Universidade Federal do Rio de Janeiro

Escola de Química

Programa de Pós –Graduação em Processos Químicos e Bioquímicos

PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS POR *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 A PARTIR DE GLICEROL BRUTO PROVENIENTE DO BIODIESEL DE SOJA

Autora: Jamille Ribeiro Coelho de Lima

Rio de Janeiro
2014

JAMILLE RIBEIRO COELHO DE LIMA

PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS POR *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 A PARTIR DE GLICEROL BRUTO

Orientadora: Dra. Francisca Pessoa de França
Co–Orientadora: Dra.Léa Maria de Almeida Lopes

EQ/UFRJ

Lima, J.R.C./Fevereiro 2014

JAMILLE RIBEIRO COELHO DE LIMA

PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS POR *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 A PARTIR DE GLICEROL BRUTO

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Jamille Ribeiro Coelho de
.
Produção de bioprodutos por Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50678 a partir de glicerol bruto/ Jamille Ribeiro Coelho de Lima.- 2014
xx, 132 f.:il

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2014.

Orientadoras: Francisca Pessôa de França e Léa Maria de Almeida Lopes
1. Biossurfatante. 2. Bioprodutos. 3. Produção. 4. Glicerol. 5. Planejamento de experimentos. 6. *Yarrowia lipolytica*. 7. Biodiesel. – Teses. I. França, Francisca Pessôa de. (Orient.). II. Lopes, Léa Maria de Almeida (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos
Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

JAMILLE RIBEIRO COELHO DE LIMA

PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS POR *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 A PARTIR DE GLICEROL BRUTO

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Prof.ª Dr.ª Francisca Pessoa de França- EQ/UFRJ

Dr.ª Lea Maria de Almeida Lopes- IMA/UFRJ

Banca examinadora:

Prof.ª Dr.ª Eliana Barreto Bergter- IMPG/UFRJ

Dr. Walter B. Cravo Junior- INT

Dr. Fernando Jorge Santos- Petrobrás

Prof.ª Dr.ª Cheila Gonçalves Mothe- EQ/UFRJ

Prof. Dr.Luiz Fernando Leite- EQ/UFRJ

Rio de Janeiro, fevereiro de 2014

“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria, aperta daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente,
é coragem...”
(Guimarães Rosa)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Jamil e Nancy, que sempre investiram na minha educação, acreditando em mim. Pais estes que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me ajudando a crescer. Pessoas que sempre poderei contar.

A minha irmã que sempre me apoia e me da força. Sempre esta disponível a escutar minhas histórias e ceder seu ombro. Aos meus familiares que torceram por mim.

As minhas orientadoras, Prof. Francisca Pessoa de França e Lea Maria de A. Lopes, pela autonomia, infra-estrutura e orientação conferida para execução de todas as etapas deste trabalho.

A prof. Elina Flávia pelo apoio e por todo carinho garantido dentre e fora dos pilares da universidade. Pessoa extraordinária que guardarei para sempre em meu coração.

Ao amigo botafoguense, Paulinho pelo carinho e aos amigos Tom e Neumara pelas trocas de informação nos momentos de inquietação.

As minhas grandes amigas Mariana e Bárbara, pelas palavras de carinho, pelos incentivos e pelo exemplo.

Aos amigos de laboratório que hoje se tornaram pessoais e que não posso mais viver sem. Pessoas que tornaram essa jornada mais leve e agradável: Milton, Gustavo, Dill, Caduzinho, Nat, Virgínia, Renata. Passamos juntos por bons e maus momentos, mas sempre juntos, sempre uns apoiando os outros. Posso dizer que se hoje conquisto mais um degrau, o mérito também é de vocês, não suportaria sem a presença de todos, dos almoços, dos encontros e de todo os bons momentos de descontração.

