reação geral de hidrólise de um triacilglicerídeo.

Todavia, na presença de solventes orgânicos anidros (meio aquo-restrito) estas enzimas são capazes de catalisar reações de síntese como esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise) e interesterificação (Figura 2) (CASTRO et al. 2003; PAQUES E MACEDO, 2006; COELHO et al. 2013).

Em geral, lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH (entre 4 a 10) e de temperaturas que variam desde a ambiente até 70°C, possuem elevada especificidade e propriedades de régio, quimio e enantiosseletividade, tornando-as altamente aplicáveis em diferentes processos industriais (VILLENEUVE et al. 2000; HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

São enzimas com ampla distribuição na natureza, pois são produzidas nos tecidos animais e vegetais, e na biomassa microbiana. Do ponto de vista comercial, as principais fontes de obtenção de lipases são os micro-organismos, tanto os eucariotos (leveduras e fungos) como os procariotos (bactérias, incluindo-se os actinomicetos), em virtude de sua forma hábil de atuar em biocatálise (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; SAXENA et al. 2003).

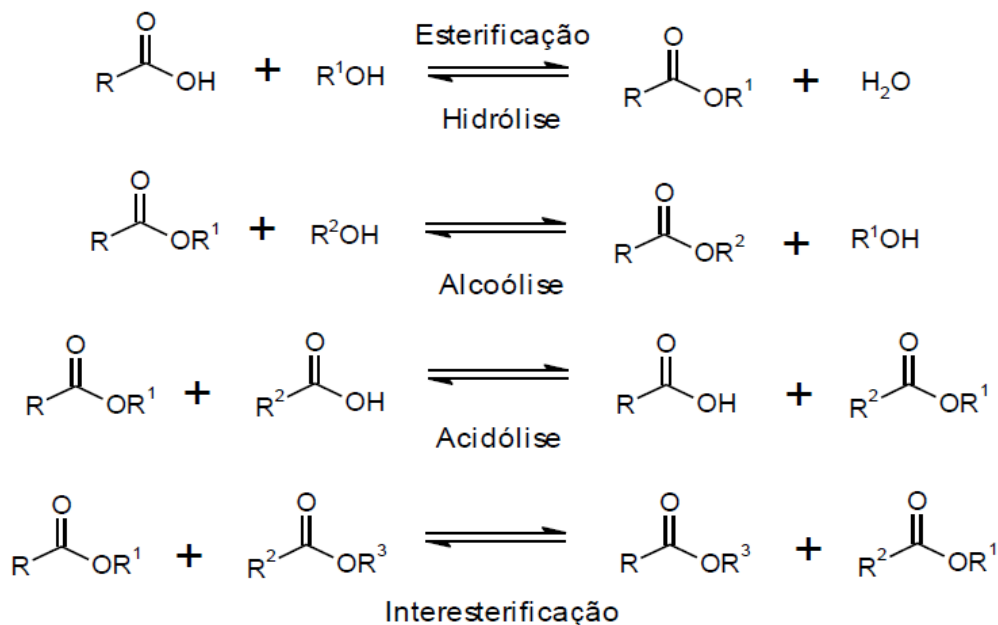


Figura 2- Reações catalisadas por lipases. Fonte: Almeida (2005).

Estas enzimas têm sido relatadas, com massa molecular variando entre 19 kDa (lipase de *Bacillus subtilis*) e 97 kDa (lipase de *Aeromonas sóbria*), embora tenha sido relatada uma lipase de alta massa molecular 207 kDa produzida por *Candida deformans* (CYGLER e SCHRAG, 1997). Estruturalmente, existem semelhanças entre suas sequências de aminoácidos que estão limitadas a curtas extensões localizadas em torno do sítio ativo. As lipases possuem um único domínio, com exceção das lipases pancreáticas, e compartilham o padrão conformacional $\alpha\beta$ hidrolase, onde está situada a tríade catalítica constituída por resíduos de serina, histidina e ácido aspártico ou ácido glutâmico (Ser-His-Asp/Glu) (OLLIS et al. 1992; JAEGER E REETZ, 1998; CARVALHO, 2012).

O sítio ativo da maioria das lipases é protegido por uma cadeia peptídica hidrofóbica denominada tampa ou *lid*. Em meios aquosos, sem um substrato hidrofóbico, a tampa recobre o sítio catalítico da lipase, que fica inativo. Na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases são adsorvidas na interface hidrofóbica, ocasionando mudanças na sua estrutura, expondo o sítio ativo e ativando a enzima. Esta mudança na estrutura tridimensional da lipase em interfaces óleo-água é conhecida como “ativação interfacial” (SARDA e DESNUELLE, 1958; HOLWERDA et al. 1936; SAXENA et al. 2003). As lipases de *Candida antarctica* (UPPENBERG et al. 1994), *Geotrichum*

candidum (SCHRAG et al. 1991), *Thermomyces lanuginosa* (CAJAL et al. 2000) são exemplos de lipases que apresentam a tampa e sofrem ativação interfacial.

A presença da tampa na estrutura da enzima e o mecanismo de ativação interfacial já foram fatores determinantes para a caracterização de lipases. Contudo, foi constatado que a presença da tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, é o caso das cutinases, que não apresentam a tampa e exercem atividade hidrolítica sem ativação interfacial (SECUNDO et al. 2006). Ainda mais peculiar é o caso das lipases de *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B que possuem a tampa em suas estruturas mas não tem ativação artificial (CYGLER; SCHRAG, 1997; JAEGER E REETZ, 1998).

Outro critério mais aceito atualmente é a especificidade preferencial pelo substrato, que diferencia uma lipase de uma esterase. Os substratos naturais das lipases são TAGs constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, com a trioleína como substrato padrão, enquanto que as esterases hidrolisam ligações ésteres únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar. Com base nesse princípio, a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos das esterases, enquanto que o inverso não é verdadeiro (JAEGER; REETZ, 1998).

2.1.2 Lipases de origem microbiana e produção

Em 1906 foram iniciados os estudos sobre produção de lipases provenientes dos micro-organismos (HASAN et al. 2006). Desde então, o interesse sobre lipases microbianas apenas aumentou, pelo que se vê em número de artigos publicados, e os principais aspectos investigados são referentes às propriedades bioquímicas, biologia molecular, e em particular, às aplicações biotecnológicas destas enzimas (GANDHI, 1997).

As bactérias e os fungos são bons produtores de lipases e da maioria das enzimas com aplicações biotecnológicas, devido ao rápido crescimento, boa estabilidade, alta conversão de substrato em produto e produção, em sua maioria de lipases extracelulares, tornando mais simples sua obtenção em comparação às de origem animal e vegetal (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Além disso, muitos destes micro-organismos podem ser manipulados geneticamente com certa facilidade e ser cultivados em meios de cultivos de custo módico (SHARMA et al. 2005).

As características e propriedades físico-químicas das lipases microbianas apresentam muita heterogeneidade, como especificidade em presença de diferentes

substratos, estabilidade em pH, temperatura e solventes orgânicos. Estas propriedades variam também entre os gêneros e até entre as isoformas produzidas pelo mesmo micro-organismo. Assim, a comparação entre as propriedades de diferentes lipases é complicada, devido à falta de padronização das metodologias utilizadas (SOARES, 2014).

A especificidade é um fator decisivo na seleção de uma lipase, pois está relacionada com as propriedades moleculares da enzima, com a estrutura do substrato e com fatores que afetam a ligação enzima-substrato. A especificidade pode ser classificada em relação: a) substrato – uma enzima apresenta diferentes velocidades de reação de hidrólise entre triacil-, diacil- e monoacilgliceróis; b) à regiosseletividade – as enzimas hidrolisam ligações ésteres de acordo com a posição na molécula, podendo ser sn-1,3 ou sn-1,2 específicas, ou aleatoriamente em qualquer ligação; c) aos ácidos graxos que compõem o substrato – preferência por ácidos graxos com comprimento de cadeias e graus de insaturação específicos; d) à estereosseletividade – discriminação entre enantiômeros em misturas racêmicas. As lipases podem também ser não seletivas ou apresentar a combinação de mais de um tipo de especificidade (MACRAE E HAMMOND, 1985; WILLIS E MARAGONI, 1999).

Outro aspecto interessante refere-se a obtenção dessas fontes microbianas. Em que comumente têm sido isoladas de solos contaminados com óleo, resíduos industriais, alimentos em deterioração ou de rizosferas (GADRE, 2002; ABADA, 2008; WILLERDING et al. 2011). Embora seja conhecido um acervo considerável de micro-organismos produtores de lipases, este representa cerca de 0,2 a 0,6 % de bactérias e 5% para fungos (WUBBOLTS et al. 2000).

Portanto, denota-se que aprimorar o conhecimento destas enzimas perpassa também pela definição das condições ótimas de cultivo dos micro-organismos com a finalidade de atender as necessidades nutricionais (GUPTA et al. 2004). O processo de produção de lipases envolve numerosas variáveis que vão desde a composição do meio (incluindo tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio) até as condições operacionais como pH, temperatura, agitação e aeração (CARVALHO, 2012).

O pH do meio de crescimento é importante tanto por induzir mudanças morfológicas no organismos quanto por favorecer a secreção enzimática (GUPTA et al. 2004). Tem sido demonstrado que o valor de pH ótimo para o crescimento pode variar de acordo com o micro-organismo, e que este, pode não ser o mesmo para a produção de lipase (JAEGER E EGGERT, 2002).

Tanto o crescimento microbiano quanto as reações enzimáticas em si são fenômenos dependentes da temperatura. Lipases bacterianas geralmente têm atividade em temperatura ótima que varia de 30 a 60 °C, embora se tenha relatos de lipases com temperatura ótima abaixo de 30°C ou acima de 60°C (SHARMA et al. 2011).

Numerosas fontes de carbono podem ser citadas para o cultivo de micro-organismos, com a finalidade de produção enzimática, dentre elas fontes sintéticas (glicose, xilose, maltose, lactose, sacarose, carboximetilcelulose, entre outras) e fontes naturais (bagaço de cana, farelo de aveia, azeite de oliva, óleo de soja, óleo de pescado, borra de óleo, entre outras) (CARVALHO, 2012).

Quanto aos cultivos, meios de cultura líquidos suplementados com concentrações fixas de vários compostos lipídicos têm sido empregados na obtenção de um rendimento elevado na produção de lipase. Segundo a literatura, as fontes de nitrogênio mais utilizadas para produção são peptona, uréia, sulfato de amônio, extrato de levedura, cloreto de amônia e nitrato de amônia. Em geral, os micro-organismos fornecem altos rendimentos de lipase quando se utiliza como fonte de nitrogênio um composto orgânico (SHARMA et al. 2001).

As lipases microbianas são tradicionalmente obtidas por fermentação submersa (FS) onde se utiliza um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis onde a célula produtora se desenvolve sob agitação. A técnica de FS pode ser realizada em frascos erlenmeyers agitados, em incubadora rotatória, mas também é facilmente realizada em grande escala, pois os fermentadores possuem agitadores que garantem homogeneidade do meio, o que permite o controle de vários parâmetros do processo (CASTRO et al. 2004).

2.1.3 Aplicações potenciais das lipases

A versatilidade das lipases tem sido investigada tanto para substituir processos já existentes como para produzir produtos originalmente considerados inviáveis de serem obtidos por via química convencional. Esta habilidade catalítica proporciona às lipases uma aplicação de fronteiras, pois podem ser utilizadas em meio aquoso e em meio orgânico na produção de fármacos, cosméticos, detergentes, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, produção de aromas e fragrâncias, modificação de gordura e tratamentos de couro. Em destaque na Tabela 4 setores industriais e aplicações de lipases em hidrólise e esterificação (JAEGER E EGGERT,

2002; SAXENA et al., 2003; FERNANDES, 2007; GUIMARÃES E CASTILHO, 2008).

Tabela 1- Aplicações potenciais de lipase

Indústrias	Aplicações	Produtos
Hidrólise		
Alimentos	Hidrólise da gordura do leite	<i>Flavour</i> lácteo
	Hidrólise de óleos e gordura	Ácidos graxos, mono e diacilglicerídeos
Química	Biorremediação	Reagentes para análise de gordura
	Tratamento de efluente gorduroso	Biossurfactantes
	Análise de ácidos graxos de TAG	Redução de sólidos
	Remoção de manchas e gorduras	Detergentes
Médica	Análise de TAG no sangue	Kits de diagnósticos
Farmacêutica e agroquímica	Hidrólise <i>estéreo-específica</i>	Resolução de misturas racêmicas
Esterificação		
Química fina	Síntese de ésteres	Compostos quirais intermediários: terapêutico; ésteres e emulsificantes; <i>flavour</i> , fragrância para cosméticos; agroquímicos, herbicidas.
Biologia , Farmacêutica, Química	Transesterificação hidroesterificação	Óleos e gorduras; Biodiesel
Têxtil	Síntese de poliésteres	Poliésteres biodegradáveis, aromáticos, fibras sintéticas.
Alimentos	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas

2.1.4 Determinação da atividade lipásica

Além da diversidade de lipase existente, várias metodologias de dosagem da atividade lipolítica têm sido utilizadas. A reação padrão mais comum para a determinação da atividade lipolítica é a hidrólise de TAGs de um óleo com a quantificação dos ácidos graxos liberados (SCHMIDT et al., 2005).

Um método útil para a seleção de micro-organismos lipolíticos é o zimograma, que consiste na detecção qualitativa da atividade de lipase secretada em meio sólido contendo ágar, meio de cultivo e substrato (tributirina, trioleína, óleo de oliva, Tween-80). Neste, pode-se observar a formação de halos claros ao redor das colônias, que correspondem às zonas do substrato hidrolisado. Quando utilizado Rodamina B como substrato, é possível observar a formação de halos fluorescentes sob luz UV (KOUKER; JAEGER, 1987; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; BECKER et al., 2005).

Dentre os vários métodos disponíveis para acompanhar a atividade de lipase presente no meio fermentativo, os mais utilizados são os colorimétricos que utilizam substratos sintéticos como ésteres de ácidos graxos de *p*-nitrofenila (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e laurato) e o titulométrico que emprega a trioleína como substrato padrão. Um substrato alternativo de baixo custo é o óleo de oliva que contém em média 70 % de trioleína (GUPTA et al., 2003; LIMA et al., 2004; MESSIAS et al., 2009).

2.2 Biodiesel

Em 2005, a Lei 11.097 dispôs sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira e estabeleceu percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel (Figura 3). Esta mesma lei definiu o biodiesel como “biocombustível derivado da biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustível de origem fóssil”. Em 2009, o Conselho Nacional de Política Energética – CNPE determinou o teor obrigatório de biodiesel na mistura em 3% e em 2010, razões macroeconômicas levaram o Governo Federal a antecipar o uso obrigatório da mistura B5¹ (RAMOS E WILHELM, 2005; ANP, 2012; BRASIL, 2008; RAMOS et al., 2011).



Figura 3- Uso do biodiesel no Brasil. Fonte: www.biodieselbr.com

¹ Segundo informações da Agência, em 2010 a emissão de CO₂ da queima do combustível já foi reduzida com o uso do B5. Menos poluição, mais qualidade de vida e saúde. Além da economia, que, ainda segundo a ANP é considerável: US\$ 1,4 bilhão a menos em gastos com importações de diesel fóssil.

Quimicamente, o biodiesel pode ser definido como um combustível alternativo constituído por ésteres alquílicos de ácidos carboxílicos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos e gorduras vegetal e animal, ou residual, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (CANDEIA, 2008). Enquanto produto, suas principais características são: biodegradabilidade e atóxicidade ; ausência de enxofre² e de compostos aromáticos proporcionando uma combustão limpa e sem a formação de SO₂ (gás que provoca a chuva ácida), e de compostos cancerígenos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos); elevado número de cetano e conseqüentemente, elevado poder de autoignição e combustão (COSTA NETO et al., 2000; BIODIVERSIDADE, 2004; TECBIO, 2004; GONZALEZ et al., 2008):

Entre 2005 e 2010, foram investidos R\$ 4 bilhões na indústria nacional de biodiesel. Este investimento possibilitou a geração de 1,3 milhões de empregos na cadeia produtiva, da lavoura aos postos de combustíveis. Segundo a Ubrabio (2013), para produzir os 2,7 bilhões de litros em 2012 a indústria operou com apenas 40% de sua capacidade instalada, porém, agentes do setor afirmam que a indústria brasileira tem como aumentar a participação do biodiesel na matriz energética (FERRÉS, 2013; UBRABIO, 2013). Estas considerações tornam compreensível visionar o biodiesel como uma seara de oportunidades a contemplar as regiões brasileiras com suas contribuições. Na região Amazônica, por exemplo, o biodiesel pode envolver o aproveitamento de espécies naturais, interferindo positivamente em um dos principais gargalos regionais, a falta de dinamismo em comunidades isoladas por falta de acesso à energia elétrica (BARBOSA et al., 2009).

Também como um produto biotecnológico, pode contribuir para garantir suprimento combustível e/ou energético no futuro atendendo, por exemplo, as comunidades isoladas como consumidores finais. No âmbito da biotecnologia, seguem os estudos em bioprospecção de microrganismos lipolíticos, processos de produção e recuperação de extratos enzimáticos, meios de cultivo e testes com indutores no processo de síntese (MURUCI et al., 2011; WILLERDING, 2011; SANTOS, 2012; AGROENERGIA, 2012).

² O Conselho Nacional do Meio Ambiente-Conama tem como objetivo fazer com que o Brasil chegue a um S10 (10 partes por milhão de enxofre no diesel) em 2013, o que irá colaborar muito para que a população respire um ar mais puro. Se isso ainda for associado a uma mistura maior de biodiesel no diesel, da ordem de 20% nas regiões metropolitanas, esses benefícios serão, certamente, potencializados.

2.2.1 Matérias primas para produção de biodiesel

Na prática, os ésteres alquílicos de ácidos graxos são obtidos principalmente de TAGs contidos em óleos e gorduras de plantas ou animais, espuma de esgoto e óleos residuais com álcoois de cadeia curta, como metanol e etanol (UBRABIO, 2009).

Contudo, a abordagem dos óleos vegetais como matéria prima para o biodiesel estabelece o uso da biomassa prontamente disponível (GONZALEZ et al, 2008). De forma geral, todos os óleos vegetais considerados fixos podem ser convertidos em biocombustíveis de primeira geração (biodiesel e álcool), sendo o etanol também um reagente no processo de produção do biodiesel (ENCARNAÇÃO, 2008; SUAREZ et al., 2009).

Historicamente, a utilização dos óleos vegetais em motores diesel foi testada desde o surgimento desse tipo de motor, no final do século XIX (DABDOUB E BRONZEL, 2009). No decorrer do século XX, a utilização de óleos vegetais puros foi considerada insatisfatória e impraticável, por apresentarem uma série de fatores limitantes como alta viscosidade, conteúdos de ácidos graxos livres, combustão incompleta e baixa volatilidade que resultam na formação de depósitos nos injetores de combustível das máquinas (SCHUCHARDT et al., 2001).

Essas restrições incitaram gradualmente a investigação do uso de ésteres derivados dos óleos vegetais utilizando tecnologias que predominam até os dias de hoje. Estes ésteres, em virtude de suas propriedades, podem ser empregados puros ou em misturas com o diesel, nestes casos não exigindo quaisquer modificações nos motores (MACEDO, 2003). Óleos, assim como gorduras, são constituídos por moléculas de TAGs (ésteres formados por uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos). As longas cadeias de ácidos carboxílicos contidas nos ácidos graxos além de esterificadas com glicerol (mono, di e triacilglicerídeos) também podem estar livres e incluem quantidade significativa de oxigênio na sua estrutura (FACCINI, 2008). Estas fontes de ácidos graxos podem variar quanto à extensão da cadeia carbônica no número, orientação e posição das ligações duplas (MA E HANNA, 1999).

No Brasil, o óleo da soja é o lastro para produção de biodiesel e deve continuar assim por pelo menos até a próxima década. O teor de óleo não é demasiado na soja, é baixo se comparado a outras oleaginosas, também possui baixa produtividade por hectare, porém, sua cultura possui a maior área plantada com cerca de 20 milhões de hectares (MAPA, 2006; GONZALEZ et al., 2008). Todavia, uma cadeia produtiva bem estabelecida e a detenção de domínio tecnológico e logístico são os pontos fortes que

fazem da soja a principal responsável pela produção brasileira de óleos vegetais, apesar de o óleo corresponder a aproximadamente 20% do conteúdo do grão (UBRABIO, 2010; FIORESE, 2011; BRASIL, 2013).

Em 2008, o Brasil tornou-se o quarto maior produtor mundial de biodiesel, nesse ínterim, a produção foi de aproximadamente um milhão de toneladas. Em 2009, esse número atingiu 1,3 milhões de toneladas e espera-se que continue a crescer gradualmente, o que reflete a importância da diversificação das oleaginosas (ABIOVE, 2009; AMARAL, 2009).

Existe no país uma diversidade de espécies oleaginosas com peculiaridades que variam conforme as características de cada região ou Estado brasileiro onde estão presentes. Com base nisso, vários estudos têm sido reportados sobre o potencial de fontes oleaginosas não usuais, não raro consorciando oleaginosas perenes, como a macaúba e o pinhão-manso, com a produção de gado e grãos. Ou, ainda, o desenvolvimento de biorreatores para a produção de óleos proveniente de algas (SUAREZ et al., 2009; TEIXEIRA, 2012) e fungos (TAPANES et al., 2013).

A Tabela 1 mostra a relação entre produtividade agrícola e consequente produtividade de óleo por hectare das principais oleaginosas³ estudadas como fontes oleaginosas para síntese de biodiesel, e a Figura 4 apresenta as participações destas espécies nas cinco regiões do país.

Tabela 1- Características das principais oleaginosas para produção de biodiesel no país.

Matéria prima	Teor de óleo (%)	Produtividade – grãos (Kg/ha)	Produtividade – óleo (Kg/ha)
Soja	20	2.800	530
Pinhão manso	38	5.000	1.500
Amendoim	45	2.400	788
Girassol	45	1.800	774
Canola	38	1.500	570
Algodão	19	1.900	361
Mamona	48	1.000	470
Dendê	26	15.000	4.000
*Inajá	60	-	-

Fonte: MAPA (2007).