Ao meu amigo Di que continua fazendo parte dos meus agradecimentos, o meu muito obrigado por tudo, mas que um amigo um companheiro dedicado, disposto sempre a estar por perto em qualquer ocasião. E também ao Ulrich, por todo carinho e dedicação, na busca incansável de me tornar uma pessoa melhor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

LIMA, Jamille Ribeiro Coelho de. Produção de bioprodutos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 a partir de glicerol bruto. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

RESUMO

Em razão das conseqüências ambientais negativas, relacionadas à queima de combustíveis fósseis bem como às preocupações sobre o abastecimento de petróleo, a busca por combustíveis renováveis, também conhecidos por biocombustíveis, tem sido estimulada. Como resultado, diversas pesquisas desenvolveram novos biocombustíveis, comercialmente atrativos, dentre ele o biodiesel. Compostos não derivados de petróleo devem ser considerados como alternativas em potencial, particularmente quando exibem algumas características, por exemplo, competitividade com motores e socialmente aceitos. A partir de matérias-primas simples, como óleos comestíveis e não-comestíveis, o biodiesel é produzido através do processo de transesterificação, gerando glicerol bruto como principal coproduto de valor agregado. Dada sua natureza biodegradável, o glicerol bruto pode ser assimilado por diversos micro-organismos, dentre eles a levedura Y*arrowia lipolytica.* Neste estudo foi realizado um planejamento experimental 3^3 completo, utilizando a levedura desenvolvida em meio mineral contendo glicerol bruto como única fonte de carbono, incubada sob agitação de 200 rpm em agitador orbital e em fermentador, visando a obtenção de bioprodutos (biossurfatante e ácidos graxos). Os parâmetros investigados no primeiro caso foram: a concentração inicial de biomassa, a concentração inicial de glicerol e o pH, enquanto as variáveis independentes nos testes em fermentador foram a produção de biomassa, a diminuição da tensão superficial e o índice de emulsificação em QAV. Foi realizada a caracterização físico-química dos biossurfatantes impuro e parcialmente purificado, bem como testes quantitativos e qualitativos nos lipídios sintetizados. Com aproximadamente 96 horas de processo observou-se a ocorrência máxima de biossurfatante, não liberado extracelularmente, obtendo-se uma redução de tensão superficial de 72 para 34,2 mN/m no meio de cultivo. A atuação deste biossurfatante na sua forma bruta foi estável quando submetido à temperatura de 100°C. O composto também contribuiu para a remoção de 99% do óleo diesel em solo franco-argiloso, na concentração micelar crítica de 7g/L. Adicionalmente, os ácidos graxos foram sintetizados em 72 h, registrando a maior concentração de 2,7g/L de lipídio total. Ácidos oleico, esteárico e palmítico foram identificados, sendo a síntese do primeiro de maior significância (55 %). Os bioprodutos sintetizados claramente possuem potencial econômico já que podem ser aplicados em diferentes processos industriais, incluindo a indústria do petróleo, bem como alimentícia.

LIMA, Jamille Ribeiro Coelho de. Produção de bioprodutos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 a partir de glicerol bruto. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