³ As oleaginosas são plantas que contêm um alto teor de óleo, tanto a partir de suas sementes (soja, colza/canola, girassol) como a partir de seus frutos (palma, babaçu, coco), podendo ser utilizadas para a produção de óleo vegetal. Outra característica importante de algumas dessas plantas é o fato de que após a extração do óleo, os subprodutos podem ser utilizados para diferentes aplicações.



Figura 4- Produção de matérias primas por região. Fonte: MAPA (2008) e UBRABIO (2009).

A inclusão de informações sobre novas matrizes oleaginosas a efeito de melhorar suas qualidades energética e econômica tem duplo alcance, pois com o aproveitamento de espécies locais trabalha-se a questão mais importante a ser considerada na cadeia do biodiesel, a matéria prima (GOES et al., 2010). As vantagens de diversificá-las se estendem também ao melhor aproveitamento do solo, priorizando arranjos produtivos que não desloquem cultivos alimentares e não avancem sobre as áreas de florestas, a exemplo de sistemas agroflorestais e do manejo extrativista sustentável (MIRANDA et al., 2001; 2003; BABILÔNIA et al., 2013).

2.2.2 Oleaginosas nativas da Amazônia

A competência da região amazônica para provimento de matérias primas para bioenergia é evidenciada, entre outras características, pelo fato de que dos 37 gêneros e das 387 espécies de palmeiras nativas do país, 32 gêneros e cerca de 200 espécies são naturais da flora amazônica brasileira (COSTA E MARCHI, 2008). Essas espécies estão

distribuídas em florestas de terra firme em ecossistemas de platô, vertente e baixio, em campinaranas, em florestas periodicamente inundadas e em áreas desmatadas, e, embora elas tenham importância econômica, ambiental e social, o uso efetivo para fins energéticos ainda não foi vislumbrado a contento (MIRANDA et al., 2003; MIRANDA E RABELO, 2008; VALOIS, 2008).

Figliuolo et al. (2007) suscitaram que para produção sustentável de biodiesel na Amazônia é importante adotar um tripé estratégico que consiste: a) na seleção de espécies oleaginosas nativas com ampla distribuição e de ocorrência em adensamentos florestais naturais; b) no uso de partes de renovação contínua (folhas, frutos e sementes) e com alto rendimento em óleo e, c) na utilização preferencial de óleos com altos percentuais de ácidos graxos saturados e de baixo peso molecular médio.

Centrando-se no Amazonas, as possibilidades de geração do biodiesel estão voltadas principalmente para as espécies *Astrocaryum aculaetum*, o tucumã do Amazonas (CASTRO, 2006; FIGLIUOLO et al., 2007; NASCIMENTO E DALLAN, 2007; BARBOSA et al., 2009; LIMA et al., 2012), *O. phalerata*, o babaçu e *M. maripa*, o inajá (CONCEIÇÃO, 2010).

2.2 Características da *Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude

M. maripa é uma palmeira oleaginosa pertencente à família Arecaceae referida genericamente como inajá ou anajá entre outras sinonímias. Tem ampla distribuição na Amazônia Legal e em todo norte da América do Sul (Figura 5) apresenta-se, geralmente, com formações espontâneas de agrupamentos chamados inajazais (MIRANDA E RABELO, 2006; MATOS, 2010; BEZERRA, 2011).

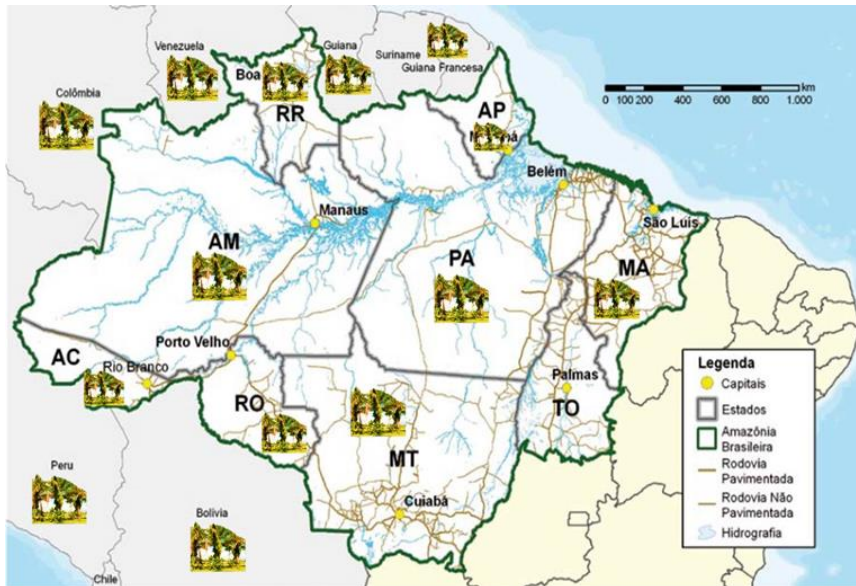


Figura 5- Distribuição de populações da palmeira inajá (Adaptado do Google).

Na região Amazônica, esta palmeira é frequente em florestas densas de zona úmida (SALM, 2004, 2005), em solos argilosos e arenosos (REVILLA, 2002), e em solos periodicamente inundados, com a observação de que seu desenvolvimento mostra-se mais vigoroso em solos bem drenados e em ambientes com boa iluminação (MIRANDA, 2008). É uma espécie rústica que pode atingir até 25 metros de comprimento, tem estipe (caule) liso na parte inferior e exibe folhas do tipo pinada que atingem até 10 m de comprimento (Figura 6A) (MIRANDA, 2008).

As inflorescências são cobertas por espatas (folhas modificadas) com estrutura lenhosa e persistente, podendo variar em interfoliar monóica ou predominantemente estaminada (que contém pólen) ou pistilada (que contém órgãos femininos) ou todas juntas na mesma planta (MIRANDA E RABELO, 2006). O eixo central do cacho é a ráquis e os ramos laterais são as ráquulas que sustentam as flores (Figura 6B). Seus frutos oblongos elipsóides estão divididos em duas partes: pericarpo e sementes (amêndoas), sendo o pericarpo formado pelo epicarpo, mesocarpo e endocarpo (Figura 7).



Figura 6- Palmeira oleaginosa *M. maripa* (A) e detalhes da inflorescência e cachos de inajá (B).
Fotos: Beto Kimura (2012).



Figura 7- Partes integrantes do fruto de inajá (*M. maripa*). Fonte: Matos (2010).

Em relação aos parâmetros físicos deste fruto, Shanley et al. (2010) mencionaram que uma palmeira pode produzir de 5 a 6 cachos por ano, apresentando de 800 a 1.000 frutos por cacho e, baseados nas condições apresentadas na Tabela 2, vários autores inferem que o inajazeiro pode originar de 68,8 Kg a 229,6 Kg de frutos por ano/planta, com uma média de 149,2 Kg de frutos/ano/planta.

Tabela 2- Caracterização física do fruto de inajá.

Parâmetros	Ferreira et al. 2006	Bezerra et al. 2006	Mota e França 2007	Rodrigues et al. 2009
Diâmetro (mm)	3,23	2,87	2,62 ± 0,17	3,30 ± 0,24
Comprimento (mm)	5,59	5,51	4,81 ± 0,46	5,68 ± 0,39
Peso do fruto (g)	38,27	26,61	17,20 ± 0,46	34,94 ± 7,61
Peso do mesocarpo (g)	7,77	7,95	4,71 ± 0,32	-
Peso do epicarpo (g)	13,29	7,11	4,58 ± 0,50	-
Peso do endocarpo (g)	17,20	11,63	7,92 ± 1,81	-
Rendimento polpa (%)	-	29,87	30,00	36,37 ± 3,44
Rendimento semente (%)	-	43,71	46,00	42,04 ± 1,09

Adaptado de Bezerra (2011).

Segundo Miranda et al. (2008), 1 Kg tem aproximadamente 65 frutos, 160 sementes e cada infrutescência pode produzir de 500 a 3.000 frutos. Segundo Shanley et al. (2010), a densidade de inajazeiros pode variar de 16 a mais de 100 indivíduos por hectare em florestas secundárias e áreas abertas, sendo os seres humanos e animais (cutia, anta, cateto, veados de rabo branco e mateiro, catinguelê, macaco-prego, arara-azul, entre outros) (DUARTE, 2008) os principais dispersores das suas sementes.

Uma habilidade inerente da palmeira inajá que confere sua sobrevivência em floresta secundária é a formação de um banco de sementes e plântulas de matrizes fornecedoras de sementes próximas a essa área. A incidência de luz e o fogo em áreas proporcionam a germinação deste banco de sementes, tornando-se fatores fundamentais no aparecimento de grandes densidades do inajá. Pode-se dizer, que nas áreas antropizadas as plantas jovens não morrem e sua atividade regenerativa é maior que em qualquer outra espécie, formando assim, população quase homogênea de inajá. Além da resistência as queimadas sucessivas, esta espécie também resiste ao *déficit* hídrico e a baixa fertilidade do solo (MIRANDA E RABELO, 2006).

O óleo da amêndoa é o produto principal desta palmeira que apresenta elevado rendimento, cerca de 60%, tem caráter saturado e sua composição química é semelhante às dos óleos de dendê, do babaçu e do coco (SERRUYA, 1979; CRAVO, 1989, 2000; BEZERRA, 2011). Em razão destas qualidades, este óleo foi referido como possível matéria prima para biodiesel (CORRÊA et al., 2005; BEZERRA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006; DUARTE, 2008; MOTA E FRANÇA, 2008).

2.2 Tecnologias para produção de biodiesel

Os ésteres alquílicos que compõem o biodiesel podem ser sintetizados via transesterificação, utilizando TAGs e álcoois, ou via esterificação, utilizando AGLs e álcoois. A reação de transesterificação ocorre em três etapas, onde são produzidos diacilgliceróis e monoacilgliceróis como intermediários de reação, e glicerol como subproduto, enquanto que a esterificação ocorre em uma única etapa com a formação de água como subproduto (Figura 8).

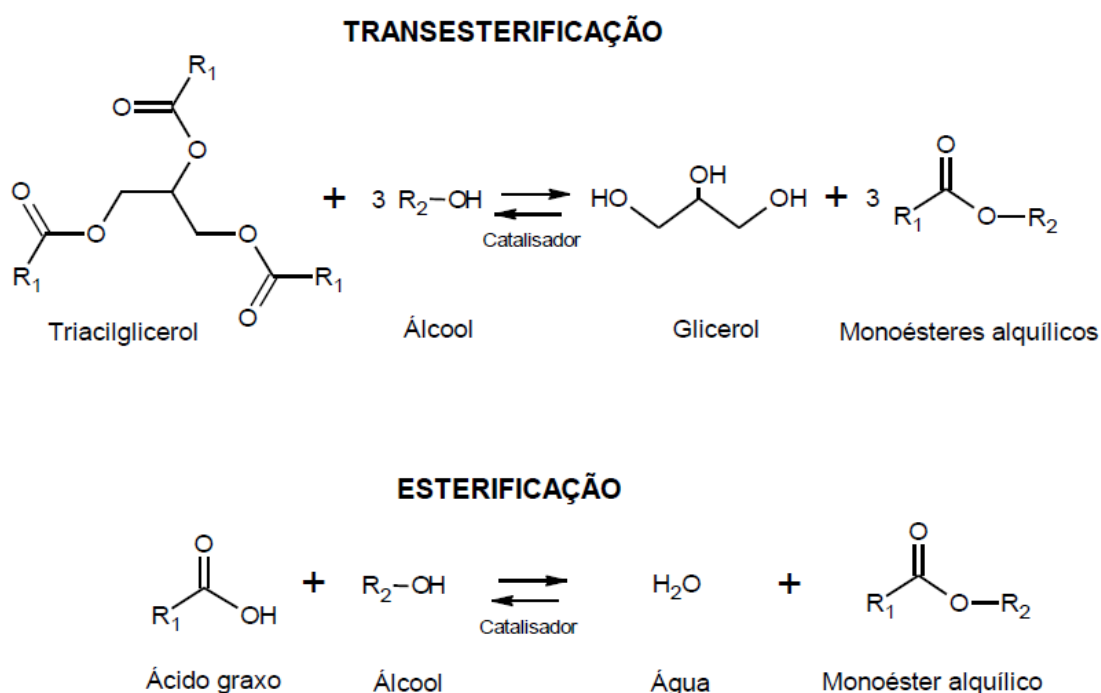


Figura 8- Reações de síntese do biodiesel. Fonte: Bastos (2013).

Como já comentado, a produção industrial de biodiesel é realizada principalmente por transesterificação alcalina, geralmente utilizando como catalisadores alcóxidos de metais alcalinos ou carbonatos de sódio e potássio. Por este processo são obtidos rendimentos acima de 95% em até 1 hora de reação utilizando razão molar de metanol:TAG de 6:1 (SOARES, 2014). Esta reação tem preferência em relação à esterificação direta de AGLs porque TAGs são mais comumente disponíveis do que AGLs. Por outro lado, o alto custo de óleos vegetais, em comparação ao óleo diesel, e a significância da agricultura para produção de alimentos, estimulam a busca por fontes de menor custo, como óleos vegetais não refinados, resíduos industriais, óleo de cozinha usado e gordura animal (ARANDA, 2003; ENCARNAÇÃO, 2008; SOUZA, 2010).

Desta forma, novas tecnologias de produção de biodiesel com diferentes matérias primas e catalisadores são necessária, uma vez que o processo de transesterificação alcalina é aplicável apenas para matérias primas neutras com baixa umidade. Recentemente, vem sendo estudado o processo de hidroesterificação que permite a utilização de insumos de baixo custo, como óleos vegetais brutos.

A hidroesterificação é um processo que envolve uma etapa de hidrólise do TAG seguida de esterificação dos AGLs (Figura 9). Este processo favorece a utilização de óleos de qualquer teor de AGLs, visto que na etapa de hidrólise os TAGs são misturados com água formando glicerol e AGLs e a presença de água nas matérias-primas não é deletéria para as lipases, enquanto que no processo alcalino, a água pode hidrolisar o óleo, formando sabão. Assim, é uma alternativa vantajosa ao processo convencional alcalino de produção de ésteres etílicos e metílicos (VYAS et al., 2010; CEBIN et al., 2012).

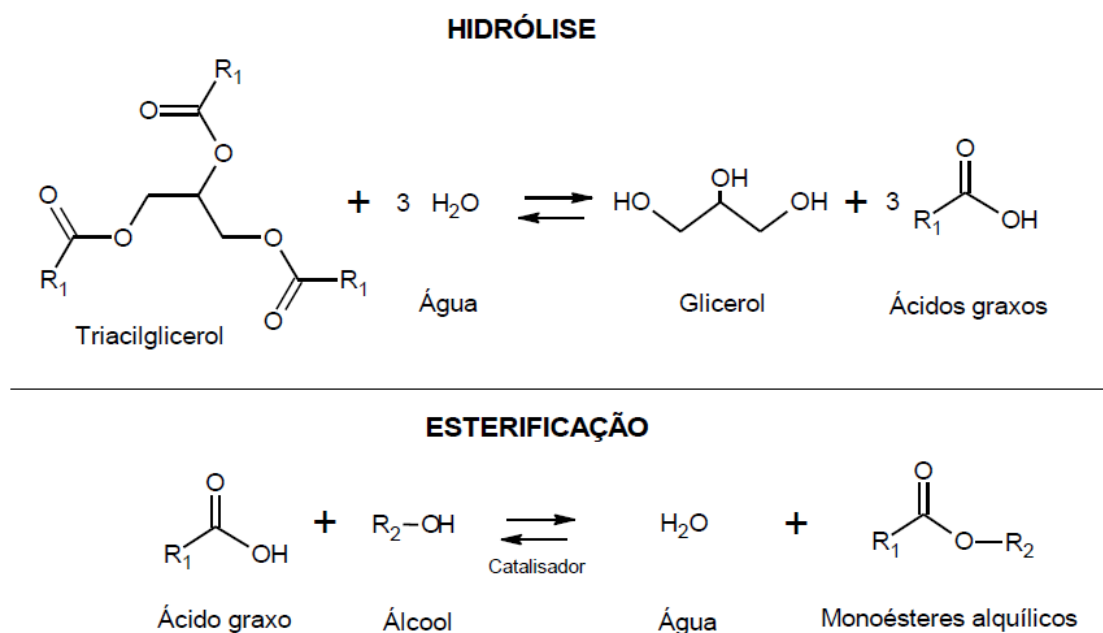


Figura 9- Processo de hidroesterificação

A hidrólise ocorre em três etapas consecutivas e reversíveis onde as moléculas de triacilglicerídeos (TAGs) são derivatizadas liberando AGLs que têm a capacidade de elevar a acidez (99%), o que justifica o desprendimento da condição ácida como um fator limitante da matéria prima. O glicerol obtido pode ser separado ainda nessa etapa

sem entrar em contato com o álcool, resultando num subproduto mais puro em relação ao obtido por transesterificação (USDA, 1995; NEVES, 2008; GOMES, 2009).

Esta reação é influenciada principalmente pelos fatores temperatura, teor de água no meio reacional e a concentração de glicerol liberado na fase aquosa (DIECKELMANN E HEINZ, 1988). Ao término, o glicerol é removido e os AGLs tornam-se reagentes na reação de esterificação. Nessa reação, ocorre a condensação entre um ácido carboxílico e um álcool formando éster alcoólico e água conforme mostrado na Figura 12 (BON et al., 2008; SUAREZ et al., 2009; SILVA, 2011; TEIXEIRA, 2011; TAPENAS et al., 2013).

Na reação de esterificação, cabe ao álcool neutralizar a acidez presente, sendo comumente utilizado um mol de álcool para cada mol de ácido graxo (TEIXEIRA, 2011). Por definição, o tipo de álcool utilizado determina o tipo de rota empregada, os álcoois metanol e etanol são os mais utilizados denominando os processos pela rota metílica e etílica respectivamente (ENCARNAÇÃO, 2007).

A opção pela rota metílica nos processos de produção de biodiesel é uma tendência em vários países da Europa e nos Estados Unidos, principalmente pelo custo módico do metanol e algumas conveniências físicas e químicas deste reagente (FUKUDA et al., 2001; LEÃO, 2009). Porém, este álcool tem toxicidade elevada e apresenta maiores riscos de incêndio (produz chama invisível) tornando-se proibitivo para uso em pequenas escalas de produção (RAMOS, 2009).

De acordo com a literatura, a opção pelos ésteres etílicos vem resultando em biodieseis com propriedades viáveis, o que amplifica os benefícios socioambientais como elementos indutores de um mercado mais ávido por soluções ambientalmente coerentes em toda a cadeia de produção (RAMOS, 2009). Além disso, o etanol também é um produto da agroindústria brasileira, com propriedades bem mais compatíveis com a proposta sustentável na produção de biodiesel em pequena ou média escala por ser menos tóxico, biodegradável, de origem renovável e, com uma produção consolidada e bem distribuída (REFERENCIA).

Outro aspecto que influencia o processo integralmente é o tipo de catalisador empregado, uma vez que este afeta diretamente a velocidade da reação sem afetar o equilíbrio, ao acelerar tanto a reação de hidrólise como a reação inversa (esterificação). A seleção do catalisador distingue o processo no seguimento da via química, quando utilizados catalisadores ácidos (ácidos sulfônicos aromáticos) e alcalinos (ZnO, MgO,

CaO) da via enzimática, a qual emprega especificamente enzimas lipases (CEBIN et al., 2012; COLLA et al., 2012).

2.2.1 Produção de ésteres de biodiesel por hidroesterificação utilizando lipases

Como relatado anteriormente, o processo de hidroesterificação é uma alternativa para o processo de transesterificação alcalina, principalmente para matérias graxas com teores de AGLs acima de 1% e de água acima de 0,5%. Este processo ainda é pouco conhecido para a produção de ésteres empregando lipases, tendo sido encontrados poucos trabalhos na literatura com estudos de produção de ésteres por este processo (Tabela 3).

Tabela 2- Estudos de produção de ésteres por hidroesterificação utilizando lipases

Referência	ADACHI et al., (2013)	DE SOUZA et al., (2010)	TALUKDER; WU;CHUA (2010)	CAVALCANTI -OLIVEIRA et al., (2010)	WATANABE et al., (2007)
Hidrólise	Enzimática	Enzimática	Enzimática	Enzimática	Enzimática
Catalisador	<i>Candida rugosa</i> (4,5% m/m _{óleo})	<i>Jatropha curcas</i> ¹ LSG (10% m/m _{óleo})	<i>Candida rugosa</i> (0,05% m/m _{óleo})	<i>Thermomices lanuginosus</i> (0,07% m/m _{óleo})	<i>Candida rugosa</i> (0,07% m/m _{óleo})
Temperatura pressão (1 atm) Reator	30 a 50 °C, frasco agitado (1 L, 150 rpm)	40 °C, frasco agitado (1,5 L, 450 rpm)	30 °C, frasco agitado (80 mL, 250 rpm)	60 °C, frasco agitado (1 L rpm)	30 °C, frasco agitado (500 rpm)
Reagentes	Água:óleo de soja ou palma (0,5:1 m/m)	Tampão Tris-HCl (0,1 M):óleo de pinhão manso (9:1 v/v)	Água: ² OGR (1:1 v/v)	Água:óleo de soja (1:1 v/v)	Água: ³ óleo ácido (1:1 v/v)
Conversão, tempo	Não informado, 24 horas	98%, 2 horas	100%, 10 horas	89%, 48 horas	92%, 24 horas
Esterificação	Enzimática	Química	Química	Química	Enzimática
Catalisador	<i>Aspergillus oryzae</i> recombinante	Ácido nióico 20% m/m	Amberlyst 15, 100% m/m	Ácido nióico 20% m/m	⁴ <i>Candida antarctica</i> 1,5% m/m
Temperatura pressão (1 atm) Reator	30 °C, 1 atm, frasco agitado (150 rpm)	200 °C, 34 atm, reator agitado de alta pressão (500 rpm)	60 °C, frasco agitado (80 mL, 250 rpm)	200 °C, 24 atm, reator agitado de alta pressão (500 rpm)	30 °C, 1 atm, frasco agitado (2 L; 120 rpm)
Reagentes	Metanol:AG (1,5:1)	Metanol:AG (3:1)	Metanol:AG (4:1) em isso-octano	Metanol:AG (3:1)	Metanol:AG (5:1)
Conversão, tempo	90 a 93%, 10 horas	97%, 2 horas	99%, 2 horas	92%, 1 hora	96%, 24 horas

¹LSG: Lipases de sementes germinadas; ²OGR: óleo de gordura residual de fritura; ³óleo ácido proveniente de refino de oleaginosas (ao autores não informaram quais oleaginosas); ⁴Lipase comercial de *Candida antarctica* Novozyme 435®.