ABSTRACT

Because of the negative, related to the burning of fossil fuels and concerns about oil supplies, the search for renewable fuels , also known as biofuels , environmental consequences have been stimulated . As a result, many researches have developed new biofuels commercially attractive, among them the biodiesel. Compounds petroleum should not be considered as potential alternatives, particularly when exhibit certain characteristics, for example, competition with engines and socially acceptable . From simple materials such as edible and non - edible oils , biodiesel is produced through the transesterification process, generating crude glycerol as the main value-added coproduct. Given its biodegradable nature, the crude glycerol can be assimilated by many micro -organisms , including the yeast Yarrowia lipolytica . In this study an experimental design was carried out 33 full, using the yeast developed in mineral medium containing crude glycerol as sole carbon source, incubated under agitation at 200 rpm in an orbital shaker and fermenter in order to obtain bio-products (biosurfactant and fatty acids). The parameters investigated were the first case: the initial biomass concentration of the initial glycerol concentration and pH as the independent variables in the fermentor tests were biomass production, decrease the surface tension and the emulsifying index in jet fuel. Physicochemical characterization of crude and partially purified biosurfactant was performed as well as quantitative and qualitative tests on synthesized lipids . With approximately 96 hours of process observed occurrence of the maximum biosurfactant not released extracellularly , resulting in a reduction in surface tension from 72 to 34.2 mN/m on the medium. The activities of this biosurfactant in its raw form was stable when subjected to a temperature of 100°C. The compound also contributed to the removal of 99 % of diesel oil in clay loam soil, the critical micelle concentration of 7 g / L. Additionally, the fatty acids were synthesized in 72 h , recording the highest concentration of 2.7 g / L of total lipid. Oleic, stearic and palmitic acids were identified, the first synthesis of greater significance (55 %). The bioproducts synthesized clearly have economic potential as it can be applied in different industrial processes , including the oil industry , as well as food.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma de produção de biodiesel 11
Figura 2 - Estrutura química da glicerina (A), glicerina bruta(B) e glicerina pura(C). 17
Figura 3- Principais vias do metabolismo microbiano do glicerol 21
Figura 4- Representação esquemática da atuação do surfatante 27
Figura 5- Formação do agregado micelar 28
Figura 6: Biossíntese de lipídios 33
Figura 7- Formação de ácidos graxos insaturados por micro-organismos 35
Figura 8- Representação da camada Pré-sal 38
Figura 9- Aspecto da emulsificação do querosene de aviação 53
Figura 10- Fermentador utilizado no experimento, capacidade de 3L, modelo Bio Flo/ Celligen 115, New Brunswick Scientific (New Jersey, EUA). 56
Figura 11- Resumo do processo para identificação de lipídios 62
Figura 12- Aspectos morfológicos da *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 vista por microscopia óptica- aumento de 1000 vezes 65
Figura 13- Produção de biomassa (g/L), lipídio (g/L) e consumo de glicerol (g/L) por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 66
Figura 14- Gráfico de Superfície de Resposta da interação biomassa /pH; resposta crescimento celular 69
Figura 15- Diagrama de Pareto; Variável Índice de Emulsificação 72
Figura 16- Gráfico de contorno da interação pH/concentração inicial de glicerol; resposta índice de emulsificação. 73
Figura 17- Gráfico da diminuição da Tensão Superficial por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 75
Figura 18 - Diagrama de Pareto;variável Diminuição da Tensão Superficial. 76
Figura 19- Diagrama de Pareto,Variável: Consumo de Glicerol 78
Figura 20 – Parâmetros estudados em função da concentração de oxigênio dissolvido para *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678. 82
Figura 21- Extratos de bissurfatante seco por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 86
Figura 22- Tensão superficial em função da concentração do 87

biossurfatante impuro.
Figura 23- Efeito das concentrações de CaCO3 no índice de emulsificação do querosene de aviação para soluções 7,0 g/L do biossurfatante impuro e parcialmente purificado 88
Figura 24- Efeito da alta temperatura no índice de emulsificação do QAV pelos extratos de biossurfatantes impuro e parcialmente purificado 89
Figura 25- Efeito da autoclavagem no índice de emulsificação do querosene de aviação por soluções a 7,0 g/L do biossurfatante bruto e parcialmente purificado. 90
Figura 26- Índice de emulsificação de diferentes matérias-primas pela solução a 7,0g/L de biossurfatante puro e impuro 91
Figura 27- Diagrama de Pareto do efeito da salinidade e temperatura em relação ao índice de emulsificação em QAV. 93
Figura 28 – Curvas termogravimétricas do extrato de biossurfatante impuro (a) e parcialmente purificado (b). 95
Figura 29- Gráfico comparativo entre as duas curvas termogravimétricas do extrato impuro(a) e parcialmente purificado(b). 97
Figura 30- Espectrofotometro na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do extrato impuro e parcialmente purificado sintetizado por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678. 98
Figura 31- Placas de TLC com marcação dos triglicerídios 101
Figura 32- Resultados da extração e purificação do extrato lipídico bruto para a obtenção de triglicerídeos purificados 102
Figura 33- Cromatograma nos diferentes tempos com o percentual dos ácidos graxos sintetizados pela *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 104
Figura 34- Resultado do MS- referente aos ácidos palmítico (a), esteárico (b) e oleico (c). 106
Figura 35- Estruturas selecionadas para determinação dos ácidos graxos 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Percentual das matérias-primas utilizadas para a produção de Biodiesel por região do Brasil 14
Tabela 2 - Comparação na produção de biodiesel a partir de algas e vegetais 16
Tabela 3 – Principais produtos da fermentação do glicerol bruto 21
Tabela 4- Principais surfactantes de origem natural e sintética. 25
Tabela 5 - Classificação dos biossurfatantes produzidos por diferentes micro-organismos. 26
Tabela 6 - Caracterização das amostras de glicerol bruto e glicerol PA 48
Tabela 7 – Matriz do planejamento experimental com seus respectivos valores absolutos e codificados 50
Tabela 8 - Características das análises cromatográficas para os diferentes substratos. 55
Tabela 9- Planejamento experimental em relação ao índice de emulsificação em diferentes temperaturas e concentrações de NaCl. 58
Tabela 10- Ensaio de tolerância ao cálcio 58
Tabela 11- Produção de ácidos orgânicos por *Yarrowia lipolytica* e tensão superficial (mN/m) do meio de cultivo 64
Tabela 12- Crescimento celular da *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 no tempo de processo 68
Tabela 13- Índice de emulsificação em querosene de aviação (E_{24}) no tempo de processo 71
Tabela 14- Diminuição da Tensão superficial (DTS) no tempo de processo de 48 horas. 74
Tabela 15 – Glicerol residual nos intervalos do processo 77
Tabela 17- Respostas máximas no tempo de 48 horas de processo 79
Tabela 18- Produção de biossurfatante por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 em diferentes temperaturas 81
Tabela 19- Crescimento e produção de bioemulsificante em função da agitação por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 em glicerol bruto. 83
Tabela 20- Índice de emulsificação em querose de aviação em soluções com diferentes características 84
Tabela 21- Resultado da influência do cloreto de sódio nas soluções de biossurfatante impuro e parcialmente purificado. 92