Na maioria dos estudos foram utilizadas lipases comerciais. A lipase de *Candida rugosa* (Meito Sangyo Co. Ltd., Osaka, Japão) foi utilizada em três estudos na etapa de hidrólise, devido à sua alta atividade hidrolítica (360 U mg^{-1}) (ADACHI et al., 2013; TALUKDER; WU; CHUA, 2010; WATANABE et al., 2007). Foram obtidos com esta lipase 92% (24 h) de conversão na hidrólise de um óleo ácido (proveniente do refino de oleaginosas) e 100% (10 h) na hidrólise de um óleo de gordura residual de fritura a 30°C , em meio reacional contendo 0,06 e 0,05% da enzima liofilizada (m/m_{óleo}), respectivamente (TALUKDER; WU; CHUA, 2010; WATANABE et al., 2007). Em outro estudo, foi utilizada uma lipase de *Thermomices lanuginosus* (Lipozyme, Novozyme) com atividade hidrolítica de 1.064 U mL^{-1} , obtendo-se 89% de conversão em 48 h, a 60°C , em meio reacional contendo 2,3% da preparação da lipase líquida (m/m_{óleo}) (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010).

Em apenas um estudo foi utilizada uma lipase não comercial na etapa de hidrólise, proveniente de sementes germinadas de *Jatropha curcas* (pinhão manso) (DE SOUSA et al., 2010). Neste estudo, foram obtidos 98% de conversão em apenas 2 h na hidrólise do óleo. No entanto, foi utilizada nesta etapa uma razão de água/óleo de 9:1 (V/V), equivalente a um excesso de água de 9 a 18 vezes maior quando comparado com os outros trabalhos, que utilizaram razão de água/óleo de 0,5:1 (m/m) até 1:1 (V/V) (Tabela 3) (ADACHI et al., 2013; TALUKDER; WU; CHUA, 2010; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010; WATANABE et al., 2007).

Na etapa de esterificação, foram obtidas elevadas conversões (92 a 97%) em um tempo curto de reação (1 a 2 h) com o catalisador químico heterogêneo ácido nióbio; no entanto, as reações foram realizadas em reatores agitados (500 rpm) com alta pressão (24 a 34 atm) e temperatura (200°C) (DE SOUSA et al., 2010; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010). Talukder, Wu e Chua (2010) obtiveram 99% de conversão em 2 h em temperatura branda (60°C) na esterificação química catalisada por uma resina de troca iônica ácida (Amberlyst 15), mas utilizaram co-solvente (iso-octano) na reação. Os autores justificaram o uso de um catalisador químico na etapa de esterificação devido à inativação de lipases pelo metanol; no entanto, vários estudos mostram a possibilidade da adição de metanol ou etanol em etapas para minimizar o efeito inibitório (TAN et al., 2010; MADALOZZO, 2010; HAMA et al., 2007), enquanto outros adicionam o álcool em uma única etapa sem problemas de inibição (ADACHI et al., 2013; WATANABE et al., 2007). Por exemplo, Adachi et al. (2013) utilizaram na etapa de esterificação a lipase recombinante de *Aspergillus oryzae* imobilizada em

espuma de poliuretano em meio reacional com adição do metanol (razão molar 1,5:1) em uma única etapa e obtiveram 90 a 93% de conversão em 10 h. Watanabe et al. (2007) também adicionaram na reação de esterificação catalisada pela lipase *C. antarctica* comercial (Novozyme 435®) o metanol em uma única etapa (razão molar 5:1) e obtiveram 96% de conversão em 24 h. Todas as reações de esterificação supracitadas foram feitas em regime de batelada, em frascos ou reatores com agitação. De maneira geral, altas conversões (90 a 96%) foram obtidas nas reações de esterificação enzimática, mas em temperaturas menores (30°C) e com maior tempo de reação (10 a 24 h), comparadas com as reações catalisadas quimicamente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi selecionar isolado bacteriano potencialmente produtor de lipase que apresenta afinidade ao óleo da amêndoa do inajá (*Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude) para aplicação como biocatalisador em reações de hidrólise e de esterificação com vista a produção de biodiesel.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever as técnicas usadas para obtenção da matéria prima, extração do óleo da amêndoa de inajá e analisar as características química, físico-químicas e cromatográficas do óleo;
- Selecionar os isolados bacterianos potencialmente produtores de lipase extracelular ativa com óleo de inajá;
- Avaliar a capacidade de hidrólise e de esterificação da preparação lipásica do isolado reconhecido como mais promissor sobre o óleo de inajá;
- Identificar os principais parâmetros que influenciam o rendimento da reação de hidrólise enzimática do óleo de inajá;
- Identificar os principais parâmetros que influenciam o rendimento da reação de esterificação enzimática sobre o principal ácido graxo constituinte do óleo de inajá;
- Caracterizar o isolado bacteriano mais promissor quanto aos aspectos morfofisiológicos e bioquímicos;
- Identificar o isolado bacteriano mais promissor utilizando métodos moleculares (sequenciamento da região 16S).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologias do DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) e no Laboratório de Pesquisa e Ensaio de Combustíveis (LAPEC), ambos na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.1 Obtenção da matéria prima

Os frutos maduros de inajá foram coletados no período de março e junho (2012) procedentes de uma área de inajazal em fase reprodutiva à margem do paraná do Caburi (s 02° 18.771'; w 057° 04.498'), situada na fazenda Santa Maria, propriedade do Sr. Beto Kimura localizada na Comunidade da Bolívia no município de Parintins – AM (Figura 10).



Figura 10- A e B: área de inajazal em Parintins – AM. C e D: coleta da matéria prima. Fotos: Beto Kimura (2012).

4.1.1 Beneficiamento dos frutos

Após a coleta, os cachos foram acondicionados em sacos e transportados para Manaus. Nas Figuras 11 e 12 estão ilustradas, respectivamente, as atividades de beneficiamento dos frutos e o processo de obtenção do óleo bruto das amêndoas. Inicialmente, fez-se o desmanche manual dos cachos com tesouras e facas, contagem dos frutos maduros aproveitados e pesagem em balança digital. Em seguida, esses frutos foram distribuídos em bandejas e mantidos em estufa de circulação forçada de ar (65 °C, durante 72 horas) para pré-secagem.



Figura 11- Etapas do beneficiamento dos frutos de inajá (*M. maripa*).

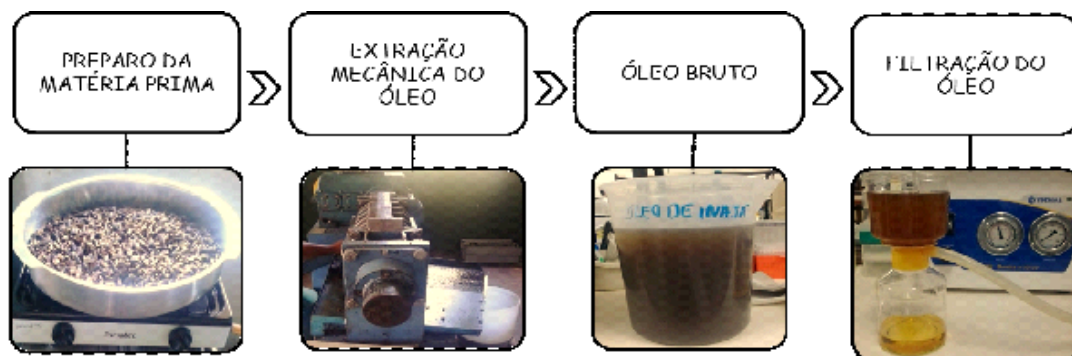


Figura 12- Etapas para extração e filtração do óleo das amêndoas do inajá.

O descascamento, despolpamento e a retirada das sementes (endocarpo e amêndoa) também foram realizados manualmente. Por se tratar de sementes altamente resistentes, foi necessário mantê-las na estufa a 65 °C, por mais 48 horas, uma vez que se verificou facilitar a extração das amêndoas com auxílio de marreta e faca. As amêndoas foram armazenadas em potes plásticos antibacterianos, a 5 °C.

A extração do óleo foi realizada em mini prensa contínua MPE-100 AC (Ecirtec) com capacidade de até 100 Kg/h. O óleo não foi submetido a qualquer processo de refino sendo apenas filtrado utilizando um sistema de filtração 500 mL com poros de

0,22 µm (Corning) para retirar impurezas e armazenado em frascos âmbar a temperatura ambiente. Para calcular o rendimento em óleo fez-se a relação entre a quantidade do óleo extraído em litros pela quantidade de sementes disposta na extratora em quilogramas. O óleo da amêndoa de inajá filtrado foi submetido a análises para determinar índice de acidez (IA), índice de saponificação (IS), Índice de peróxido (IP), densidade, viscosidade e constituição de ácidos graxos, adotando os métodos das Normas Analíticas Adolfo Lutz de caracterização de óleos e gorduras (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

4.2 Caracterizações físico-químicas do óleo de inajá

4.2.1 Índice de acidez

O índice de acidez corresponde a quantidade de hidróxido de potássio (mg) necessária para neutralizar os ácidos graxos livres um grama de gordura (em mg KOH/g).

Foram pesados 2,0 g da amostra e adicionou-se 25 mL de solução éter-álcool 2:1 neutra. Em seguida, adicionaram-se duas gotas de indicador fenolftaleína e titulou-se com agitação constante utilizando solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M), até a mudança permanente de cor. A Equação 1 foi utilizada para obtenção do valor referente ao índice de acidez (IA) cujo resultado é obtido em mg de KOH/g de óleo.

$$IA = (5,61x v x f) / P \quad (1)$$

onde *v* é o volume do titulante (NaOH 0,1 M), *f* é o fator de correção da concentração da solução de NaOH e *P* é o peso da amostra em g.

4.2.3 Índice de saponificação

O índice de saponificação é definido como a quantidade de hidróxido de potássio (mg) que é necessário para saponificar 1 g de gordura ou ácidos graxos técnicos, determinando a quantidade de ácidos graxos totais presentes na amostra.

Para determinar este índice, pesou-se cerca de 2,0 g da amostra e adicionou-se 25 mL de hidróxido de potássio (KOH). Em seguida o erlenmeyer contendo amostra e solução foi conectado ao condensador de refluxo e aquecido até ebulição branda por 60

minutos. Logo após, adicionou-se 3 gotas de indicador fenolftaleína e titulou-se a quente com ácido clorídrico 0,5 M até a mudança de cor. Fez-se um branco nas mesmas condições, sem a amostra de análise. O cálculo para índice de saponificação (IS) foi realizado de acordo com a Equação 2.

$$IS = 28 \times f \times (B - A) / P \quad (2)$$

em que A é o volume gasto na titulação da amostra; B é o volume gasto na titulação do branco; f - fator da solução de HCl 0,5 M e P - peso da amostra em g.

4.2.4 Índice de peróxido

Este método determina todas as substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra, que oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste.

Para determinação deste índice, pesou-se 1 g da amostra e adicionou-se 30 mL de solução de ácido acético-clorofórmio 3:2, agitando-se para homogeneização da amostra. Em seguida, fez-se adição de 0,5 mL de uma solução saturada de iodeto de potássio (KI) que ficou em repouso por um minuto ao abrigo de luz. Acrescentou-se mais 30 mL de água para titulação com solução de tiosulfato de sódio (0,1 N) em agitação constante até a mudança de cor. Com a adição de 0,5 mL de solução de amido indicadora a titulação foi sucedida até o desaparecimento da cor azul. Também foi preparada uma prova em branco nas mesmas condições e titulada. O cálculo para índice de peróxido (IP) foi realizado pela seguinte Equação 3:

$$IP = (A - B) \times N \times f \times 1000 / P \quad (3)$$

onde A é o volume (mL) da solução de tiosulfato de sódio 0,1 gasto na titulação da amostra; B - volume (mL) da solução de tiosulfato de sódio 0,1 gasto na titulação do branco; N - normalidade da solução de tiosulfato de sódio; f - fator da solução de tiosulfato de sódio e P - g da amostra.

4.2.5 Densidade

A densidade foi medida por meio de um picnômetro de 1 mL e balança analítica.

4.2.6 Viscosidade

A viscosidade foi medida utilizando-se um viscosímetro SCHOTT – GERATE GmbH AVS – 350 D 65719 Hofheim a. ts, em banho termostático a 40 °C e um capilar de constante $k = 0,03218$. O tempo de escoamento do óleo pelo viscosímetro foi medido e a viscosidade foi determinada pela Equação 4:

$$V = k \times t \quad (4)$$

onde k é a constante inerente às dimensões do capilar utilizado e t o tempo de escoamento pelo capilar, em segundos.

4.2.7 Derivatização do óleo da amêndoa de inajá

Em tubos de ensaios foram pesados 50 mg da amostra. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de hidróxido de potássio metanólico (0,5 N). Agitou-se para solubilizar, sendo incubadas em banho-maria por 10 minutos a 60° C.

Em seguida, foram adicionados 4 mL de trifluoreto de boro metanólico (BF₃/MeOH), permanecendo em banho-maria por mais dois minutos. Foram adicionados 2 mL de hexano e agitou-se vigorosamente por um minuto.

Foram adicionados 5 mL de solução aquosa saturada de cloreto de sódio e agitou-se por 15 segundos, as tampas foram abertas para separação das fases. Completou-se o volume do tubo com a mesma solução e agitou-se novamente. Após a separação das fases, a fase hexônica foi removida e transferida por uma coluna de sulfato de sódio anidro para remoção da água. Acrescentou-se mais uma etapa de purificação, na qual a fase hexônica foi passada por uma coluna de alumina (ácido de alumínio), adicionando-se 5 mL de hexano para eluição dos ésteres metílicos de ácidos graxos. Os demais constituintes que não reagiram no processo ou alguns intermediários da reação ficaram retidos na coluna de alumina.

A conversão da reação de derivatização foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo o sistema eluente constituído por: hexano 80 (éter etílico 16: ácido acético 4) e ácido fosfomoblídico. Após estes tratamentos, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa de alta resolução na concentração de um mg/mL.

4.3 Produção de lipase bacteriana extracelular

Os parâmetros utilizados nesta primeira etapa de experimento, foram selecionados com base na literatura pesquisada sobre produção de lipase por bactérias em fermentação submersa (SENE et al., 2002; WILLERDING et al., 2011; 2012) visando determinar condições de processo que pudessem melhorar os níveis de atividade de enzima a ser aplicada nas reações de hidrólise e esterificação.

4.3.1 Fonte de lipase

O estudo utilizou como material de partida 44 isolados bacterianos provenientes da Coleção de Micro-organismos do Solo do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) e da Coleção de Micro-organismos do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Esses micro-organismos foram obtidos a partir de coletas de solos e de raízes em ambiente agrícola e florestal (terra-firme, várzea e clareiras) em diversas regiões do Amazonas como Barreirinha, Rio Preto da Eva, Urucu e Manaus e foram previamente selecionados pela habilidade de produzir lipases utilizando como substratos os óleos de babaçu, buriti e maracujá (WILLERDING et al., 2011; 2012).

4.3.2 Seleção primária dos isolados bacterianos produtores de lipase

Inicialmente, os isolados foram repicados para a reativação do crescimento em meio sólido basal composto por glicose (1,0%), extrato de levedura (0,2%), KH_2PO_4 (0,5%), MgSO_4 (0,2%), CaCl_2 (0,1%), ágar (1,8%), pH 6,5 e incubados a 30 °C por 24 horas. As culturas ativadas foram mantidas a 4 °C com repiques semanais.

4.3.3 Detecção da atividade lipásica em placa de Petri (análise qualitativa)

A primeira etapa de seleção dos isolados que cresceram foi baseada em bioensaios qualitativos SENE et al., 2002 em meio de cultura sólido indutor de lipase calibrado em pH 8,0 composto por óleo da amêndoa de inajá (2% v/v) utilizado como substrato para a enzima, *Tween* 20 (1% v/v), peptona (0,3% m/v), extrato de levedura (0,2% m/v), KH_2PO_4 (0,2% m/v), MgSO_4 (0,1% m/v), CaCl_2 (0,1% m/v), ágar (1,8% m/v) e corante Rodamina B (0,001% m/v).

Cinco replicatas de cada isolado foram consideradas por placa, permanecendo a 30 °C por 72 horas. Com o auxílio de régua milimétrica mediu-se os raios das colônias e os raios dos respectivos halos lipolíticos. Nessa metodologia, o princípio envolvido é o da formação de halos translúcidos ao redor das colônias produtoras de enzimas

hidrolíticas cuja detecção é revelada com exposição sob luz negra compacta (Empalux, modelo FL12531, 25w) (JAEGER E KOUKER, 1987; SAXENA et al., 2003).

A avaliação da atividade enzimática foi baseada no Índice de Atividade da Lipase (IAL) obtido da relação entre o diâmetro médio (ϕ) do halo lipolítico (de degradação ao redor da colônia) e o diâmetro médio da colônia [IAL= ϕ halo (cm)/ ϕ colônia (cm)] (SILVA FILHO e VIDOR, 2000; OLIVEIRA et al., 2006). Os isolados que apresentaram como resultado valor igual ou maior que 2,0 foram considerados promissores e, portanto, passaram para os testes quantitativos com p-nitrofenil laurato.

4.3.4 Manutenção dos micro-organismos

Os isolados que apresentaram melhor atividade lipolítica no meio contendo óleo da amêndoa de inajá e rodamina B foram selecionados para dosagem de proteínas totais, eletroforese SDS-PAGE, determinação de biomassa e atividade lipásica. A manutenção dos mesmos foi realizada com repiques mensais em meio de cultura sólido basal a 30 °C por 24 horas. E a partir de inóculos em meio líquido basal foram preparadas alíquotas de 1 mL de cultura adicionado com 1 mL de glicerol 50 % (v/v) previamente esterilizado em autoclave. Os isolados cultivados em placas foram conservados a 4 °C e os adicionados de glicerol (50% v/v) foram armazenados a -80 °C.

4.3.5 Preparação de lipase via fermentação submersa

Para preparo dos inóculos, os isolados selecionados foram cultivados a 30 °C em 5 mL de meio líquido basal (*item 4.3.2*) por 48 horas a 180 rpm. Em seguida, foi transferido 1 mL do pré-inóculo para 49 mL de meio líquido indutor em frascos Erlenmeyers de 250 mL que permaneceram incubados por até 72 horas a 30 °C e 180 rpm. Após, os conteúdos dos frascos foram centrifugados (12000 rpm) por 15 minutos para obtenção da preparação enzimática do extrato bruto, livre de células, a ser analisada quanto a atividade lipásica.

Foram realizadas três repetições para os pré-inóculos de cada isolado bacteriano selecionado, e cada repetição foi inoculada em triplicatas.

4.4 Dosagem de proteína

O teor de proteína das preparações enzimáticas brutas foi realizado pelo método de Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo 100 mg de azul brilhante de Coomassie BG-250 em 50 mL de etanol (95%). Em seguida, adicionou-se

100 mL de ácido fosfórico (85%) e a solução final foi diluída com água deionizada para 1 litro. O reagente foi filtrado em papel filtro qualitativo. A curva padrão para o reagente foi construída utilizando albumina de soro bovino diluída em 0,15 M de NaCl com concentrações variando entre 0,1-1,0 g/L.

A reação foi realizada adicionando 5 mL de reagente e 100 µL de solução de proteína diluída em NaCl (0,15 M), os tubos de reação foram agitados por 2 minutos. Durante a reação, a interação entre a proteína e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm. A leitura foi realizada no espectrofotômetro marca Shimadzu modelo UVmini 240.

4.5 Determinação da biomassa (massa celular seca)

Para este fim foi utilizado o precipitado de cada cultura, proveniente da centrifugação a 12000 rpm por 30 minutos. A massa celular foi transferida para placa de Petri e pesada, após secagem em estufa a 105 °C por 24 horas.

4.6 Determinação do tamanho molecular da enzima

O tamanho molecular da enzima foi estimado por eletroforese SDS-PAGE (gel de eletroforese composto por poliacrilamida dodecil sulfato de sódio), utilizando o método descrito por Laemmli (1970). O gel utilizado tinha concentração de 12% em poliacrilamida. Antes da aplicação no gel as amostras foram fervidas durante 5 minutos para desnaturação das proteínas. A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1X em um sistema de eletroforese da BioRad com uma voltagem constante de 100 V.

4.7 Determinação da atividade da preparação lipásica bruta

4.7.1 Método da hidrólise do p-NPL em meio aquoso

O método espectrofotométrico utilizado para determinar atividade lipásica durante a fermentação foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme George et al. (2003) e Pastore et al. (2003). Baseia-se na hidrólise do substrato sintético laurato de p-nitrofenila (p-NPL, Sigma) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactante o Triton X-100 (Sigma). A liberação do p-nitrofenol (p-NP) promove a coloração amarela na solução que pode ser seguida a 405 nm.

Para isso, uma solução de p-NPL (2,5 mmol) foi preparada contendo 0,160g do substrato em 200 mL de solução tampão de acetato de sódio (50 mM; pH 8,0)

adicionado com 2,1% de Triton X-100 com a homogeneização a 70 °C. Para a reação, uma alíquota de 190 µL dessa solução foi adicionada com 10 µL da preparação enzimática do extrato bruto de cada isolado selecionado ou de tampão quando se preparou o branco. A reação foi feita em placa (96 poços), cada amostra dispôs de 9 repetições sendo incubadas a 37 °C por 10 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada com choque térmico a 0 °C por cinco minutos. O pH 8,0 e a temperatura a 37 °C das reações foram mantidos constantes pois de acordo com a literatura a enzima apresenta boa atividade nessas condições (Castro et al., 2004; Willerding et al., 2011; 2012).