Tabela 22- Dados quantitativos relacionados à produção de lipídios por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 100
Tabela 23- Principais fragmentos dos diferentes ácidos graxos presente na amostra 105
Tabela 24- Porcentagem lipídica e perfil dos ácidos graxos em leveduras 108

Lista de Quadros

Quadro 1 – Algumas matérias-primas usadas para a produção de biodiesel. 13
Quadro 2- Aplicações dos biossurfatantes 29

Sumário

Capítulo 1 – Introdução 1

Capítulo 2 – Objetivos 5

- Objetivo geral 5
- Obejtivos específicos 5

Capítulo 3 – Levantamento bibliográfico 7

3.1. Biodiesel 7

3.2. Glicerol 16

3.3. Glicerol como co-produto do biodiesel e suas possíveis aplicações 18

3.4. Surfactantes e biossurfactantes 23

3.5. Lipídeos microbianos 31

3.5.1. Ácidos graxos insaturados 35

3.6. Aplicações industrias para os biossurfatantes: Recuperação Melhorada de Petróleo 37

3.6.1. Métodos de Recuperação de Petróleo 39

3.7. Planejamento Experimental 41

3.8. Yarrowia sp. : Aspectos gerais 42

3.8.1. Yarrowia lipolytica 43

Capítulo 4 – Materiais e métodos 47

4.1. Matérias-primas 48

4.2. Seleção das linhagens 49

4.3. Produção de biossurfatante 49

4.4. Determinações analíticas 52

4.4.1. Determinação do teor de glicerol residual 52

4.4.2. Determinação do índice de degradação do glicerol 53

4.4.3. Índice de emulsificação 53

4.4.4. Tensão superficial 54

4.4.5. Determinação do peso seco da biomassa 54

4.4.6. pH 54

4.4.7. Análises Cromatográficas 54

4.5. Experimentos relacionados à agitação, temperatura e oxigênio dissolvido 55

4.6. Extração do Biossurfatante 56

4.7. Purificação 56

4.8. Caracterização do Biossurfatante produzido por análises qualitativas e quantitativas 57

4.8.1. Determinação da Concentração Micelar Crítica 57
4.8.2. Determinação do Índice de Emulsificação em Diferentes Temperaturas e Concentrações de NaCl 57
4.8.3. Ensaio de tolerância ao cálcio 58
4.8.4. Ensaio de índice de emulsificação em diferentes matérias-primas 59
4.8.5. Análise Termogravimétrica (TGA) 59
4.8.6. Análise espectrofotométrica na região do infravermelho com transformada de Fourrier (FTIR)
4.9. Aplicação do biossurfatante em solo contaminado com compostos hidrofóbicos 60
4.10. Extração de lipídios totais 61
4.10.1. Fracionamento dos Triglicerídios 61
4.10.2. Identificação dos lipídios 62
Capítulo 5- Resultados e discussão 63
5.1 Seleção da linhagem de Yarrowia lipolytica 63
5.2. Experimentos em shaker para avaliação da condição ótima para produção do biossurfatante 67
5.2.1. Crescimento celular da Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50678 67
5.2.3. Índice de emulsificação em querosene de aviação (QAV) 70
5.2.4. Diminuição da Tensão superficial (DTS) 73
5.2.5. Consumo de glicerol por Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50678 77
5.3. Fase II: experimentos em fermentador para análise de variáveis 80
5.4. Síntese do biossurfatante por Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50678 em função dos melhores valores dos parâmetros estudados 83
5.5.Caracterização do Biossurfatante sintetizado por Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50678 85
A) Características 85
B) Concentração Micelar Crítica 86
C) Tolerância ao cálcio 87
D) Estabilidade em altas temperaturas 89
E) Índice de emulsificação de diferentes produtos 90
F) Estabilidade em diferentes salinidades relacionada à temperatura 92
5.6. Análises instrumentais 94
A) Análise Termogravimétrica (TGA) 94
B) Análise espectrofotométrica na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 97

5.8. Aplicação do biossurfatante impuro em solo contaminado com compostos hidrofóbicos 99
5.9. Extração de lipídios 100
Capítulo 6- Conclusões 110
6.1 Observações 111
6.2 Sugestão para trabalhos futuros 112
Capítulo 7- Referência bibliográfica 113
Anexo1 132
Anexo 2 140

Capítulo 1

Introdução

Em razão das conseqüências ambientais negativas, relacionadas à queima de combustíveis fósseis e as preocupações sobre o abastecimento de petróleo têm se estimulado a procura por combustíveis renováveis, também conhecidos como biocombustíveis. A cada ano o consumo de energia aumenta e as reservas de petróleo diminuem, mesmo com as recentes descobertas do combustível na camada do pré-sal. Ressaltam-se os possíveis problemas ambientais decorrentes a exploração, transporte e queima deste combustível. Além disso, há o problema político, representado por cada ameaça de crise internacional, que faz o preço do barril de petróleo disparar (CANDEIA, 2008; FERRARI, 2005).

O termo biocombustível refere-se aos combustíveis líquidos ou gasosos, produzidos predominantemente a partir de uma biomassa que pode ser de

origem vegetal ou de outras fontes, tais como algas, gordura animal e leveduras (BILICH et al., 2006, DERMIBAS, 2003).

Os biocombustíveis apresentam-se como fontes renováveis que irão suplementar ou substituir os atuais combustíveis, principalmente porque estes compostos são ambientalmente corretos, isto é, participam do ciclo do carbono. Outra importante vantagem está no seu potencial econômico, uma vez que se tornará mais competitivo em relação ao preço do barril de petróleo em um futuro não muito distante. É importante salientar outros benefícios dos biocombustíveis, tais como, sustentabilidade, desenvolvimento regional e social, diminuição da emissão dos gases de efeito estufa e desenvolvimento da agricultura (REIJNDERS, 2006, CÁRDENAS et al., 2006).

O biodiesel é um biocombustível produzido a partir de óleos e gorduras, vegetais ou animais. Em virtude das estruturas moleculares pouco ramificadas, alguns óleos naturais podem ser utilizados como combustíveis devido ao seu alto poder calorífico, cerca de 80% em relação ao diesel de petróleo. A produção deste biocombustível a partir de óleos e gorduras rende grande quantidade de glicerina bruta, também denominada glicerina “loira” ou glicerina impura, composta por aproximadamente 80% de glicerol (PERES et al., 2009).

A produção de biodiesel tem aumentado a cada ano, estudos norte-americanos prediziam uma produção de 1,3 bilhões de litros de biodiesel anuais, entretanto em 2007 a produção foi de 1,5 e 5,7 bilhões de litros, respectivamente nos Estados Unidos e na Europa. Em 2008 a produção de biodiesel já havia aumentado em 180% comparado ao ano anterior (WILSON, 2002; SMITH et al., 2010; LOZADA et al., 2010). No Brasil, no mês de março de 2013 houve produção aproximada de 2.717.483 m^3/dia de biodiesel em 67 plantas autorizadas para essa operação (ANP, 2013).

Uma rota para aproveitamento da glicerina loira é o refino, visando à obtenção de glicerina pura que é destinada para vários setores da indústria de processos químicos. Ocorre que, devido os aumentos das operações para obtenção de biodiesel aliado ao desaquecimento do mercado mundial, há sobra de glicerina loira, tendo destinação como resíduo, e por conseguinte, aproveitada em unidades de incineração, em fornos e em demais processos térmicos. Dada a corrosividade e a sua inflamabilidade, a NBR 10.004 da

ABNT -Classificação de Resíduos Sólidos- classifica a glicerina loira como resíduo perigoso, classe 1 (ABNT, 2004).