A leitura da absorbância (405 nm) foi realizada no espectrofotômetro Hidex Chameleon-Eppendorf e comparada com a reta-padrão do *p*-NP a fim de quantificar a produção de lipase pelos isolados. Uma unidade de atividade de lipase (U) foi determinada como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de *p*-NP. mL⁻¹ sob as condições de ensaio.

4.7.2 Método titulométrico

A dosagem da atividade lipásica por titulometria foi usada para complementar o método da hidrólise de *p*-NPL, pois utiliza substratos naturais (triacilglicerídeos) para lipase. O método empregado foi o proposto por Watanabe et al. (1977), com modificações, que se baseia na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir de triacilglicerídeos. A análise foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL utilizando 2 mL da preparação lipásica, 5 mL de emulsão composta pelo óleo de inajá (25%v/v) em solução de goma arábica (3%p/v) e 5 mL de tampão Tris-HCl (1M; com variação de pH 6,0; 6,5; 7,0;7,5). As reações foram incubadas durante 30 minutos, em banho-maria a 37°C, com agitação de 200 rpm. A reação foi finalizada pela adição de 10 mL de acetona/etanol (1:1). Em paralelo, empregou-se no branco a enzima inativada, sendo esta uma preparação bruta de lipase previamente submetida ao banho-maria fervente por 10 minutos.

Os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triacilglicerídeos presentes na emulsão foram quantificados pela titulação com solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,02M, utilizando timolftaleína 0,04% como indicador. O volume de solução de NaOH gasto em cada titulação foi anotado. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em 1U/mL=1 µmoles/mL.min e calculadas segundo a Equação 5 (COLEN, 2006).

$$\text{Atividade lipásica (U/mL)} = \frac{(V_{enzimático} - V_{controle}) \times fc \times D \times 20}{t} \quad (5)$$

em que V_{enzima} é o volume de solução de NaOH 0,05M gasto para titular os ácidos graxos da reação enzimática; $V_{controle}$ é o volume de solução de NaOH 0,05M gasto para titular os ácidos graxos presentes no branco da amostra; fc o fator de correção da solução titulante de NaOH 0,02M padronizada; D é o fator diluição; t é o tempo de reação, em minutos (10 minutos) e 20 é o fator aplicado para expressar o resultado em micromoles de ácido graxo por mL de amostra e representa o número de micromoles de NaOH por mL de solução 0,02M.

4.8 Reação de hidrólise enzimática do óleo de inajá

4.8.1 Planejamento experimental

A necessidade crescente de otimização ou melhoramento dos processos biotecnológicos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, tem levado a busca por técnicas de planejamento de experimentos. Neste contexto, as reações foram conduzidas de acordo com um planejamento fatorial completo constituído de matriz 2^4 com três pontos centrais com o objetivo de melhorar o entendimento da influência individual das variáveis temperatura, tempo, pH e concentração da enzima e de suas interações na reação de hidrólise enzimática do óleo da amêndoa de inajá.

A lipase LIPB-17 foi selecionada para ser aplicada nas reações de hidrólises conforme avaliações supracitadas (*itens 4.7.1 e 4.7.2*). Os valores codificados e não codificados correspondentes são mostrados na Tabel 3. O modelo do experimento utilizado para estabelecer as condições ótimas da atividade da lipase consistiu em 19 ensaios sendo 16 combinações únicas e três replicações no ponto central (33 °C; 24 horas; pH 7,0 e 5% de enzima), conforme a Tabela 4.

Tabela 3- Variáveis e níveis para o planejamento fatorial completo com três níveis e quatro variáveis para ensaios de hidrólise do óleo de inajá com enzima do isolado LIP 17.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura °C	28	33	45
Tempo (horas)	12	24	48
pH	6,0	7,0	8,0
Conc. Enzima (%)	2,5	5,0	7,5

Tabela 4- Matriz do planejamento fatorial completo 2⁴ com valores reais e respectivos valores codificados para as variáveis temperatura, tempo (horas), pH e concentração de enzima lipase.

Ensaios	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	pH	Enzima (%)
1	45 (+1)	12 (-1)	8 (+1)	2,5 (-1)
2	45 (+1)	48 (+1)	8 (+1)	2,5 (-1)
3	28 (-1)	48 (+1)	6 (-1)	7,5 (+1)
4	45 (+1)	48 (+1)	8 (+1)	7,5 (+1)
5	45 (+1)	48 (+1)	6 (-1)	7,5 (+1)
6	28 (-1)	48 (+1)	8 (+1)	2,5 (-1)
7	28 (-1)	12 (-1)	6 (-1)	2,5 (-1)
8	45 (+1)	12 (-1)	6 (-1)	2,5 (-1)
9*	33 (0)	24 (0)	7 (0)	5,0 (0)
10	45 (+1)	12 (-1)	8 (+1)	7,5 (+1)
11*	33 (0)	24 (0)	7 (0)	5,0 (0)
12	28 (-1)	12 (-1)	6 (-1)	7,5 (+1)
13	28 (-1)	12 (-1)	8 (+1)	7,5 (+1)
14	28 (-1)	48 (+1)	8 (+1)	7,5 (+1)
15	28 (-1)	48 (+1)	6 (-1)	2,5 (-1)
16	45 (+1)	48 (+1)	6 (-1)	2,5 (-1)
17	45 (+1)	12 (-1)	6 (-1)	7,5 (+1)
18*	33 (0)	24 (0)	7 (0)	5,0 (0)
19	28 (-1)	12 (-1)	8(+1)	2,5 (-1)

* Pontos centrais

As reações de hidrólise foram conduzidas em Erlenmeyers de 150 mL com 5 mL da emulsão contendo 25 g de óleo da amêndoa de inajá e 75 g de goma arábica 3% (m/v) e 5 mL de tampão Tris-HCl. À mistura foram adicionados 2,5%, 5% ou 7,5% da preparação bruta lipásica (50 mg/mL) em relação a massa do óleo da amêndoa de inajá,

em diferentes pHs (6,0; 7,0 e 8,0), temperaturas (28 °C; 33 °C e 45 °C) e tempos de reação (12, 24 e 48 horas). Como variável resposta, foi utilizado o rendimento da reação calculado e expresso como porcentagem de hidrólise, definida pela relação entre a concentração de ácidos graxos livres presentes na amostra e a concentração máxima teórica, determinada de acordo com a Equação 6 (ROONEY & WEATHERLEY, 2001).

$$\text{Hidrólise (\%)} = \frac{V \times 10^{-3} \times M \times MM}{m \times f} \times 100 \quad (6)$$

na qual V é o volume de solução de NaOH gastos na titulação; M é a concentração molar da solução de NaOH (50 mM); MM é a massa molecular média do óleo da amêndoa de inajá (692,27 g/mol); m é a massa da amostra (g) e f é a fração do óleo usada.

Os resultados obtidos foram analisados empregando o programa de estatística computacional Minitab 16®. O efeito de cada fator e de suas interações foi obtido com ANOVA.

4.9 Reação de esterificação enzimática em sistema livre de co-solvente (SLS)

4.9.1 Secagem e delipidação da preparação enzimática

O isolado bacteriano LIPB-17 selecionado como potencial produtor de lipase hidrolítica em sistema de fermentação submersa também foi testado quanto sua atividade de esterificação. Para isso, a preparação enzimática de LIPB-17 (item 4.3.5) foi liofilizada por 24 h a 0,1 mbar e -45 °C em um liofilizador Jouan LP3.

A preparação enzimática liofilizada foi delipidada a fim de remover os lipídios derivados da fermentação e, assim, evitar interferências nas reações de esterificação. No procedimento, fez-se a adição de uma mistura de clorofórmio e butanol (9:1) às preparações enzimáticas. A mistura foi agitada por 10 min, 200 rpm a 25°C e o solvente da amostra foi evaporado em rotavapor para a separação do biocatalisador. A amostra foi analisada por cromatografia em camada delgada sendo essa etapa repetida até que não fossem mais detectados lipídios na placa de CCD.

As preparações lipásicas liofilizadas e delipidadas foram eluídas em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 e armazenadas a 4 °C até sua utilização direta nas reações de esterificação.

4.9.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Este método foi realizado com as soluções obtidas da delipidação das preparações lipásicas a fim de verificar a presença de lipídeos remanescentes no material após delipidação. Utilizou-se placas de sílica em gel (MERCK), a fase móvel foi *n*-hexano: éter etílico: ácido acético (70:29:1) e a placa foi revelada com iodo. Trioleína e ácido láurico (Sigma-Aldrich) foram utilizados como padrões.

4.9.3 Determinação da atividade de esterificação da lipase LIPB-17

A atividade de esterificação da lipase LIPB-17, liofilizada e delipidada, foi quantificada pelo consumo do ácido láurico (> = 98% SIGMA-ALDRICH) na reação entre este e etanol (99,8% Cromoline), com razão molar ácido láurico:álcool (RM) de 1:6 e 1:9, concentração de enzima [E] em 5% (p/p) e temperatura (T) 37 °C. A reação foi realizada em erlenmeyers de 125 mL selados, em triplicatas e com agitação 200 rpm por 40 minutos de reação. Alíquotas de 1 mL foram retiradas do meio reacional no tempo zero (sem enzima) e ao término da reação. Em seguida, foram diluídas em 20 mL de acetona:etanol (1:1 v/v) com a finalidade de cessar a reação.

A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH (0,02M) (COSTA 2009; PIEROZAN, et al, 2009). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 μmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas (FEIHRMANN, 2005). A atividade de esterificação foi calculada conforme Equação 7.

$$A (U/g) = \frac{(V_0 - V_{40}) \times N \times 1000 \times V_f}{t \times m \times V_e} \quad (7)$$

onde, N é a normalidade da solução de NaOH; V₀ é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL); V₄₀ é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos de reação (mL); m é a massa de amostra utilizada na reação (g); t é o tempo de reação em minutos; V_f é o volume final (mL) e V_e é o volume da alíquota (mL).

4.9.4 Síntese de ésteres por esterificação utilizando LIPB-17

Diante da confirmação da atividade de esterificação da preparação LIPB-17, foram realizados ensaios complementares livres de co-solvente. O meio reacional consistiu de 2 g de ácido láurico (equivalentes a 10 mmol, considerando massa molar de 200,31), 0,2 mL de LIPB-17 (500 mg/mL), liofilizada e delipidada, correspondentes a 10% da massa de ácido láurico, e etanol em diferentes concentrações: 1,4 g; 2,8 g e 4,14 g, para ensaios com razão molar (RM) ácido láurico:etanol de 1:3; 1:6 e 1:9, respectivamente. Em paralelo, foi testada uma lipase comercial de *Burkholderia cepacia* (SIGMA-ALDRICH) (0,5 mg/mL; 25U/mL) nas mesmas condições reacionais.

As reações foram realizadas em erlenmeyers de 50 mL selados e mantidos em agitador orbital a 200 rpm e 37 °C. Em intervalos fixos de 0, 2, 4, 6, 24, 48 e 72 horas amostras de 1 mL do meio reacional foram coletadas e analisadas pelo método titulométrico. O volume foi anotado, o teor de AGLs ($Teor_{AGL}$) e o índice de acidez (IA) foram calculados pelas Equações 8 e 9, respectivamente.

$$Teor_{AGL} (\%) = \frac{V \times [NaOH] \times f \times MM_{AGL} \times 100}{m \times 1000} \quad (8)$$

$$IA (mgKOH/g) = \frac{V \times [NaOH] \times f \times MM_{KOH}}{m} \quad (9)$$

onde, $Teor_{AGL}$ é o teor de ácidos graxos livres em percentual na amostra; IA é o índice de acidez expresso em mg de KOH necessários para neutralizar um grama de amostra; V é o volume da solução de hidróxido de sódio consumido na titulação em mL; [NaOH] é a concentração da solução de NaOH em mol L⁻¹; f é o fator de correção da solução de NaOH padronizada (adimensional); m é a massa da amostra em g; MM_{KOH} é a massa molar de KOH (56,11 g mol⁻¹); 1000 é o fator de conversão de g para mg; e MM_{AGL} é a massa molar de AGL. Por exemplo, para o ácido láurico foi utilizado o valor de 200,31 g mol⁻¹ que corresponde à massa molar média dos AGLs que compõem a amostra.

As conversões em éster das reações de esterificação em SLC foram calculadas a partir dos valores do índice de acidez das amostras, de acordo com a Equação 10.

$$\text{Esterificação (\%)} = \frac{(IA_0 - IA_t) \times 100}{IA_0} \quad (10)$$

onde, IA_0 é o índice de acidez da amostra no tempo zero e IA_t é o índice de acidez da amostra no tempo de reação analisado.

4.9.5 Planejamento experimental

Após a análise estatística dos ensaios preliminares de esterificação, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 utilizando a preparação enzimática LIPB-17, liofilizada e delipidada, para as variáveis independentes temperatura (T °C), concentração da enzima [E] % e razão molar ácido láurico:etanol (RM) em cinco níveis de valores conforme apresentação na Tabela 5.

No total, foram realizados 17 ensaios, sendo 8 fatoriais, 6 axiais e 3 pontos centrais (Tabela 6) fixando o tempo total de reação em 6 horas. Como variável resposta foi considerada o grau de conversão em porcentagem. A atividade lipásica foi determinada conforme item 4.9.3. As análises dos resultados foram feitas utilizando-se o Minitab 16®.

Tabela 5- Variáveis e níveis dos planejamentos experimentais para atividade de esterificação.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura °C	25	30	40	50	65
[E] %	2,5	3,0	5,0	6,0	7,5
RM (ácido:etanol)	1:3	1:5	1:6	1:9	1:12

Tabela 6- Matriz do delineamento composto central rotacional 2^3 com seus níveis codificados e reais para avaliação das variáveis temperatura, concentração da enzima e razão molar ácido láurico:etanol da lipase LIPB-17.

Ensaio	Temperatura (°C)	Enzima (%)	Razão molar (ácido graxo:etanol)
1	50 (+1)	6,0 (+1)	1:5 (-1)
2	30 (-1)	6,0 (+1)	1:9 (+1)
3	30 (-1)	3,0 (-1)	1:9 (+1)
4	30 (-1)	3,0 (-1)	1:5 (-1)
5	25 (-1,68)	5,0 (0)	1:6 (0)
6	50 (+1)	3,0 (-1)	1:9 (+1)
7	40 (0)	2,5 (-1,68)	1:6 (0)
8	40 (0)	7,5 (+1,68)	1:6 (0)
9	40 (0)	5,0 (0)	1:12 (+1,68)
10	65 (+1,68)	5,0 (0)	1:6 (0)
11	50 (+1)	6,0 (+1)	1:9 (+1)
12*	40 (0)	5,0 (0)	1:6 (0)
13*	40 (0)	5,0 (0)	1:6 (0)
14	30 (-1)	6,0 (+1)	1:5 (-1)
15	40 (0)	5,0 (0)	1:3 (-1,68)
16	50 (+1)	3,0 (-1)	1:5 (-1)
17*	40 (0)	5,0 (0)	1:6 (0)

* Pontos centrais

As reações foram realizadas em erlenmeyers de 50 mL selados, livre de co-solvente, em um agitador rotativo (200 rpm), com controle digital de temperatura e agitação (agitador orbital Tecnal TE-420) e para reduzir a hidrólise do éster formado, foi adicionada peneira molecular 5 Å (5 %m) após 1h do início da reação. Decorrido o tempo reacional, alíquotas de 1 mL foram diluídas em 20 mL do solvente hexano para análise titulométrica. Os dados obtidos foram avaliados por análise da variância (ANOVA), os parâmetros com p-valor menor que 10% ($p < 0,1$) serão considerados significativos (BURKET et al., 2005; COSTA E SILVEIRA, 2004).

4.10 Caracterização morfofisiológica do isolado bacteriano LIPB17

A morfologia celular do isolado bacteriano LIPB17 foi observada após a coloração pelo método de Gram. E para sua caracterização, foram realizados cinco testes bioquímicos convencionais, de acordo com os métodos de Bergey (1994), são eles: teste Vermelho de Metila (VM); teste de Voges-Proskauer (VP); teste citrato de Simmons; fermentação da glicose e teste citocromo-oxidase.

4.11 Caracterização molecular

Uma colônia isolada da cepa LIPB17 foi utilizada para realizar a PCR de colônia nas seguintes condições: 1,5U de Taq DNA polimerase; tampão da Taq DNA polimerase 1X; MgCl₂ 1,25 mM; 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador específico primer 530F (TGACTGACTGAGTGCCAGCMGCCGCGG) e 1492R (TGACTGACTGAGAGCTCTACCTTGTTACGMYTT) e dNTPs 0,2 mM. As reações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: 95 °C por 2 minutos; 25 ciclos (95 °C por 1 minuto, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto), 72 °C por 5 minutos.

O produto da PCR foi tratado com a enzima Exonuclease I (3,3 U - USB®) e SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase – USB, 0,66 U - GE Healthcare) a fim de eliminar os oligonucleotídeos iniciadores e dNTPs presentes na mistura da reação. Os tubos contendo as misturas foram incubados a 37 °C por 45 minutos, seguidos da inativação enzimática por 15 minutos a 80 °C. Os produtos purificados foram utilizados para a reação de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada segundo o método de término de cadeia de Sanger modificado (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977), empregando dideoxynucleotídeos marcados com fluoróforos. As reações foram realizadas em volume final de 10 µL contendo 3,2 pmol de oligonucleotídeo iniciador, aproximadamente 100 ng do produto da PCR purificados e 4 µL do reagente DYEnamic ET Sequence Premix Terminator (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences). O programa utilizado foi o seguinte: 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 56 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e caracterização do óleo da amêndoa do inajá

A seleção de 2.206 frutos maduros procedentes de progênes de polinização aberta de inajazeiros em área de fragmento florestal permitiu a obtenção de 87 Kg de material vegetal. Este montante disponibilizou 15 Kg de amêndoas frescas, dos quais se aproveitaram 9 Kg para extração do óleo produzindo um volume de 4,750 L de óleo bruto, correspondentes ao rendimento de 52,7% em óleo. Estes dados têm congruidade com a literatura, pois se verificou que a partir de 147 frutos pode-se obter um quilograma de amêndoas de inajá e, que 1,8 Kg de amêndoas podem produzir um litro de óleo.

Sob o ponto de vista do teor de óleo, esta amêndoa foi classificada como uma importante fonte oleífera da Amazônia que pode regionalizar a produção de biodiesel (MARTINS et al., 1996; ARAUJO et al., 2000; SALM, 2005; MOTA E FRANÇA, 2007, 2008; DUARTE, 2008; GOES et al., 2010). Esta consideração tem motivado estudos para alicerçar a produtividade sustentável em virtude do potencial agroindustrial da espécie com vistas à implantação de modelos de cadeia de valor para atender uma possível demanda em escala comercial comprometida com as indigências ambiental, econômica e social (BRAGANÇA; MELO; MIRANDA, 2010; FABRÍCIO, 2010; SIMÕES; MELO; MIRANDA, 2011; 2012; SILVA; MELO; MIRANDA, 2013).

A Tabela 9 mostra o rendimento em torta e óleo, e os resultados das análises de Índice de acidez (IA), Índice de saponificação (IS), Índice de peróxido (IP), Densidade e Viscosidade para o óleo da amêndoa de inajá.

Tabela 7- Resultados das análises físico-químicas do óleo.

Parâmetros	Unidades	Inajá
Rendimento torta ¹	%	38,8
Rendimento óleo	%	52,7
IA	mg KOH/g	60,04
IS	mg KOH/g	207,84
IP	meq/Kg	5,353
Densidade	Kg/m ³	916,9
Viscosidade	mm ² /s	25,48

¹ Bagaço proveniente da prensagem das amêndoas oleaginosas durante a extração do óleo.

O óleo revelou acidez de 60,04 mg KOH/g, valor significativamente elevado quando comparado aos valores de 5,61 mg KOH/g e 4,78 mg KOH/g estimados por Mota e França (2007) e ao valor de 2,49 mg KOH/g obtido por Conceição (2010) para óleo da mesma fonte. Alta acidez de um óleo é, normalmente, compreendida como um indicador de baixa qualidade das sementes e, ou, do armazenamento das mesmas. Neste estudo, as amêndoas foram acondicionadas em potes plásticos bem fechados, mantidos a temperatura de 5° C, sendo preservadas sem evidências de contaminação. Contudo, a acidez em demasia pode estar relacionada à pureza do óleo, uma vez que este foi apenas filtrado, ou pela decomposição acelerada dos glicérides pela exposição à luz (RIBEIRO E SERAVALLI, 2004). No caso dos autores citados, o óleo da amêndoa de inajá foi utilizado para produção de biodiesel por meio das reações de transesterificação (via química) e craqueamento, respectivamente. Nestas duas reações, o óleo deve apresentar acidez abaixo de 2 mg KOH/g como condição ideal para evitar problemas no processo reacional como consumo excessivo do catalisador, ocorrência de reações paralelas ou a não ocorrência da reação (ZAGONEL, 2000; SUAREZ et al. 2009).

No entanto, para o caso da catálise enzimática, a presença de ácidos graxos livres não afeta o rendimento da reação, uma vez que as enzimas são capazes de conduzir reação de hidrólise e de síntese de forma direta (LEE, FOGLIA e CHANG, 2002). Portanto, o óleo obtido neste trabalho apresenta-se apto para uso como matéria prima para síntese obtenção de biodiesel por via enzimática.

O óleo também apresentou 207,84 mg KOH/g de material saponificável, este resultado está em concordância com a literatura referente ao mesmo substrato. Pesce (1941) registrou o índice de saponificação em 248 mg KOH/g, Cruz et al. (1984), relatou 185 mg KOH/g e, Rodrigues et al. (2006) obtiveram os valores de 281 mg KOH/g e 293 mg KOH/g em amostras provenientes de duas áreas do Estado do Pará. Os valores de 263 mg KOH/g e 262 mg KOH/g foram registrados em óleos procedentes de dois municípios do Estado de Roraima (DUARTE, 2008).

Analisando o IP, foi obtido o valor de 5,353 meq/Kg de óleo. Este resultado difere dos índices obtidos por Duarte (2008), única referência disponível, que foram 18 e 25 meq/Kg de óleo. Em relação à densidade e viscosidade, foram obtidos 916,9 Kg/m³ e 25,48 mm²/s, respectivamente, valores semelhantes para estes parâmetros foram revelados por Conceição (2010), 943,8 Kg/m³ e 29,65 mm²/s.