Os processos convencionais atualmente aplicados em escala industrial no Brasil produzem aproximadamente, 1 tonelada de glicerina loira para cada 10 toneladas de biodiesel. De acordo com a ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, no início desta década foram produzidos aproximadamente 1.735,95 m^3/dia de glicerol (ANP, 2011).

Neste contexto o glicerol é um co-produto renovável e com a nova tendência energética do país suas reservas aumentarão. Pesquisas são realizadas com intuito de valorizar o glicerol bruto e processos termo-químicos para a transformação do glicerol em propilenoglicol, acetol, hidrogênio e vários outros compostos já se encontram bem inseridos na literatura (ALHANASH et al., 2008; CHIU et al., 2006; DASARI et al., 2005; CORTIGHT et al., 2002). Processos biotecnológicos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos, tais como produção de biossurfatante, lipídeos e ácidos orgânicos, com intuito de transformar o glicerol em produtos com valor agregado.

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfatantes, isto é, reduzem a tensão superficial e interfacial, além de apresentarem capacidade emulsificante, são conhecidos como biossurfatantes ou biotensoativos. A maior vantagem dos biossurfatantes quando comparados aos surfatantes sintéticos reside na sua diversidade estrutural, baixa toxicidade e biodegradabilidade, além de não conterem petróleo em suas estruturas. Devido a essas propriedades podem ser usados para diversas aplicações que se estendem desde biorremediação de áreas contaminadas de poluentes, à indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética (da SILVA et al., 2009; PASTORE e NITSCHKE, 2002).

Os biossurfatantes podem ser produzidos a partir de fontes renováveis (açúcares, óleos vegetais e glicerol) as quais valorizam economicamente o produto, já que diminuem seu preço final contribuindo para a redução da poluição ambiental, ao utilizarem co-substratos remanescentes das indústrias.

Adicionalmente podem ser produzidos lipídeos microbianos, concomitantemente à produção de biossurfatantes. Tais compostos podem competir com os lipídeos de fontes agrícolas para a produção de Biodiesel, assim como, produção de ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3-6-

9, estes últimos de grande importância na ação contra diversas patologias, sendo utilizados como alimento funcional, na modulação do desenvolvimento físico, fisiológico e mental do organismo.

As considerações econômicas e ambientas motivam a realização dessa pesquisa que tem como objetivo a síntese de coprodutos (biossurfatante e lipídeos) economicamente viáveis, em cultura submersa, a partir de glicerina bruta, resíduo da fabricação de biodiesel de soja, com uso de linhagem de leveduras, nativas do Brasil. Visto que o produto apresenta cerca de 80% de glicerol e 20% de impurezas aproximadamente, os efeitos destes compostos interferentes serão analisados em relação ao rendimento dos compostos sintetizados nos bioprocessos. Assim, visa-se, agregar valor à glicerina loira, incrementando a sustentabilidade ambiental do negócio de biocombustíveis, estratégico para o Brasil no cenário de aquecimento global.

Associando a necessidade de compatibilizar a oferta de glicerol com a produção de bioprodutos de alto valor agregado, o estudo teve como objetivo principal a utilização de glicerol como única fonte de carbono para a produção de biossurfatante por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678.

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar diferentes bioprodutos sintetizados a partir da uma linhagem leveduriforme, utilizando o glicerol bruto proveniente da Indústria de Biodiesel de soja, como única de carbono.

2.2. Objetivos específicos

- Testar diferentes linhagens leveduriformes quanto a produção de bioprodutos;

- Sintetizar bioprodutos tais como, biossurfatante e lipídeos;

- Avaliar variáveis pH, concentração de glicerol e biomassa em frascos Erlenmeyer de 500 mL e variáveis aeração, agitação e temperatura em biorreator com capacidade de 3L, ambos com a utilização de um planejamento experimental;

- Produzir o biossurfatante em biorreator utilizando os parâmetros de maior influência estudados no item anterior;
- Recuperar o biossurfatante obtido como extrato e sua purificação;

- Estudar a estabilidade do extrato recuperado em elevadas temperaturas e salinidades;
- Caracterizar o biossurfatante produzido quanto as propriedades físico químicos;
- Aplicar o biossurfatante em solo contaminado com compostos hidrofóbicos.