Segundo Ramos (1999,2003), nem todo óleo vegetal pode ser matéria prima para produção de biodiesel. Isto ocorre porque alguns óleos apresentam, quando comparados

ao diesel mineral, propriedades impróprias, como alta viscosidade cinemática (entre 30-40 mm²/s) e alta densidade. A alta viscosidade do óleo vegetal reflete sua elevada massa molecular e pode ser transferida para o biodiesel (KNOTHE, 2005; SANTOS, 2008). As características físico-químicas inerentes dos óleos vegetais estão diretamente relacionadas à qualidade do biocombustível. Desta forma, são elas que potencializam, ou não, uma espécie vegetal como matéria prima vigente em projetos de biorrefinarias, bem como, os custos totais de produção (CAMPOS, 2009).

5.2 Determinação da composição em ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos do óleo de inajá foi determinado por cromatografia de fase gasosa pela análise dos respectivos ésteres metílicos, utilizando-se como derivatização o método do trifluoreto de boro (item 4.2.7). A identificação dos ácidos graxos determinou que o óleo de inajá tem na sua composição 48,95% do ácido graxo láurico, seguido do mirístico e do elaídico com percentuais de 21,06% e 9,96%, respectivamente (Tabela 8). A massa molar média do óleo calculada multiplicando-se a composição centesimal em ácidos graxos por suas respectivas massas molares foi de 692,7 g/mol. Este é um dado importante para acompanhar a conversão dos TAGs do óleo em seus ésteres.

Tabela 8- Composição em ácidos graxos (%) do óleo da amêndoa de frutos de inajá oriundos de Parintins-AM.

Ácidos graxos	Número de C e instaurações	%
Láurico	C12:0	48,95
Mirístico	C14:0	21,06
Elaídico	C18:1	9,96
Palmítico	C16:0	8,02
Caprílico	C8:0	3,59
Cáprico	C10:0	3,41
Esteárico	C18:0	2,51
Linoleico	C18:2	2,5

O ácido láurico é resistente à oxidação não enzimática e ao contrário de outras gorduras saturadas, tem temperatura de fusão baixa e bem definida (ROBINSON, 1991). Os valores encontrados neste trabalho diferiram de alguns registros da literatura, que para este óleo, apresentou o ácido graxo oléico (C18:1) como destaque quantitativo (COSTA et al., 2007; NUNOMURA et al., 2007; DUARTE, 2008). Por outro lado, os resultados obtidos são semelhantes aos observados por Cruz et al. (1984), que revelaram maior percentagem de ácido láurico 44,49% no mesmo tipo de óleo obtido de inajás do Maranhão. Bereau et al. (2003), referenciaram valores ainda mais alinhados uma vez que na análise do óleo de inajá da Guiana Francesa, o ácido láurico apresentou teor de 40,5%, mirístico 25,5% e palmítico 9%. Mais recentemente, Fabrício (2010) também registrou valores expressivos de ácidos graxos saturados, láurico (54,6%) e mirístico (22,3%), ambos encontrados em sementes quiescentes de inajá. Variações da composição em ácidos graxos no mesmo tipo de óleo vegetal podem ser justificadas fatores como, variedade da semente, época de colheita, técnica de processamento, condições climáticas e de solo.

5.3 Seleção de isolados bacterianos produtores de lipase com atividade hidrolítica

A fim de selecionar o isolado bacteriano com melhor afinidade pelo substrato óleo de inajá, foram reativados 44 isolados bacterianos, contudo somente os isolados que apresentaram crescimento de colônias em até 72 horas em meio basal foram considerados ativos e, portanto, aptos aos testes de atividades de lipase. Os demais isolados foram rejeitados para os testes posteriores em função da ausência de crescimento no meio basal ou por apresentarem crescimento muito lento.

Assim, 36 isolados foram testados quanto à atividade lipolítica em meio de cultura sólido com rodamina B. Destes, 25 isolados (69,4%) apresentaram ação enzimática positiva nas condições testadas que, em conjunto com a opacidade e homogeneidade do meio de cultura, foi detectado pela formação de halo lipolítico claro e nítido em torno das colônias (Figura 13).



Figura 13- Formação do halo ao redor das colônias de isolados bacterianos indicando a ação da lipase em meio contendo óleo de inajá como substrato.

Com base na literatura, vários trabalhos buscam estabelecer dois parâmetros importantes para o processo de seleção de isolados lipolíticos, tempo e temperatura. Para a análise da atividade da lipase experimentos com diferentes tempos são citados, variando de 1 hora, passando por 24, 72 e até 120 horas de ensaio (GEORGE et al., 1999; SENE et al., 2002; SNELLMAN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006; ZAGO, 2010; COELHO et al., 2013).

Para o presente estudo, a determinação do IAL foi em 72 horas, pois de acordo com as referências, este período é citado como a média do pico de produção de lipase nas bactérias, decaindo posteriormente e estabilizando com o passar do tempo (LOPES et., 1999; SENE et al., 2002; LIMA et al., 2003; 2005; WILLERDING et al. 2011). Quanto à temperatura, dados fornecem a informação de que a produção de lipase pode apresentar um comportamento diferenciado ao longo do tempo conforme a temperatura, sendo comum o aumento da atividade da lipase em temperaturas mais baixas. Com base nessa informação e nos estudos prévios realizados por Willerding et al. (2011) com este mesmo lote de isolados lipolíticos, a temperatura de 30 °C foi determinada como condição térmica ótima para essa etapa do experimento. Os resultados estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Seleção primária dos isolados bacterianos lipolíticos em função dos Índices de Ativação da Lipase (IAL) no período de 72 horas a 30 °C (valores médios de cinco replicatas e duas repetições).

Isolados	Φ Halo	Φ Colônia	IAL
Lip 05	1,64	0,6	2,73
Lip 67	2,26	0,56	4,04
Lip 86	2,44	0,62	3,94
Lip 89	1,64	0,74	2,22
Lip 90	3,54	0,64	5,84
Lip 93	2,16	0,62	3,48
Lip B8	1,74	0,66	2,64
Lip B10	3,46	0,8	4,33
Lip B12	1,64	0,3	5,47
Lip B16	1,66	0,3	5,53
Lip B17	1,92	0,64	3,00
Lip B22	2,7	0,5	5,40

A técnica de medição de halos e colônias para obtenção do índice de ativação lipásica médio no período de avaliação revela os diferentes níveis de atividade lipolítica e considera como referência a estirpe *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (STAMFORD et al., 1998) que possui um IAL em meio de cultura sólido específico para lipase em 1,80. Em comparação, todos os 25 isolados avaliados apresentaram IAL superior ao da estirpe padrão, contudo, apenas os 12 mais representativos (Figura 14) foram selecionados para avaliação mais apurada da capacidade de produção lipásica. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, no qual foi constatada diferença significativa entre as enzimas testadas.

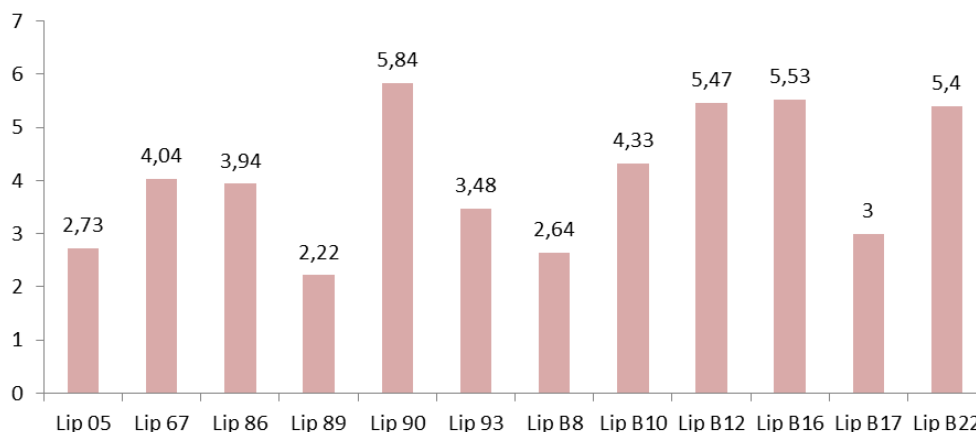


Figura 14- Variação média do IAL para os doze isolados bacterianos selecionados em placa de Petri a 30 °C por 72 horas.

5.4 Determinação da atividade de hidrólise das preparações lipásicas sobre o substrato sintético p-NPL

Os resultados relativos à especificidade das lipases demonstraram que das 12 enzimas testadas na etapa qualitativa, nove têm elevada atividade na hidrólise de p-nitrofenil laurato (p-NPL). A Figura 15 apresenta as concentrações de p-NP em micromoles (μ moles) dos nove isolados bacterianos selecionados. Para determinar a atividade da lipase sob o substrato sintético aplicou-se a equação obtida pela reta padrão de p-nitrofenol (p-NP), em que o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi considerado bom e explica em 99,41% as atividades das enzimas testadas (ANEXO A). A análise de teste de Tukey ($p < 0,05$), apresentou uma diferença significativa entre as bactérias, confirmando a LIPB-17 superior estatisticamente às demais, seguida pela LIPB-8 e LIPB-67 (ANEXO B).

A diferença entre as lipases representa a afinidade dessas enzimas ao p-NPL, um substrato sintético constituído por ácidos graxos de cadeia longa (C12:0), ao detectar dentre as lipases testadas àquela com melhor afinidade ao substrato sintético, por consequência, seleciona-se a enzima que tem maior afinidade para com o óleo de inajá, visto que sua composição química tem no ácido láurico o seu maior contribuinte.

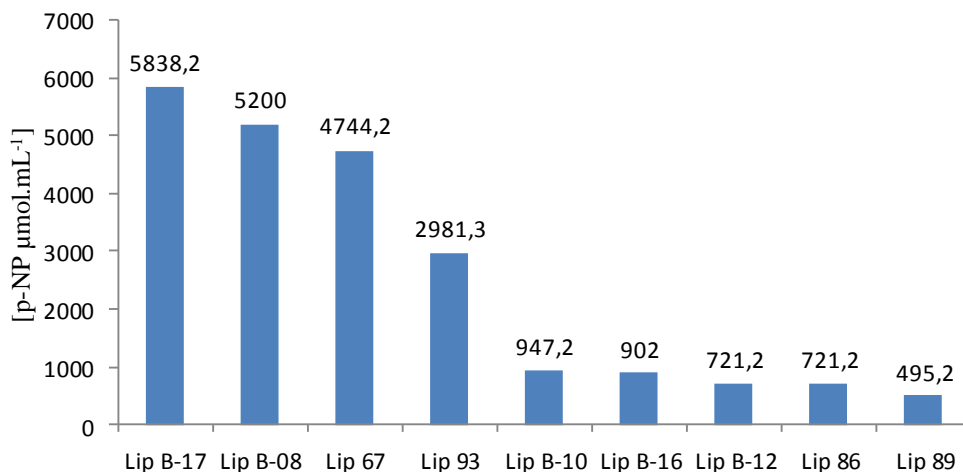


Figura 15- Hidrólise de p-nitrofenil laurato para seleção da lipase em função das atividades das preparações lipásicas dos nove isolados.

Os dados mostram para as duas lipases que se apresentaram superiores as demais (LIP B17 e LIPB8), um baixo coeficiente de variação ($cv < 20\%$). Isto representa pouca variação da atividade da lipase em todas as replicatas ($n=9$) que constituíram para cada enzima testada. Do ponto de vista de seleção, pouca variação na atividade enzimática indica uma produção metabólica constante sob as condições reacionais testadas.

A Tabela 10 apresenta os resultados da atividade total, produtividade, biomassa e proteínas totais dos isolados bacterianos testados. Por meio do método da hidrólise do p-NPL as lipases dos isolados LIPB17, LIPB-8 e LIPB-67 apresentaram atividade lipolítica correspondente a 5838,2 U/mL, 5200,0 U/mL e 4744,2 U/mL, respectivamente. A produtividade foi entre 198 U/mg (LIP89) e 2653 U/mg (LIPB17). Os valores de biomassa variaram entre 1,5 mg/mL (LIP93) e 3,2 mg/mL (LIPB16). Quanto às proteínas totais ocorreu uma variação de 0,011 mg/mL (LIP93) a 0,036 mg/mL (LIPB17).

Tabela 10- Atividade lipolítica total e específica, biomassa e proteínas totais dos nove isolados bacterianos selecionados para análises quantitativas.

Isolados	Atividade total (U/mL/min)	Produtividade (U/mg)	Biomassa (mg/mL)	Proteínas totais (mg/mL)
Lip B-17	5838,2	2653,7	2,2	0,036
Lip B-08	5200,0	2000,0	2,6	0,036
Lip 67	4744,2	1581,4	3,0	0,018
Lip 93	2981,3	1987,5	1,5	0,011
Lip B-10	947,2	364,3	2,6	0,032
Lip B-16	902,0	281,2	3,2	0,038
Lip B-12	721,2	300,5	2,4	0,031
Lip 86	721,2	300,5	2,6	0,028
Lip 89	495,2	198,0	2,5	0,024

Outro aspecto relevante foi que os isolados com melhores resultados na fase quantitativa não apresentaram os melhores resultados na fase qualitativa, onde a análise ocorreu em meio de cultura sólido, demonstrando que nem sempre ocorre uma correspondência entre o tamanho de halo lipolítico detectado em placa e a quantidade de lipase que é produzida na fermentação (COLEN, 2006). Diferenças físicas nas duas condições podem influenciar a liberação da lipase extracelular. Ainda, pode haver isoformas da enzima que se diferenciam no peso molecular, o que pode induzir a uma dificuldade na migração extracelular em meio de cultura sólido, mas que, em meio de cultura líquido, essa dificuldade deixa de existir (WILLERDING, 2007). Mas sobretudo, estes resultados permitiram a seleção da lipase LIPB17 para o estudo da hidrólise enzimática do óleo da amêndoa do inajá.

5.5 Determinação da atividade hidrolítica pelo método titulométrico

O gráfico exposto na Figura 16 mostra o comportamento da LIPB17 nos diferentes valores de pH. Este ensaios referentes a influência do pH na atividade da enzima indicam que esta enzima tem melhor atividade hidrolítica sob condições alcalinas (pH7,5) visto que em valores de pH ácido (pH 5,0 e 6,0) sua atividade ficou bem abaixo. Da mesma forma, foi observado menor atividade específica em pH 6,0 (349,8U/mL) e maior atividade específica (8587,8 U/mg) em pH 7,5.

A dosagem da atividade lipásica por titulometria (item 4.7.2.) visou a confirmação do desempenho da atividade hidrolítica da LIPB17 demonstrada no método da hidrólise de p-NPL, contudo, também destacou que dentre as bactérias estudadas são produzidas lipases com maior afinidade pelo óleo de inajá, enquanto outras têm afinidade superior com o p-NPL.

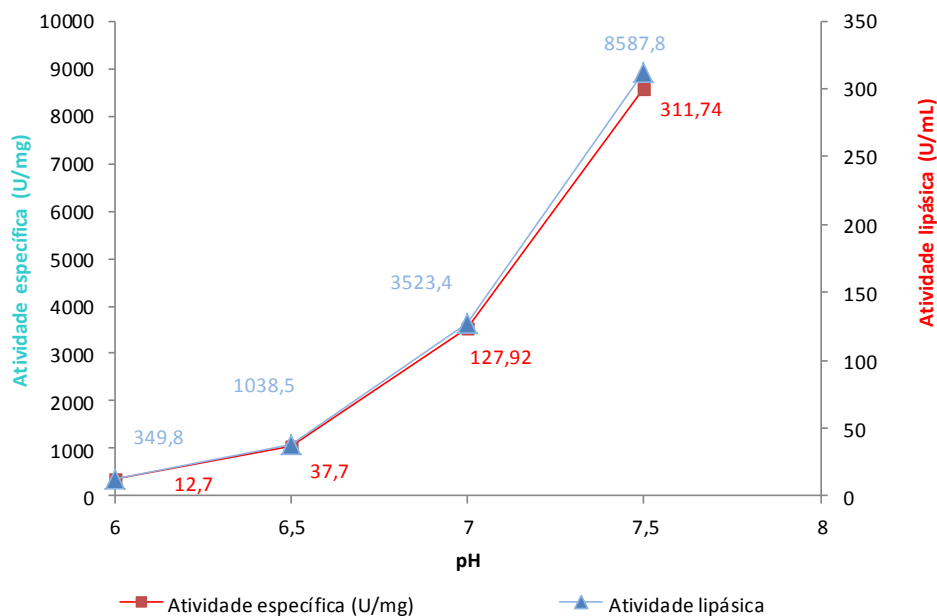


Figura 16- Atividade da lipásica e atividade específica da LIPB17 por titulometria

Várias lipases bacterianas atuam em pH alcalino, entre elas, espécies de *Bacillus stearothermophilus* MC7 (pH 7,5-9,0) (KAMBOUROVA et al., 2003), *Pseudomonas fluorescens* HU380 (pH 7,5) (KOJIMA; SHIMIZU, 2003) e *Staphylococcus xylosus* (pH 8,5) (MOSBAH et al., 2007).

Estes resultados justificam o estudo das reações contemplando uma faixa de pH mais alcalina, uma vez que de acordo com a tendência observada na Figura 16 a atividade hidrolítica é aumentada em função deste parâmetro.

A lipase produzida e secretada pelo isolado B17 foi analisada por SDS - PAGE 12%, conforme a Figura 17. Nesta, verificou-se que a lipase pode ser identificada como uma única banda preponderante de tamanho ~45kDa. Este resultado corresponde com dados da literatura que apresentam a massa molar de lipases microbianas variando entre 19 e 65 kDa (FERNANDES, 2007; MENG et al., 2011; BASTOS, 2013).

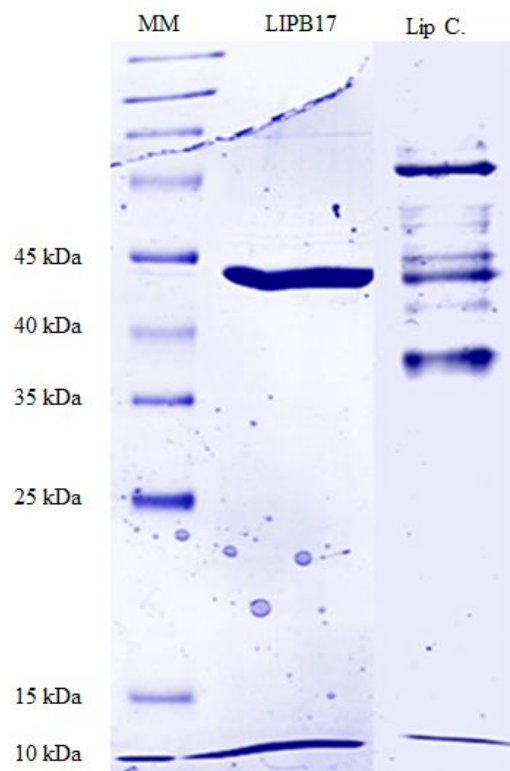


Figura 17- Perfil eletroforético de SDS-PAGE 12% da proteína secretada pelo isolado LIPB17. 1-Marcador de massa molecular; 2- amostras do sobrenadante de LIPB17; 3- lipase comercial de *Pseudomonas cepacia* (Sigma-Aldrich).

5.6 Caracterização e identificação molecular de LIPB17

As chaves dicotômicas baseadas em características fenotípicas de bactérias representam uma importante ferramenta na identificação de bactérias em conjunto com a identificação molecular. Dessa forma, com base na caracterização morfológica e nos resultados das provas bioquímicas e fisiológicas (item 4.10), o isolado LIPB17 selecionado como potencial produtor de lipase é um bacilo Gram-negativo, oxidase positivo, citrato positivo, apresenta crescimento negativo para os meios vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), além de não ser um fermentador de glicose (ANEXO -). Os resultados supracitados sugerem que esta bactéria pertence ao gênero *Pseudomonas* (BERGEY, 1994).

A análise do sequenciamento do isolado bacteriano LIPB17 complementou as avaliações bioquímicas. A região conservada do gene 16S foi amplificada com sucesso utilizando oligonucleotídeos iniciadores (530/1492) permitindo a amplificação de uma banda única representando um fragmento de DNA de aproximadamente 1000 pares de base (pb). A sequência obtida apresentou *e-value* = 0 com 99,5% de identidade com

Pseudomonas fluorescens linhagem KC30 (KF733015) (ANEXO C) corroborando os dados bioquímicos.

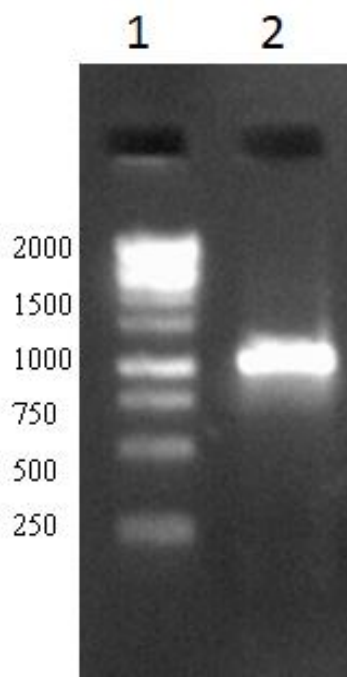


Figura 18- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, da amplificação da região 16S do rDNA dos isolado B17. Poço 1 – Marcador de peso molecular de 1Kb da fermentas; Poço 2 – Amostra 1 (B17).

As lipases produzidas por bactérias do gênero *Pseudomonas* são descritas como enzimas de grande estabilidade em solventes orgânicos e com alto grau de enantiosseletividade, razão pela qual são bem empregadas na resolução quiral de racematos, produzindo enantiômeros puros (JAEGER et al., 1997). Comumente apresentam o mecanismo da ativação térmica, sendo reportadas com bons rendimentos de atividade em ampla faixa de temperatura de 25 a 100°C e estabilidade em pH fortemente alcalino (pH 12) (REETZ E JAEGER, 1998; RATHI et al., 2000; LIMA et al., 2004; BARON et al., 2005).