Capítulo 3

Levantamento Bibliográfico

3.1. Biodiesel

A Lei nº 11.097, publicada em 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira e ampliou a competência administrativa da ANP, que passou, desde então, a denominar-se Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. A partir da publicação da citada lei, a ANP assumiu a atribuição de regular e fiscalizar as atividades relativas à produção, controle de qualidade, distribuição, revenda e comercialização do biodiesel e da mistura óleo diesel-biodiesel (BX). De acordo com a referida Lei, o conceito de Biodiesel é:

"Biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil"

A produção e o uso do biodiesel no Brasil propiciam o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável sob os aspectos ambiental, econômico e social e também trazem a perspectiva da redução das importações de óleo diesel, gerando divisas para o País. Além da diminuição da dependência do diesel importado, o biodiesel traz outros efeitos indiretos de sua produção e uso, como o incremento a economias locais e regionais, tanto na etapa agrícola como na indústria de bens e serviços. Com a ampliação do mercado do biodiesel, milhares de famílias brasileiras são beneficiadas, principalmente agricultores do semi-árido brasileiro, com o aumento de renda proveniente do cultivo e comercialização das plantas oleaginosas utilizadas na produção do biodiesel (PERES et al., 2009; CANAKCI, 2007).

Outro benefício para a sociedade, resultante da ampliação do uso do biodiesel, é o efeito positivo sobre o meio ambiente, acarretando a diminuição das principais emissões veiculares em comparação ao diesel derivado do petróleo. O biodiesel pode ser usado puro ou em mistura com o óleo diesel em qualquer proporção. Tem aplicação singular quando em mistura com o óleo diesel devido o ultrabaixo teor de enxofre, e porque confere a este, melhores características de lubricidade. É visto como uma alternativa excelente o uso dos ésteres em adição de 5 a 8% para reconstituir essa lubricidade (ARRUDA et al., 2006)

Mundialmente passou-se a adotar uma nomenclatura bastante apropriada para identificar a concentração do Biodiesel na mistura, Biodiesel BXX, onde XX é a percentagem em volume do Biodiesel à mistura. Por exemplo, o B2, B5, B20 e B100 são combustíveis com uma concentração de 2%, 5%, 20% e 100% de Biodiesel, respectivamente (DEMIRBAS, 2009).

A possibilidade do uso de óleos vegetais como combustível foi reconhecido desde os primórdios dos motores a diesel. Rudolph Christian Karl Diesel, inventou o motor a combustão interna que leva seu nome, registrou a patente de um motor desenvolvido para operar com óleo de amendoim e é curioso que este autor, escreveu no prefácio do livro *Termodinâmica* em 1911, os seguintes dizeres:

"O motor a diesel pode ser alimentado com óleos vegetais e poderá ajudar consideravelmente o desenvolvimento da agricultura nos países aonde ele vier a ser usado. Isso parece um sonho do futuro, mas eu posso predizer com inteira convicção que esse modo de emprego do motor diesel pode, em dado tempo, adquirir uma grande importância" (DEMIRBAS, 2003).

Por muito tempo, os motores a diesel funcionaram por injeção indireta, à base de petróleo filtrado, óleos vegetais ou de peixe. O óleo diesel surgiu apenas na década de 1950 com o advento da injeção direta, sem a pré-câmara, devido ao baixo consumo de combustível, entretanto, os motores a injeção não foram obrigados a funcionar com óleo diesel, mas podiam e ainda podem funcionar com qualquer tipo de óleo, tanto de origem vegetal ou quanto de origem animal desde que seja regulada a pressão no sistema de injeção (BALAT et al., 2008).

Os fatores econômicos aliados à necessidade mundial de desenvolver fontes de energia não poluentes impulsionaram a pesquisa por novos combustíveis a partir de fontes renováveis. Entretanto, para ser eficiente, um combustível alternativo deve apresentar certas características, como por exemplo: ser competitivo, ser compatível aos motores existentes, ser econômico e ambientalmente correto (RAJENDRA et al., 2009; MEHER et al., 2006).