Recentemente, SON et al. (2012) reportaram que a *P. fluorescens* possui um sistema de secreção tipo I (TISS) que medeia a secreção de uma lipase termoestável (TliA). Compreendida como uma hospedeira potencial de expressão para uma gama diversificada de proteínas recombinantes, em particular, por ser segura, apresentar crescimento robusto e favorecer uma fermentação de alta densidade celular. Por conseguinte, esta bactéria tem sido desenvolvida como *protein manufacturing factory* (PMF) de alto rendimento capaz de produzir proteínas farmacêuticas e industriais

(LANDRY et al. 2003; RETALLACK et al., 2012). Até o momento, dados na literatura não revelaram a lipase de *P. fluorescens* como biocatalisador em reações de síntese para o biodiesel.

5.7 Planejamento Experimental – Reação de hidrólise enzimática do óleo de inajá

Um delineamento fatorial completo foi realizado com objetivo de verificar os modelos que possam prever a eficiência na hidrólise enzimática do óleo de inajá com lipase (LIPB17). Para a reação foram mantidos os 10 mL de substratos (emulsão) mais 2 mL da preparação lipásica de LIPB17 (311,74 U/mL). Os resultados são apresentados na Tabela 11. Verificou-se que o melhor desempenho em relação à porcentagem de hidrólise, ou seja, conversão do óleo da amêndoa de inajá em ácidos graxos livres ocorreu no ensaio 13 (57,49%) nas condições de menor temperatura (28 °C), maior tempo de reação (48 horas), pH 6,0 e na maior quantidade de enzima (7,5%). Cabe mencionar a boa reprodutibilidade dos dados obtidos, que pode ser evidenciada pelas réplicas dos pontos centrais.

Tabela 11- Matriz para o planejamento fatorial completo 2^4 com seus níveis reais e codificados e com as respostas da conversão de hidrólise (%).

Ensaio	T (°C)	Tempo (h)	pH	E (%)	Hidrólise (%)
1*	33 (0)	24 (0)	7 (0)	5,0 (0)	42,65
2	28 (-1)	12 (-1)	6 (-1)	2,5 (-1)	32,89
3	45 (+1)	48 (+1)	6 (-1)	2,5 (-1)	50,29
4	28 (-1)	48 (+1)	8 (+1)	7,5 (+1)	47,54
5	28 (-1)	48 (+1)	6 (-1)	2,5 (-1)	47,23
6	45 (+1)	48 (+1)	6 (-1)	7,5 (+1)	52,45
7	45 (+1)	12 (-1)	6 (-1)	7,5 (+1)	42,88
8*	33 (0)	24 (0)	7 (0)	5,0 (0)	43,08
9	45 (+1)	12 (-1)	6 (-1)	2,5 (-1)	43,73
10	45 (+1)	12 (-1)	8 (+1)	2,5 (-1)	38,35
11	45 (+1)	12 (-1)	8 (+1)	7,5 (+1)	35,63
12	45 (+1)	48 (+1)	8 (+1)	7,5 (+1)	45,79
13	28 (-1)	48 (+1)	6 (-1)	7,5 (+1)	57,49
14	28 (-1)	12 (-1)	8 (+1)	7,5 (+1)	36,43
15	28 (-1)	48 (+1)	8 (+1)	2,5 (-1)	48,89
16	28 (-1)	12 (-1)	6 (-1)	7,5 (+1)	41,09
17*	33 (0)	24 (0)	7 (0)	5,0 (0)	44,15
18	28 (-1)	12 (-1)	8 (+1)	2,5 (-1)	37,61
19	45 (+1)	48 (+1)	8 (+1)	2,5 (-1)	48,19

*Pontos centrais

A análise de variância (ANOVA) para os ensaios com LIPB17 está apresentada na Tabela 12, onde se verifica que os efeitos principais e as interações influenciaram estatisticamente a reação. Isto é evidenciado pela ordem de grandeza dos valores numéricos da coluna de probabilidade (P). Nestas variáveis, o teste de hipótese nula é rejeitado, pois os valores estimados para o teste são menores que 5% ($p < 0,05$), ou seja, os efeitos possuem uma probabilidade menor que 5% de representar apenas ruído (BURKET et al., 2005; COSTA & SILVEIRA, 2004).

Tabela 12- Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial completo para reação de hidrólise enzimática do óleo de inajá com lipase de LIPB17.

Fonte de variação	DF	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Quadrado ajustado	F	P
Efeito principal	4	566,115	566,115	141,529	41,46	0,000
Interação	6	103,189	103,189	17,198	5,04	0,020
Erro residual	8	27,307	27,307	3,413		
Curvatura	1	1,876	1,876	1,876	0,52	0,496
Ausência de ajuste	5	24,238	24,238	4,848	8,13	0,113
Erro	2	1,193	1,193	0,587		
Total	18	696,612				

A verificação da capacidade destes modelos em reproduzir satisfatoriamente os dados experimentalmente obtidos ocorreu por meio do coeficiente de regressão e do teste estatístico F. Assim, foi possível determinar diferenças significativas entre as variáveis principais e suas interações. Percebe-se que as variáveis principais tempo e pH foram altamente significativos ($p < 0,05$), bem como as interações T °C x E(%) e pH x E (%) foram as variáveis que mais influenciaram estatisticamente na resposta de hidrólise (%) (Tabela 13), estas constatações podem ser confirmadas pelo diagrama de Pareto (Figura 19).

Tabela 13- Coeficientes de regressão do planejamento fatorial completo 2^4 para resposta hidrólise (%) enzimática do óleo de inajá com a lipase de LIPB17.

Termos	Coefficiente	T	P
Constante	44,019	103,85	0,000
T (°C)	0,509	1,10	0,303
Tempo (h)	5,579	12,08	0,000*
pH	-1,851	-4,01	0,004*
E (%)	0,758	1,64	0,140
T (°C)*Tempo (h)	-1,063	-2,30	0,050
T (°C)*pH	-0,823	-1,78	0,113
T (°C)*E (%)	-1,234	-2,67	0,028*
Tempo (h)*pH	-0,28	-0,61	0,561
Tempo (h)*E (%)	0,326	0,71	0,500
pH*E (%)	-1,714	-3,71	0,006*

*Variáveis estatisticamente significativas (95% de confiança)

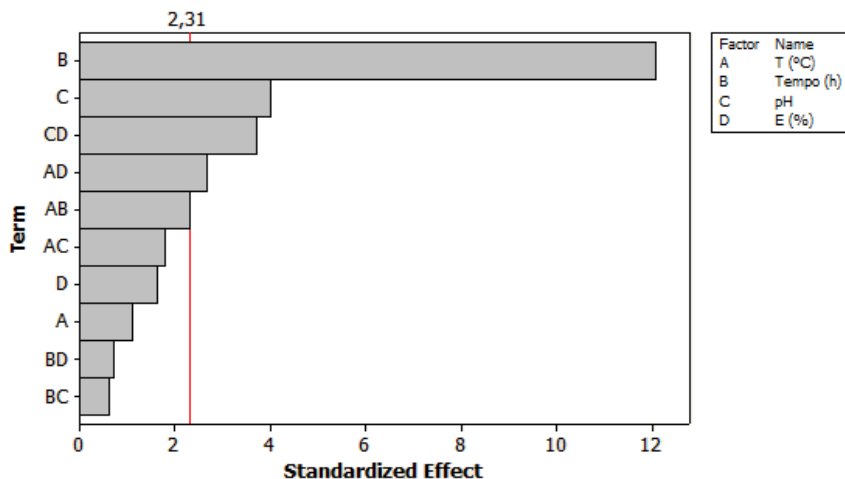


Figura 19- Diagrama de Pareto para a variável resposta em % de hidrólise do óleo de inajá com a preparação lipásica bruta LIPB17.

De maneira geral, as variáveis estudadas refletem a influência sobre a reação de hidrólise do óleo de inajá. Como efeito principal, as variáveis tempo e pH foram altamente significativas (Figura 20). Ainda de acordo com a análise estatística, a concentração de enzima (E %) quando interagiu com a temperatura ou o pH também foi altamente significativa. Quanto maior a temperatura e a % de enzima melhor será o resultado. As maiores concentrações de enzima em menor pH também foi produtivo (Figura 21).

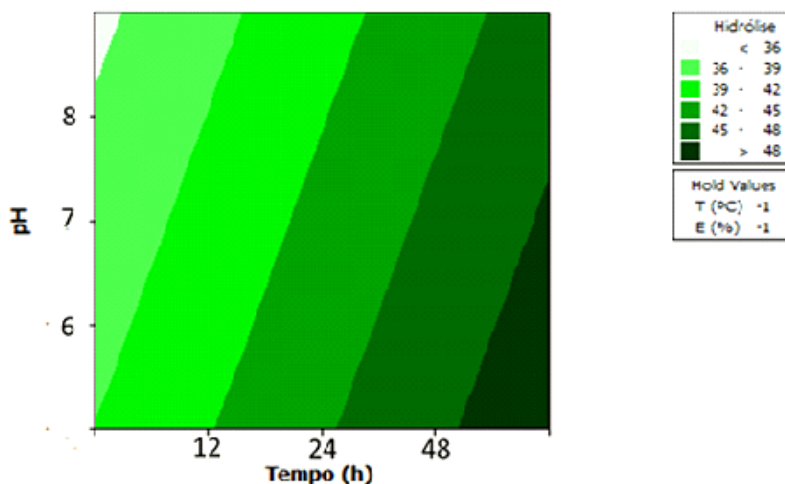


Figura 20- Curva de contorno dos efeitos estimados para variáveis tempo e pH estudadas na conversão do ácido láurico utilizando lipase *Pseudomonas fluorescens* (LIPB17).

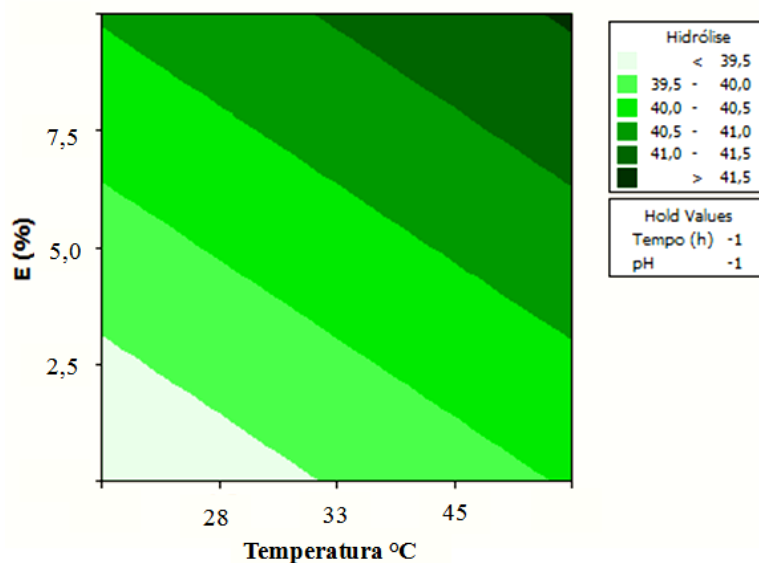


Figura 21- Curva de contorno dos efeitos estimados para variáveis temperatura e enzima (%) estudadas na hidrólise utilizando lipase *Pseudomonas fluorescens* (LIPB17).

Willerding et al. (2011) empregando lipase bacteriana na hidrólise enzimática do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) também reportaram o tempo como variável significativa para o processo. A atividade enzimática é mensurada ao longo do tempo em função do aparecimento do produto ou desaparecimento do substrato. Ao se quantificar a reação através do tempo, verifica-se que pode estar ocorrendo uma reação enzimática de primeira ordem, ou seja, a velocidade da reação varia linearmente com a concentração do substrato.

Estes resultados são interessantes do ponto de vista da aplicabilidade de um processo enzimático, contudo uma condição de tempo e pH ótimos não foi fixada, mas considerando que, até o momento, não são apresentadas na literatura estudos da hidrólise enzimática do óleo de inajá empregando lipases não comerciais ou mesmo comerciais, esses resultados fornecem informações pertinentes e justificáveis para continuar como os ajustes nas variáveis em seus níveis buscando a maior eficiência no processo.

5.9 Planejamento experimental para a conversão de ácido láurico em éster etílico

Inicialmente, para avaliar o desempenho da lipase em reações de síntese em meio orgânico, foi realizado um estudo seguindo-se a síntese de ésteres etílicos pelo desaparecimento do ácido graxo no meio pelo método titulométrico. Foram utilizados como substratos o ácido láurico (componente majoritário do óleo de inajá) e o etanol em

duas diferentes razões molares 1:6 e 1:9, empregando lipase LIPB17 (5%) liofilizada e delipidada em sistemas livres de cossolvente (SLC). Como controle fez-se reações nessas mesmas condições de ensaio empregando uma lipase comercial de *Pseudomonas cepacia* (Sigma-Aldrich). As reações foram analisadas calculando a porcentagem de AGLs do meio reacional no período de 0, 2, 4, 6, 24, 48 e 72 horas. Os resultados estão apresentados na Figura 22.

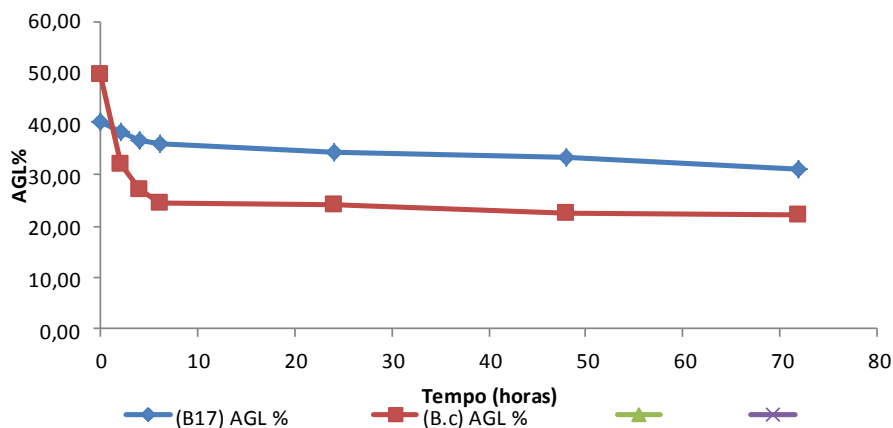


Figura 22- Consumo de AGL no meio reacional pela LIPB17.

A utilização da enzima LIPB17 liofilizada e delipidada foi um fator importante para verificar sua atividade de síntese. A Figura 23 apresenta as conversões em 40,6 % (RM 1:3) e 43,1% (RM 1:9), enquanto as reações desenvolvidas com a enzima apenas liofilizada apresentou conversão de 5,5 e 16%, nas respectivas razões molares (dados não mostrados).

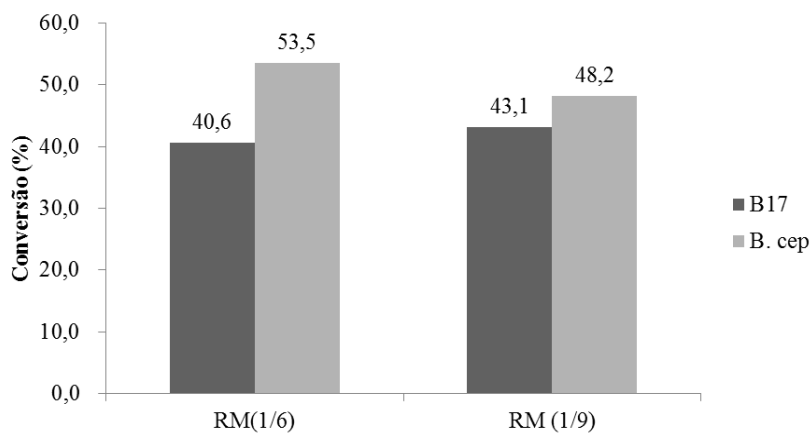


Figura 23-Gráfico comparativo da conversão em éster (%) da LIPB17 e *B. cepacia*.

Observa-se na Figura 23 que as porcentagens de conversão em éster da LIPB17 foram menores, em comparação a conversão obtida com a lipase comercial, porém, ainda assim se faz importante um estudo das condições ambientais a fim de progredir a conversão do processo. Outro aspecto relevante foi a utilização de um sistema livre de solvente, visto que este tem numerosas vantagens em se trabalhar como a possibilidade de aumentar a concentração dos substratos, evitando-se custos de recuperação do solvente ao final da reação (FORESTI e FERREIRA, 2005), além de reduzir os riscos quando se trabalha em sistemas fechados, o que torna estes processos mais econômicos e menos impactantes para o meio ambiente (SALIS et al., 2008; CHEN et al., 2009).

Desta forma, com base nos resultados preliminares e buscando conversões mais elevadas em SLC, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para análise da influência da temperatura ($^{\circ}\text{C}$); a concentração de enzima (E %) e RM ácido láurico:etanol no processo. O estudo foi conduzido de forma a permitir a avaliação das influências isoladas e/ou combinadas das variáveis de entrada com significância estatística para a resposta. Foi utilizada a % de esterificação (% de conversão) como variável resposta ou independente. A Tabela 14 apresenta os resultados experimentais do delineamento rotacional, contendo as variáveis estudadas.

Tabela 14 - Matriz para o DCCR 2^3 com seus níveis reais e codificados e com as respostas da conversão de esterificação (%).

Ensaio	T ($^{\circ}\text{C}$)	E (%)	Razão Ác:EtOH	IA0	IA1	AGL%	esterificação %
1	50 (+1)	6,0 (+1)	1:2 (-1)	178,85	116,75	41,68	34,78
2	30 (-1)	6,0 (+1)	1:4 (+1)	181,71	80,69	28,80	55,59
3	30 (-1)	3,0 (-1)	1:4 (+1)	179,27	130,20	46,48	49,68
4	30 (-1)	3,0 (-1)	1:2 (-1)	181,85	136,90	48,88	24,70
5	25 (-1,68)	5,0 (0)	1:3 (0)	183,42	127,34	45,46	30,57
6	50 (+1)	3,0 (-1)	1:4 (+1)	180,90	141,50	50,51	21,77
7	40 (0)	2,5 (-1,68)	1:3 (0)	177,41	115,89	41,37	34,67
8	40 (0)	7,5 (+1,68)	1:3 (0)	182,99	93,28	33,30	49,00
9	40 (0)	5,0 (0)	1:5 (+1,68)	176,99	79,55	28,39	55,00
10	65 (+1,68)	5,0 (0)	1:3 (0)	180,13	150,80	53,83	16,28
11	50 (+1)	6,0 (+1)	1:4 (+1)	179,27	131,63	46,99	26,57
12	40 (0)	5,0 (0)	1:3 (0)	177,99	97,29	34,73	45,33
13	40 (0)	5,0 (0)	1:3 (0)	177,41	98,58	35,19	44,40
14	30 (-1)	6,0 (+1)	1:2 (-1)	179,56	122,90	43,87	31,55
15	40 (0)	5,0 (0)	1:1 (-1,68)	180,42	130,91	46,73	27,44
16	50 (+1)	3,0 (-1)	1:2 (-1)	178,27	128,70	45,92	27,80
17	40 (0)	5,0 (0)	1:3 (0)	178,85	95,72	34,17	46,48

Para análise estatística foi utilizado o programa de estatística computacional MINITAB 17®, adequado para este tipo de metodologia. Os resultados da análise da variância (ANOVA) estão na Tabela 15. Analisando os dados da ANOVA, observa-se que os efeitos principais, bem como a interação entre as variáveis influenciaram estatisticamente a reação. Isto é evidenciado pela ordem de grandeza dos valores numéricos da coluna de probabilidade (P). Nestas variáveis, o teste de hipótese nula é rejeitado, pois os valores estimados para o teste são menores que 5% ($p < 0,05$), ou seja, os efeitos possuem uma probabilidade menor que 5% de representar apenas ruído (BURKET et al., 2005; COSTA & SILVEIRA, 2004).

O objetivo principal desta fase é ajustar os modelos que possam prever a eficiência na capacidade de esterificação da enzima selecionada. A verificação da capacidade destes modelos em reproduzir satisfatoriamente os dados experimentalmente obtidos ocorre através do coeficiente de regressão e do teste estatístico F.

Tabela 15- Análise de variância (ANOVA) para o DCCR 2³ para reação de hidrólise enzimática do ácido láurico com lipase de LIPB17.

Fonte de variação	DF	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Quadrado ajustado	F	P
Efeito principal	4	566,115	566,115	141,529	41,46	0,000
Interação	6	103,189	103,189	17,198	5,04	0,020
Erro residual	8	27,307	27,307	3,413		
Curvatura	1	1,876	1,876	1,876	0,52	0,496
Ausência de ajuste	5	24,238	24,238	4,848	8,13	0,113
Erro	2	1,193	1,193	0,587		
Total	18	696,612				

Com base nos resultados obtidos, foi possível determinar diferenças significativas entre as variáveis principais e suas interações (Tabela 18). Nota-se que somente a concentração de enzima (E%) não influenciou a esterificação enquanto que as variáveis principais Temperatura e RM ácido láurico:etanol foram altamente significativas ($p < 0,05$), bem como a interação entre essas duas variáveis (Tabela 16).

De modo geral, o melhor ensaio foi o de número 2 (Tabela 14), aonde apresenta o menor nível de temperatura em 30° e a razão 1:4 para Ácido:Álcool.

Tabela 16- Coeficientes de regressão para a resposta esterificação (%) do ácido láurico

Termos	Coefficiente	T	P
Constante	36,565	16,86	0,00
T (°C)*	-5,465	-2,26	0,05
E(%)	3,562	1,47	0,17
RM ácido:álcool*	5,940	2,46	0,03
Temperatura (°C)* E(%)	-0,123	-0,04	0,97
Temperatura (°C) * RM ácido:álcool*	-7,908	3,16	0,03
E (%) * RM ácido:álcool	-0,390	-0,12	0,90

*Variáveis estatisticamente significativas (95% de confiança)

Quando se analisa a Tabela 16 percebe-se pelos coeficientes das variáveis significativas uma tendência inversamente proporcional para temperatura quanto à eficiência da esterificação indicando que menor a temperatura, melhor será a esterificação com a enzima selecionada (Figura 24).

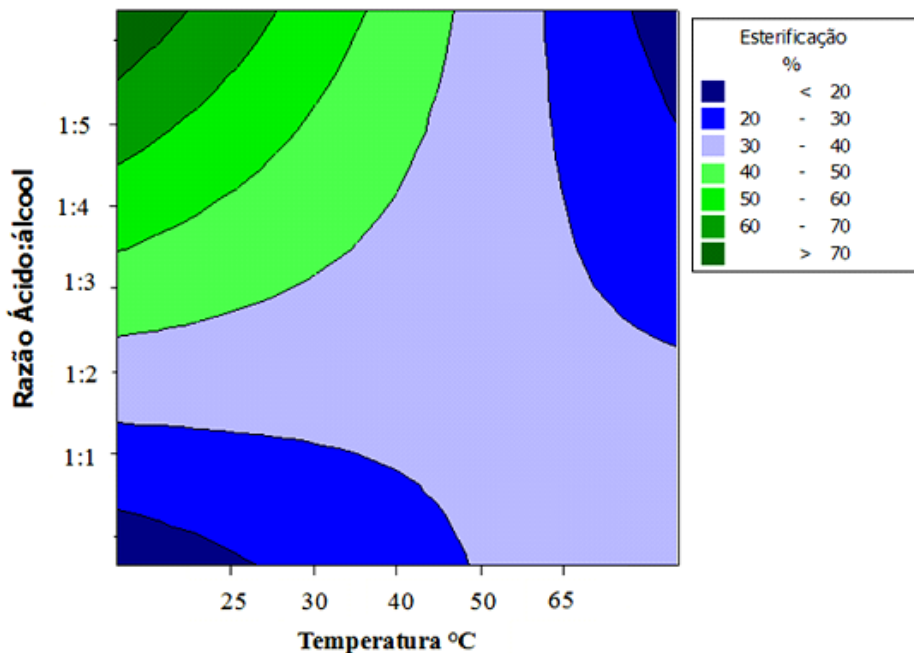


Figura 24- Curva de contorno para a Reação de Esterificação com relação à Temperatura e Razão Ácido:Álcool.

Com relação à RM ácido láurico:etanol, há uma tendência de promover uma melhor eficiência na medida em que aumenta-se a concentração de álcool com relação ao ácido, embora a melhor razão tenha sido 1:4. De acordo com a análise estatística, a concentração de enzima (E%) como efeito principal ou quando interagiu com a temperatura ou a razão ácido:álcool não foi significativa. Isto é, a concentração de enzima não influenciou a reação de esterificação.

A figura 24 mostra a tendência das variáveis significativas para uma otimização do processo de esterificação. De acordo com o gráfico, níveis mais baixos de temperaturas e níveis mais altos da razão ácido:álcool tendem a promover uma melhor esterificação. O que se precisa a partir daqui é otimizar quais os melhores níveis para as variáveis significativas com relação à enzima selecionada. Estes resultados dão um indicativo da necessidade de ajuste nas variáveis e em seus níveis buscando a maior eficiência no processo.

6 CONCLUSÕES

- Os frutos de inajá oriundos do Estado do Amazonas apresentaram elevado rendimento em óleo (52,7%) e sua caracterização físico-química e cromatográfica revelou índice de acidez elevado e caráter saturado, elementos que não interferem na sua utilização como matéria prima em reação de hidroesterificação por via enzimática para síntese de biodiesel;
- Dentre quarenta e quatro isolados bacterianos, doze apresentaram os melhores resultados na fase qualitativa do trabalho que na análise em meio de cultivo sólido com rodamina B utilizando como substrato o óleo da amêndoa de inajá, demonstraram IAL superior ao da cepa padrão;
- A LIPb17 foi selecionada como potencial biocatalisador para reações de hidrólise, por apresentar alta afinidade a substratos de cadeia longa de carbono como o p-NPL, sendo compreendida como uma lipase verdadeira com alta atividade hidrolítica sob o p-NPL com 5838,2 U/mL, sob o óleo de inajá com atividade de 311,74 U/mL e atividade específica de 8587,8 U/mg;
- A lipase LIPB17 também se revelou capaz de catalisar reação de esterificação, demonstrando atividade de 23,55 U/g, que em comparação com atividade hidrolítica é baixa, mas que desperta o interesse em otimizar as condições ambientais dos ensaios para verificá-la em seus pontos ótimos;
- Com nível de confiança de 95%, a LIPB17 converteu em 57,49% os triacilglicerídeos do óleo de inajá em ácidos graxos livres, indicando que nas condições avaliadas: baixa temperatura (28 °C), tempo de 48 horas, pH 6 e o máximo de enzima (7,5%), a temperatura foi a variável mais significativa;
- Com nível de confiança de 95%, a LIPB17 também demonstrou atividade de síntese, convertendo 55,59% de ácido láurico em ésteres etílicos, indicando nas condições avaliadas: temperatura (30 °C), enzima (7,5%) e razão molar ácido:etanol 1:4, mais uma vez a temperatura e também a razão molar foram as variáveis mais significativas;
- A LIPB17 foi caracterizada como um bacilo Gram-negativo e com 99,5% de identidade com *Pseudomonas fluorescens* linhagem KC30 (KF733015).

7 REFERÊNCIAS

ABRAMOVAY, R.; MAGALHÃES, R. O acesso dos agricultores familiares aos mercados de biodiesel parcerias entre grandes empresas e movimentos sociais. Texto para discussão N° 6. São Paulo: Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas, 36p. 2007.

ABRAMOVAY, R. Biocombstíveis: a energia da controvérsia. São Paulo: Editora SENAC, 181p. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (Brasil). Manual do programa de pesquisa e desenvolvimento do setor de energia elétrica / Agência Nacional de Energia Elétrica. Brasília: ANEEL, 67p. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução ANP nº 31, de 4.11.2005 – Diário Oficial da União de 7.11. 2005.

_____.Dados Estatísticos-2012. Página <http://www.anp.gov.br>. Acesso em março de 2013.

_____. Boletim mensal de Biodiesel – Dezembro de 2011.

_____. Boletim mensal de Biodiesel Janeiro de 2013.

AGUIAR, W. M. O Uso de Fontes Alternativas de Energia como Fator de desenvolvimento Social para Segmentos Marginalizados da Sociedade. Tese (Programa de Pós- Graduação de Engenharia) Universidade Federal do Rio de Janeiro. 97p. 2004.

AGROENERGIA EM REVISTA. Microrganismos em Agroenergia. N. 5, 2012.

ALMEIDA, A. F. S. A importância dos biocombustíveis na matriz energética de transporte rodoviário no Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia de Transportes), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 98p. 2006.

AMARAL, D. F. Desmistificando o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel: A visão da indústria brasileira de óleos vegetais. In: SEMINÁRIO BIODIESEL NO RIO GRANDE DO SUL, 2002, Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul: Associação Brasileira Das Indústrias De Óleos Vegetais (Abiove), p.1 – 12, 2009.

AMARAL, D. F. Panorama do mercado de extração de óleos: conjuntura e perspectivas. In: I SIMPÓSIO TECNOLÓGICO PBIO DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS. São Paulo: ABIOVE, 2009. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br>>. Acesso em novembro de 2012.

AMAZONAS, M. C. Desenvolvimento Sustentável e teoria econômica: o debate conceitual das perspectivas neoclássica, institucionalista e da economia ecológica. In: NOBRE, M.; AMAZONAS, M. (Org.) Desenvolvimento sustentável: a Institucionalização de um conceito (parte 2). Brasília: Ed Ibama, 2002.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. CHAMPAIGN, 1993.

ARANDA, D. A. G.; ROSA, L. P.; OLIVEIRA, L. B. Geração de Energia a partir de Resíduos do Lixo e Óleos Vegetais: Fontes Renováveis de Energia no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003.

ARANDA, D. A. G.; GONÇALVES, J. A.; PERES J. S.; RAMOS A. L. D.; MELO JUNIOR C. A. R.; ANTUNES, O. A. C.; FURTADO, N. C.; TAFT C. A. The use of acids, niobium oxide, and zeolite catalysts for esterification reactions. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v.22, p.709-716, 2009.

ARAÚJO, M.G.P.; LEITÃO, A.M.; MENDONÇA, M.S. Morfologia do fruto e da semente de inajá (*Attalea maripa* (Aubl.) Mart.) – Palmae. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.22, n.2, p.31-38, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS – ABIOVE, Perspectivas para a soja 2020. Mumbai: Congresso IASC. 2005. Disponível

em: http://abiove.com.br/palestras/abiove_pal_iasc05_br.pdf. Acesso em agosto de 2011.

_____. Desmistificando o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel: A visão da indústria brasileira de óleos vegetais. São Paulo. 2009.

_____. Capacidade de processamento de óleos vegetais. Disponível em <http://abiove.com.br>. Acesso em novembro de 2010.

_____. Análise mensal do mercado do biodiesel: edição nº 05 – Junho. 2013. Disponível em: <http://abiove.com.br>. Acesso em julho de 2013.

BABILÔNIA, I. L. Desempenho da Moringa oleifera em sistema silvipastoril (SAFs) no Mato Grosso. *Agro Educare*, v.1, p.77-87, 2013.

BAJAY, S. V.; BADANHAM, L. F. Energia no Brasil: os próximos dez anos. Brasília: Ministério das Minas e Energia. 2005.

BARBOSA, B. S. et al. Aproveitamento do óleo das amêndoas de tucumã do Amazonas na produção de biodiesel. *Acta Amazonica*, v.39, p. 371-376, 2009.

BARTSCH, A. S. O Mapa Estratégico da Indústria aplicado ao biodiesel no Brasil. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 279p. 2008.

BERGEY, D. H., HARRISON, F. C., BREED, R. S, HAMMER, B. W. & HUNTOON F. M. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins. 787p. 1994.

BEREAU, D.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; BANOUB, J.; BRAVO, R. FA and Unsaponifiable Composition of live Amazonian Palm Kernel Oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.80, n.1, p.49-53, 2003.

BEZERRA, V. S.; FERREIRA, L. A. M.; PEREIRA, S. S. C.; CARIM, M. de J. V. O inajá (*Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude) como potencial alimentar e oleaginoso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, Varginha: UFLA, v.3, p.301-305, 2006.

BEZERRA, V. S. O Inajá (*Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude) como fonte alimentar e oleaginosa. Comunicado Técnico 129. Embrapa Amapá, 6p, 2011.

BIODIESELBR. A agricultura familiar e o Biodiesel. 2005. Disponível em: <www.biodiesel.gov.br> Acesso em junho de 2012.

BIODIVERSIDADE, Informativo on line – <<http://www.biodiversidade.com>> Acessado em 10/10/2012.

BOLETIM MENSAL DO BIODIESEL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 03 de abril de 2013.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, cap.16, p.369-380, 2008.

BRAGANCA, D. C.; MELO, Z. L. O.; MIRANDA, I. P. A. Tolerância a dessecação e viabilidade de sementes de inajá - *Maximiliana maripa* (Aublet) Drude. In: XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA-CNPq/FAPEAM, 2010, Manaus. Anais da XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA-CNPq/FAPEAM, p.1-4, 2010.

BRASIL. MINISTERIO DE MINAS E ENERGIA- MME. Boletim mensal dos Combustíveis Renováveis. Disponível em <https://www.mme.gov.br/spg/publicações> Acesso em 30 de maio de 2013.

_____. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira-Grãos. Décimo primeiro levantamento. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-Companhia Nacional de Abastecimento. 2008.

_____. PROGRAMA NACIONAL DE PRODUÇÃO E USO DE BIODIESEL. 2010. Disponível em: www.biodiesel.gov.br. Acesso em fevereiro de 2013.

_____. RESOLUÇÃO ANP Nº 4, de 2 de fevereiro de 2010. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF, Disponível em: <<https://legislacao.planalto.gov.br/legislacao/nsf>> Acesso em março 2012.

_____. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Plano Nacional de Agroenergia. Brasília, 120p. 2005.

_____. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Anuário estatístico de agroenergia 2012: statistical yearbook of agrienergy / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia. Bilingüe, Brasília: MAPA/ACS, 284p. 2013.

BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL. Brasília-DF. Anais p.73-73, 2007.
BRUNDTLAND, G. H. Nosso futuro comum: comissão mundial sobre meio ambiente e desenvolvimento. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, 1991.

BUENO, T. Obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, São Paulo, 101p. 2005.

BURKET, J.F.M.; MALDONADO, R.R.; MAUGERI F.; RODRIGUES, M.I. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. J. Chem. Technol. Biotechnol. V. 80, p.61-67, 2005.

CAMPOS, A. A.; CARMÉLIO, E. C. Construir a diversidade da matriz energética: o biodiesel no Brasil. in ABRAMOVAY, R. (org.) Biocombustíveis: a energia da controvérsia. São Paulo: editora Senac. São Paulo, 2009.

CANDEIA, R. A. Biodiesel de soja: síntese, degradação e misturas binárias. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Paraíba, p.150, 2008.

CARVALHO, A. L. Aspectos da Biometria dos Cachos, Frutos e Sementes da Palmeira Najá (*Maximiliana maripa* (Aublet) Drude) na Região Leste do Estado do Acre. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v.5, p.234-236, 2007.

CARVALHO, C. L. Comparação entre métodos de extração do óleo de *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae-buriti) para uso sustentável na Reserva de Desenvolvimento Tupé: Rendimento e atividade antimicrobiana. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) Universidade do Estado do Amazonas, p.110, 2011.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipase. *Química Nova*, v.18, p.544-554, 1995.

CASTRO, J.C. Produção Sustentável de Biodiesel a partir de Oleaginosas Amazônicas em Comunidades Isoladas. *Anais do I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel*. Brasília, v.1, p.285-289, 2006.

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

CEBIN, et al. Esterificação heterogênea de ácidos graxos livres em óleos residuais de fritura. *Ambiência Guanabara-PR*, v.8, p.901-908, 2012.

CEPEA-Esaly – USP. Estudo sobre Análise de Custos e de Tributos nas Cinco Regiões do Brasil - Suporte à Tomada de Decisão e à Formulação de Políticas [s.a.].

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. *Revista CIATEC-UPF*, v.4, n.2, p.1-14, 2012.

COMISSÃO ECONÔMICA PARA AMÉRICA LATINA E O CARIBE. Análise Ambiental e de Sustentabilidade (AAS) do Estado do Amazonas. Publicação das Nações Unidas, Nova York, 203p. 2007.

CONCEIÇÃO, R.C. Craqueamento catalítico dos óleos de inajá e maracujá para a obtenção de biocombustíveis. Dissertação. Universidade Federal do Amazonas, 71p. 2010.

CONTI, J. B. Considerações sobre as mudanças climáticas globais. Revista do Departamento de geografia, v.16, p.70-75, 2005.

CORREIA, J.C. Atendimento energético a pequenas comunidades isoladas: barreiras e possibilidades. T&C Amazônia, v.6, p.30-35, 2005.

COSTA, D.S.; SILVEIRA, B.I. Estudo do processo de hidrólise enzimática do óleo da semente de maracujá através de um projeto fatorial completo e de metodologia de superfície de resposta. In: II Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada. Anais do Congresso, 8p. 2004.

COTULA, L. et al. Land grab or development opportunity? Agricultural Investment And International Land Deals. Londres/Roma, 2009. Disponível em: <http://www.ifad.org/pub/land/land_grab.pdf>. Acesso em julho de 2012.

CORRÊA, A.B. et al. Estudo do potencial oleaginoso de Maximiliana maripa (Correa) Drude como fonte de biodiesel. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, p.28. 2005.

COSTA, E. J. C.; ROCHA, D. Q.; CHAAR, J. S. Biodiesel de inajá (Maximiliana maripa Drude) obtido pela via etanólica e metanólica. In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, Varginha-MG. Anais UFLA, 4, 2007.

COSTA, C. J.; MARCHI, E. C. S. Germinação de sementes de palmeiras oleaginosas. 2008. Revista Biodieselbr. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com>. Acesso em novembro de 2012.

COSTA NETO, P.R.; ROSSI, L.F.S.; ZAGONEL, G.F.; RAMOS, L.P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v.23, p.531-537, 2000.

COY Martin; KOHLHEPP, Gerd (orgs.). *Amazônia sustentável: desenvolvimento sustentável entre políticas públicas, estratégias inovadoras e experiências locais*. Rio de Janeiro: Garamond, 2005.

CRAVO, M.J.S. Estudo de parâmetros palinológicos e aspectos ecológicos do *Inajá Maximiliana maripa* (Aubl.) Drude (Palmae), em área conservada e áreas desmatadas da Amazônia. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas- anaus, 81p. 1998.

CRAVO, M.J.S.; MIRANDA, I.P.A. A predação de frutos e sementes de *Maximiliana maripa* (Aublet) Drude (Palmae) em área conservada e área desmatada da Amazônia. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, Brasília. Resumos... Brasília: Sociedade Brasileira de Botânica, 187p. 2000.

CRUZ, P.E.N.; MARQUES, E.P.; AMAYA, D.R.; FÁRFAN, J.A. Macaúba, bacuri, inajá e tucumã: caracterização química e nutricional destes frutos do estado do Maranhão e os óleos respectivos. *Revista de Química Industrial*, 1984.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Química Nova*, v.32, p.776-792, 2009.

DIAS, G. L. S. Um desafio novo: o biodiesel. *Estudos Avançados*, 59p. 2006.

DIAZ, J.C.M. et al. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme Microbial Technol.*, v. 39, p.1042-1050, 2006.

DIECKELMANN. G.; HEINZ, H. J. The basics of industrial óleo chemistry. A comprehensive survey of selected technologies based on natural oils and fats. Mulheim, Germany, p.13-37 e 177-180, 1988.

DUARTE, O. R. Avaliação quantitativa e análise dos parâmetros biológicos, químicos e físico-químicos de frutos de *Maximiliana maripa* (Aublet) Drude (inajá) como subsídio ao estudo do potencial oleífero de populações promissoras para o Estado de Roraima. Tese (Pós-Graduação em Biologia Tropaical e Recursos Naturais), Manaus, 146p, 2008.

ENCARNAÇÃO, A. P. G. Geração de biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação, uma avaliação econômica. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 144p. 2008.

FABRÍCIO, C. B. C. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de Inajá (*Maximiliana maripa* (Aublet) Drude). Dissertação, Manaus, 48p, 2010.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. D.; OSCABIO, A. Biodiesel de soja-Texa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, v.28, p.19-23, 2004.

FERREIRA, E. de S.; LUCIEN, V. G.; SILVEIRA, C. S. Caracterização física do fruto, análise físico-química do óleo extraído do mesocarpo do tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) e inajá (*Maximiliana regia* Aubl.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, Lavras: UFLA, v.2, p.497-500, 2006.

FIGLIUOLO, R.; NUNOMURA, S. M.; SILVA, J. D.; CASTRO, J. C. Prospecção para o uso adequado e sustentável de sementes oleaginosas na produção de biodiesel na Amazônia, 2004, Salvador. Resumos da XXVII Reunião Anual da SBQ. Salvador: SBQ. 2004.

FIGLIUOLO, R.; SILVA, J.D.; COSTA, M.S.T.A. Produção de Biodiesel na Cadeia Produtiva e Sustentável do Tucumã do Amazonas (*Astrocaryum aculeatum* G.F.W. Mayer) (Arecácea, palmeira). In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, Brasília-DF. Anais..., p.73-73, 2007.

- FIGLIARO, D. A. et al. Metodologia experimental para avaliação de custos de produção e utilização de biodiesel: estudo de caso de quatro ésteres metílicos e óleo diesel comercial. *Ciência Rural*, v.41, p.1921-1926, 2011.
- FIGLIARO M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterification. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2006.
- FIGLIARO, N. N. Applications of lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.74, p.621-634, 1997.
- FIGLIARO, N. N. et al. Lipase-catalyzed esterification. *Catalysis reviews-science and engineering*, v.42, p.439-480, 2000.
- FIGLIARO, L. V. 202 Perguntas e respostas sobre Biocombustíveis. Brasília: SENAC, 324p. 2011.
- FIGLIARO, T.; ARAÚJO, M.; MARRA, R. Biodiesel e sua Sustentabilidade. 2010.
- FIGLIARDO, J. Biomassa e energia. *Quim. Nova*, v.32, n.3, p.582-587. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- FIGLIARDO, J.; TEIXEIRA COELHO, S.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy*, v.36, p.2086-2097, 2008.
- FIGLIARDO, M. M. R. Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo de peixe. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química, 93p. 2009.
- FIGLIARDO, W. A. Biodiesel a partir de óleos vegetais. 3º Enc. Energ. Meio Rural, Campinas-SP, Brasil, 2000.
- FIGLIARDO, W. A. Óleos vegetais como biocombustíveis. In: BARRETO, E. J. F. (Coordenador). Biodiesel e óleo vegetal in natura. Soluções energéticas para a Amazônia. Brasília: Ministério de Minas e Energia, 2008.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, v.89, p.17–34, 2003.

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

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipase for Biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p.390–397, 2002.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Em *A Multi-Volume Comprehensive Treatise Biotechnology*; Rehm, H. J.; Stader, P., eds.; 1998, vol. 8A, 38.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, v.86, p.1059-1070, 2005.

LANDRY TD, et al. Safety evaluation of an alpha-amylase enzyme preparation derived from the archaeal order Thermococcales as expressed in *Pseudomonas fluorescens* biovar I. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37:149 –168, 2003.

LEÃO, L. S. Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido níobico. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

LIMA, L. P. et al. Comparativo entre biodiesel de dendê e tucumã no desempenho operacional de trator agrícola. *Engenharia na agricultura*, Viçosa – Minas Gerais, v.20, p.234-243, 2012.

LOPES, Edio. Petrobrás combustíveis ver viabilidade no óleo de inajá. Disponível em: <<http://ediolopes.web.br.com/index.php/sample-sites-2/136-petrobras-combustiveis-ver-viabilidade-no-oleo-de-inaja>> Acesso em: 31 mai. 2014.

MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technoogy*, v.70, p.1-15. 1999.

MACEDO, I. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos-CGEE. Estado da Arte e Tendências das tecnologias para energia, 2003.

MALCATA, F. X. et al. Immobilized lipase reactors for modification of fat and oils: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.67, p.890-910, 1990.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Plano Nacional de Agroenergia: 2006-2011, Brasília: Embrapa, 110 p. 2006,

MARTINS, E.O. Ciência e Tecnologia: a natureza de suas relações com a inovação tecnológica e a globalização. In: *Revista de Administração Pública*, v. 30, p.22-3,1996.

MATOS, A. K. M. G. et al. Morfometria de Cachos, Frutos e Sementes de *Attalea maripa* (Aubl.) Mart: uma Espécie Nativa da Amazônia Potencial para Produção de Biodiesel. *Revista Brasileira de Agroecologia*. v.4, n. 2. p.1285-1289. 2009.

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

MIRANDA, I. P. A. et al. Frutos de Palmeiras da Amazônia. Manaus-AM: Creative, v.1. 120p. 2001.

MIRANDA, I. P. A. et al. Ecossistemas florestais em áreas manejadas na Amazônia. Manaus, 305p. 2003.

MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A. Guia de identificação das palmeiras de Porto Trombetas-PA. Manaus: EDUA/INPA, 365p. 2008.

MIRANDA, I. P. A. Recuperação da terra devastada: variedades resistentes se multiplicam em áreas de queimadas e de pastagens, antes cobertas por florestas primárias. Edição especial *Scientific American Brasil*, v.2, p.50-51, 2008.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E DO COMÉRCIO-MIC. Produção de Combustíveis Líquidos a Partir de Óleos Vegetais. Secretaria de Tecnologia Industrial, Coordenadoria de Informações Tecnológicas, Brasília-DF, 1985.

MOTA, R. V.; FRANÇA, L. F. de. Estudo das características da Ucuuba (*Virola surinamensis*) e do Inajá (*Maximiliana regia*) com vistas à produção de biodiesel. *Revista Científica da UFPA*, v.06. 2007.

NASCIMENTO, J. E.; DALLAN, J. C. F. O consumo e a produção de biodiesel e a necessidade de ações mitigadoras de efeito estufa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL-BIODIESEL: COMBUSTÍVEL ECOLÓGICO, Varginha. Anais... Lavras: UFLA, v.4, p.73-83. 2007

NEVES, A. A. S. Avaliação do aproveitamento de óleos alimentares para produção de biodiesel na área metropolitana do Porto. Dissertação (Mestrado em Energias Renováveis), Universidade do Porto, 296p. 2008.

NIKIFORUK, A. Oil Disquiet on the Western Front. *The Globe and Mail*. 2008.
NÚCLEO DE ASSUNTO ESTRATÉGICAS DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Biocombustíveis. Brasília, n. 2, 2005.

Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M.; Haral, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J. D.; Sussman, J. L.; Verschueren, K. H.; Goldman, A.; *Protein Eng.* 1992, 5, 197.

OZDEMIR, F.; TOPUZ, A. Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry*, v.86, p.79–83, 2004.

OTERO, L. E. S. Limites e potencialidades do tucumã como fonte de energia para regiões isoladas da Amazônia. Dissertação (Mestrado em Tecnologia) Universidade de Brasília, 79p. 2012.

PESCE, C. Oleaginosas da Amazônia. 1ª Ed. Belém: Ol. Graf. Da Revista de Veterinária, 123p. 1947.

PETERSEN, M. T. N., FOJAN, P., PETERSEN, S. B., 2001, "How do Lipases and Esterases Work", Journal of Biotechnology, v. 85, pp. 115-147.

PETERSEN, S. B. Em Engineering of with lipases; Malcata, F. X., ed.; Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, 1996, p. 125.

PIRES, H. C. G. Fenologia reprodutiva de *Attalea maripa* (Aubl.) Mart. (inajá) (Arecaceae) em sistema silvipastoril no nordeste paraense. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Universidade Federal Rural da Amazônia, p.63, 2011.

PONTING, C. Uma história verde do mundo. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1995.

PROGRAMA BRASILEIRO DE BIO-COMBUSTÍVEIS – Probiodiesel, MCT-SPTE, Abril, 2012.

PUPO, M. M. S. et al. Produção de biodiesel via hidroesterificação utilizando catalisadores ácidos. Universidade Federal de Sergipe, 2010.

RABELO, I. D.; Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil, 2001.

RAMOS, L.P. Conversão de óleos vegetais em combustível alternativo ao diesel convencional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA. Londrina. Anais...Londrina: EMBRAPA-Soja, p.233-236. 1999.

RAMOS, L.P. ET AL. Biodiesel: Um Projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. Revista Biotecnologia & Desenvolvimento, São Paulo, v.31, 2003.

RAMOS, L. P.; WILHELM, H. M. Current status of biodiesel development in Brazil Appl. Biochem. Biotechnol., v.121, p.807, 2005.

RAMOS, S. L. F. et al. Técnicas para facilitar a germinação as sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer). Comunicado Técnico 77, Embrapa-Manaus, 2009.

RAMOS, L. P. et al. Tecnologias de produção de biodiesel. Revista Virtual Quim., v.3, p.385-405, 2011.

RATHMAN, R.; SILVEIRA, S. J.C.; SANTOS, O.I.B. 2008. Governança e configuração da cadeia de biodiesel no Rio Grande do Sul, Revista Extensão Rural, DEAER/CPGExT, CCR, Universidade Federal de Santa Maria. Ano XV, 69-101.

REVILLA, J. Plantas úteis da bacia amazônica. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 444 p. 2002.

RETALLACK DM, JIN H, CHEW L. Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. Protein Expr. Purif. 81:157–165, 2012.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. Química de Alimentos, São Paulo: Edgard Blücher: Instituto Mauá de Tecnologia, 184p. 2004.

RICHETTI, A. Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 101p. 2009.

ROBINSON, M.L. Cultivated Palm Seed Germination. Cooperative Extension Bulletin. University of Nevada. 1991. Disponível em: <<http://www.tahoe.unr.edu/pubs/Default.aspx>> Acesso em janeiro de 2013.

ROCHA, L.L.L. et al. Production of Biodiesel by a Two-Step Niobium Oxide Catalyzed Hydrolysis and Esterification. Letters in Organic Chemistry, v.7, p.571-578, 2010.

RODRIGUES, A. M. C. et al. Estudo da potencialidade de três oleaginosas Amazônicas para a produção de Biodiesel. Documentos de Congresso, p.345-350, 2006.

RODRIGUES, R. C. Síntese de Biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 183p. 2009.

SACHS, I; Estratégias de Transição para o Século XX – Desenvolvimento e meio ambiente, Studio Nobel, Fundação do Desenvolvimento Administrativo, São Paulo, 1993.

SACHS, I. A. Revolução energética do século XXI. In: Dossiê energia. Estudos Avançados, São Paulo, v. 21, n. 59, p. 1-382, 2007.

SACHS, I. Bioenergias: uma janela de oportunidades. In: Abramovay, R. (org.). Biocombustíveis: energia da controvérsia. São Paulo: Editora Senac, p.99-132. 2009.

SANTOS, A. M. Análise do Potencial do Biodiesel de Dendê para Geração Elétrica em Sistemas Isolados da Amazônia. Dissertação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, 224p. 2008.

SALM, R. Densidade do caule e crescimento de *Attalea maripa* e *Astrocaryum aculeatum*: implicações para a distribuição de palmeiras arborescentes na floresta Amazônica. Biota Neotropica. v.4, 11p. 2004.

SALM, R. A. A importância das palmeiras arborescentes de grande porte na dinâmica das florestas amazônicas sazonalmente secas. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos. São Carlos: UFSCar, 225p. 2005.

SANTOS, N. M. Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel: Um olhar sobre a Região Norte. Dissertação. Faculdade de Tecnologia e Ciências. Salvador-Bahia, 87p. 2011.

SCHUCHARDTA, U.; RIBEIRO, M. L.; GONCALVES, A. R. Química Nova, v.24, p. 247-251, 2001.

SERRUYA, H.; BENTES, M.H.S.; SIMÕES, J.C.; LOBATO, J.E.; MULLER, A.H. & ROCHA FILHO, G.N. Análise dos óleos dos frutos de três palmáceas da Região Amazônica. In: Congresso Brasileiro de Química, 20, Recife. Anais. Belém: UFPa, Depto. de Química, v.1, p.1-6, 1979.

SHANLEY, P.; SERRA M.; MEDINA, G. Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Belém, PA: CIFOR: Embrapa Amazônia Oriental: IMAZON, 304p. 2010.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM DO COOPERATIVISMO -Sescoop. A inserção das cooperativas no processo de produção de biodiesel. A experiência do sistema cooperativista. Série Desenvolvimento em Cooperativa, 2008.

SILVA, V. P.; MELO, Z. L. O.; MIRANDA, I. P. A.. Influência do armazenamento e da temperatura na germinação de sementes de Maximiliana maripa (Aublet) Drud. In: II Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq e PAIC/FAPEAM, Manaus. Anais do II Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq e PAIC/FAPEAM. p. 1-4. 2013.

SILVA, P.; FREITAS, T. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, p.843-851, 2008.

SIMOES, B. S.; MELO, Z. L. O.; MIRANDA, I. P. A. Influência do substrato na germinação e no vigor de sementes de Maximiliana maripa (Aublet) Drud. In: I Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq e PAIC/FAPEAM, Manaus. Anais do I Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq e PAIC/FAPEAM, p.1-4, 2012.

SIMOES, B. S.; MELO, Z. L. O.; MIRANDA, I. P. A. Composição e mobilização de carboidratos e proteínas em sementes de Maximiliana maripa Alblet (Drude) Arecaceae. In: XX Jornada de Iniciação Científica do INPA - PIBIC/PAIC, Manaus. Anais da XX Jornada de Iniciação Científica do INPA - PIBIC/PAIC. p.1-4, 2011.

SOUSA, J. S. et al. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis*, v.65, p.133-137, 2010.

SOUZA, L. T. A. Síntese enzimática do biodiesel de *Jatropha curcas* pela rota etílica. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2010.

SOUZA, M. A. A. Especificação técnica do biodiesel. In: CÂMARA, G. M. S. & HEIFFIG, L. S. (coord.): Agronegócio de Plantas Oleaginosas: Matérias-Primas para Biodiesel. Piracicaba:ESALQ. p.7 – 23, 2006.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 7º aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. *Revista Química Nova*. v.30, p.2068-2071, 2007.

SUAREZ, P. A. Z. et al. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, v. 32, n.3, p.2068-2071, 2009.

SYLVESTER-BRADLEY, C. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadoras de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazônica*, v.12, p.15–22, 1982.

TALUKDER, M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P. L. Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification. *Energy & Fuels*, v.24, p.2016–2019. 2010.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, n.1, p.17-23, 2004.

TAPANES, N. C. et al. BIODIESEL NO BRASIL: MATÉRIAS PRIMAS E TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO. *Acta Scientiae e Technicae*, v.1, n.1, 2013.

TECBIO. Disponível no site:<<http://www.tecbio.com.br/BiodieselnoBrasil>> Acessado em agosto de 2013.

TEIXEIRA, E. L. Produção de biodiesel através da hidroesterificação do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) via catálise heterogênea ácida. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Pará, Belém, 88p. 2011.

TEIXEIRA, R. E. Energy-efficient extraction of fuel and chemical feedstocks from algae. *Green Chemistry*, v.14, p.419-429, 2012.

UNIÃO BRASILEIRA DE BIODIESEL - UBRABIO. O biodiesel e sua contribuição ao desenvolvimento brasileiro. Fundação Getúlio Vargas, São Paulo, 34p. 2010.

_____. O combustível da sustentabilidade. Fundação Getúlio Vargas, São Paulo, 30p. 2009.

_____. Revista Institucional. O Combustível da Sustentabilidade. O Combustível ecológico que mudou a matriz energética. Brasília- DF, 17p. 2009.

USDA, Estimating the Net Energy Balance of Corn Ethanol. Report by Shapouri, H., Duffield, J.A., Graboski, M.S. U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, Office of Energy. Agricultural Economic Report n.72, 1995.

VALOIS, A.C.C. RECURSOS GENÉTICOS DE PALMEIRAS. 2008.

VECHIA, R. O meio ambiente e as energias renováveis: instrumento de liderança visionária para a sociedade sustentável. Barueri SP, Manole: Minha Editora, 2010.

VYAS, A. P.; VERMA, J. L.; SUBRAHMANYAM, N. A review on FAME production processes. *Fuel*, v.89, p.1–9, 2010.

Willis, W. M.; Maragoni, A. G.; *Biotechnol. Genetic Eng. Rev.* 1999, 16, 141.

WILLERDING, A.L. ; OLIVEIRA, L. A.; MOREIRA, F.W.; GERMANO, M.G.; CHAGAS, Jr., A.F. “Lipase Activity among Bacteria Isolated from Amazonian Soils,” *Enzyme Research*, 2011.

WILLERDING, A. L., CARVALHO NETO, F. G. M. R., GAMA, A.M., CARIOCA, C. R.F., OLIVEIRA, L. A. Hydrolytic activity of bacterial lipases in amazonian vegetable oils. *Química Nova*, v.35, p.1782-1786, 2012.

WINKLER, U. K., STUCKMANN, M. (Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*) *Journal of Bacteriology*, 1979, v.138, p. 663 - 670.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.; *Enzyme Microb. Technol.* 1998, 23, 438.

ZAGONEL, G. F. Obtenção e caracterização de biocombustíveis a partir da transesterificação etílica em meio alcalino. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná-Curitiba, 2000.

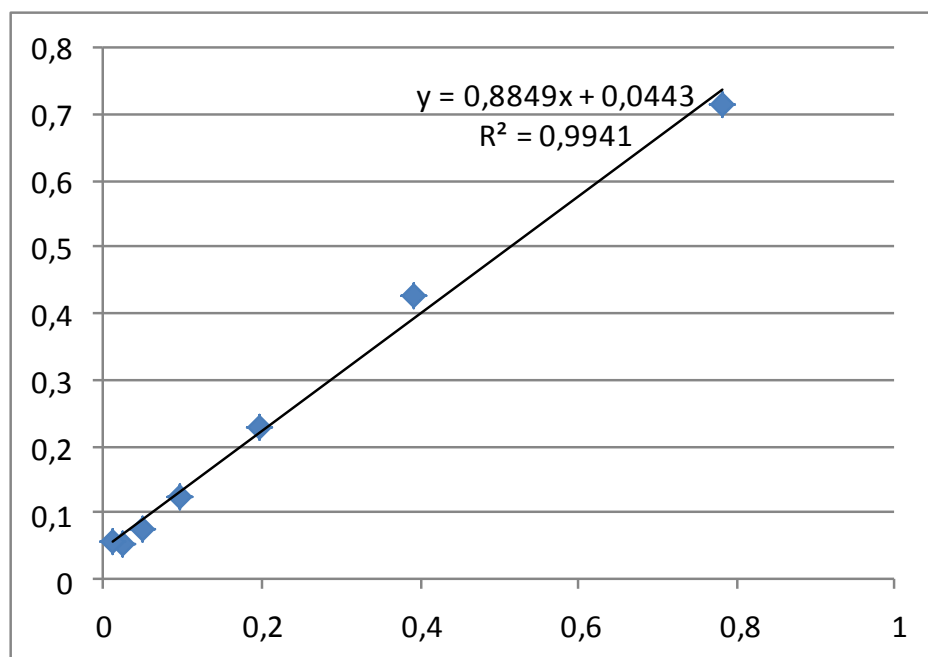
ANEXO A – Teste de Tukey para hidrólise de p-nitrofenil laurato ([p-NP] $\mu\text{mol.mL}^{-1}$) dos isolados testados em 37 °C (média de três repetições).

Isolados	Média (dp)	Tukey (p<0,05) (DMS = 13,52)
LIP B17	129 (7,2)	a
LIP B8	115 (11,0)	b
LIP 67	105 (16,3)	b
LIP 93	66 (6,9)	c
LIP B10	21 (7,3)	d
LIP B16	20 (2,1)	d
LIP B12	16 (6,7)	d
LIP 86	16 (10,6)	d
LIP 89	11 (5,2)	d

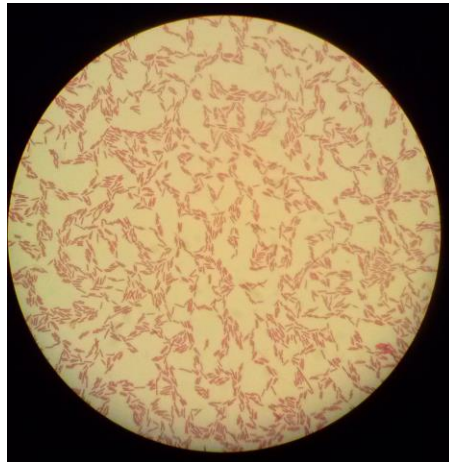
ANEXO B – Avaliação dos efeitos da variação do pH sobre a atividade lipásica (U/mL) e atividade específica (U/mg) da preparação de LIPB17.

Atividade lipásica (U/mL)				
Lipase	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5
LIPB17	12,7	37,7	127,92	311,74
Atividade específica (U/mg)				
Lipase	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5
LIPB17	349,8	1038,5	3523,4	8587,8

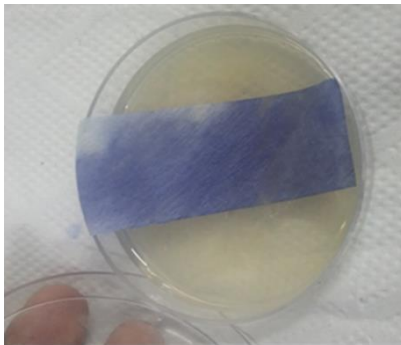
ANEXO C – Reta padrão do p-NP



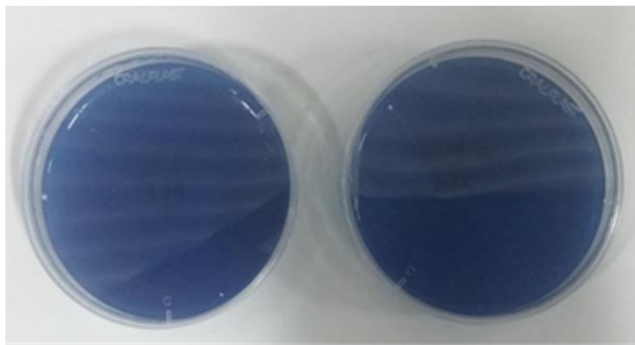
ANEXO D – Resultados dos testes de Gram, citrato e oxidase da LIPB17



Bactéria LIPB17: Bacilo, Gram-negativo



Bactéria LIPB17: Citocromo
Oxidase (+), tiras na cor
purpura.



Bactéria B17: Citrato (+), cor azulada.

ANEXO E – Resultado da análise molecular do isolado LIPB17

Amostra LIPB17

```
> 7_G01.ab1 (View 7_G01.acf electropherogram) / View 7_G01.ab1 list with score
GCCCCAACGGGCGGTAGACGGCGTCA TGAACA CAGCAATTA TTTTATTAT GGNTGTTAGTGTAGAA GGTGGTTGT TA
AGTTAAGTGTGCCCTTCGGGC TCAACCTGGGAACTGCA TTTGA AACTGGCAAGCTCTA GTCTCGTAGAGGGGGGTAGA A
TTCCA GGTGTA GCGGTGA AATGCGTAGA GATCTG GAGGA ATA CC GGTGGCAA GGCGGCCCTG GACGA A GA CTGA CG
CTCA GGTGCCA AAGCG TGGGGAGCAA A CAGGATTAGA TACCTGGTA G TCCA CGCTG TAA A CGA TGTGCA TTTGGAG GT
TGTGCCCTTGA G GCG TGGCTT CCG GA GCTAA CCGCT TA A TCGA CGCCTG GGGTA CGG CCG CAA GGTAA AA A CTCA A
A TGA ATTGAC GGGGGCCGCA CAA GCG GTGGAG CA TGT GGTTA A TCGA TG CA A CG CAA GAA CCTACCTACTT GA
CATCCAGA GA A CTTTCA GAGA TGGATTGGT G CCTTCGGGA A CTCTGA GACA GGTGCT GCA TGGCTGCTG CAG CTGGTG
TTG TGA A ATGTTGGGTTA AGTCCCGCA A CGA GCG CAA CCCT TATC TTTGTT G CCA GCG GT T CGGCCGG GAA CTCA AA GG
A GA CTGCCAGTGATA AA CTGGA GGA A GGTGGGA TGA CGTCAA GTCA TCA TGG CCCTTACGA GTA GG GCTA CACA C CG
CTACA ATGGCGTATA CAA AGA GA A GCGA CCTCGGAGA GCA A GCGGA CCTCATA A AGTACGTGTA GT CCG GATTG GA GT
CTGCCACTCGA CTCCA TGA A GTCGAA TCGTAGTAA TCGA AGATCA GA A TCTA CGGGTGA ATA CTTT CCGGGGCT
TTGTA CCA CACCC CCGCTCA CCA CCA A GGGG GAGATG GGTG GCA AA A AGA AA ATTA A GGTA A GCTTTTAA A A CCG
TTTTGGGGGA A A GGGGGCCCCCTTA ACCCCCA CCTTTT TTTGT
```

NCBI BLAST+ Results for job ncbiblast-l20150917-175139-0345-53074500-es

Align	DBID	Source	Length	Score	Identities %	Positives %	E (-log ₁₀ (P))
2	EM_PROXP7733015	<u>Pseudomonas fluorescens strain KC30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u> Cross-references and related information in: Nucleotide sequences Samples & ontologies	1399	743	99.5	99.5	0.0
3	EM_PROEP694573	Pseudomonas fluorescens strain yj 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Cross-references and related information in: Nucleotide sequences Samples & ontologies	1443	743	99.5	99.5	0.0
4	EM_PROXR063201	Serratia marcescens strain B521 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Cross-references and related information in: Nucleotide sequences Samples & ontologies	1445	742	99.5	99.5	0.0
5	EM_PROXP345289	Serratia sp. DH14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Cross-references and related information in: Nucleotide sequences Samples & ontologies	1453	742	99.5	99.5	0.0
6	EM_PROXP273914	Bacterium FJAT-17796 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Cross-references and related information in: Nucleotide sequences Samples & ontologies	1433	742	99.5	99.5	0.0
7	EM_PROXP241785	Serratia marcescens strain LB1-AD-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Cross-references and related information in: Nucleotide sequences Samples & ontologies	1427	742	99.5	99.5	0.0
8	EM_PROXP064321	Pseudomonas fluorescens strain SGA3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Cross-references and related information in: Nucleotide sequences Samples & ontologies	958	742	99.5	99.5	0.0
9	EM_PROXP064440	Serratia antinomothia strain C78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1411	742	99.5	99.5	0.0