Na comparação com o diesel de petróleo, ambientalmente o biodiesel é significativamente mais vantajoso, além de necessitar de pouca ou nenhuma modificação do motor (MEKHILEF et al.,2011). Estudos do *National Biodiesel Board*, associação que representa a indústria de biodiesel nos Estados Unidos, demonstraram que a queima do combustível em relação a queima de derivados do petróleo, podem emitir 48% em média menos monóxido de carbono; 47% menos material particulado; 67% menos hidrocarbonetos, além de perda imperceptível de potência, redução de carbono depositado e desgastes da peças do motor. Como esses percentuais variam de acordo com a quantidade de biodiesel adicionado ao diesel de petróleo, no B3 essas reduções ocorreram de modo proporcional (HANSEN et al., 2010; ANP e NBB, 2011).

A produção de biodiesel pode ser realizada por 3 processos: emulsificação, pirólise, e transesterificação, tradicionalmente o mais utilizado. A reação de transesterificação pode ser aplicada na indústria de pequeno e

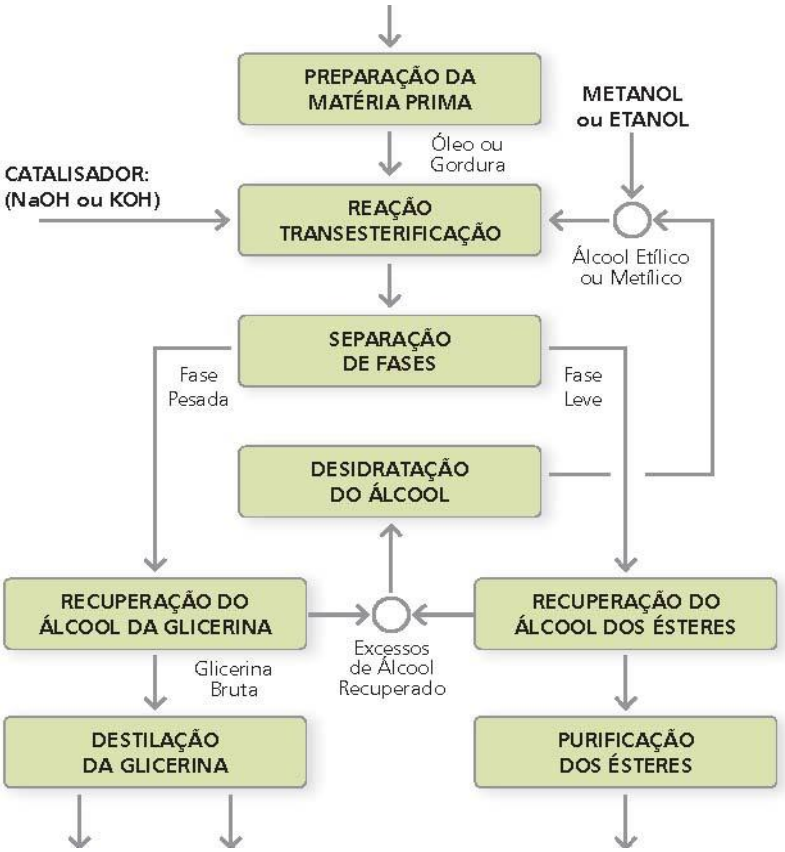
grande porte. Alguns compostos oriundos de aplicações em pequena escala são usados como intermediários na indústria farmacêutica e como aditivos para a indústria alimentícia (HAN, 2009; DOSSIN et al., 2006; BAJPAI E TYAGI, 2006).

A transesterificação de ácidos graxos livres ou de triglicerídeos é a principal etapa da produção do biodiesel do ponto de vista quantitativo e qualitativo, dado que o processo de transesterificação tem como propósito, a redução da viscosidade do óleo, uma vez que óleos vegetais, por exemplo, possuem uma viscosidade cerca de 10 a 20 vezes superior ao diesel convencional, podendo danificar o motor, problemas estes não observados em presença de biodiesel, mesmo quando na forma B100 (RAHMAT, ABDULLAH, MOHAMED, 2010).

A partir da escolha da matéria-prima e das condições aplicadas na reação de transesterificação, isto é, natureza do óleo ou da gordura, e escolha do álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) e catalisador, uma planta industrial para a produção do biodiesel pode adotar o fluxograma de processo apresentado na Figura 1. Vale ressaltar que o operação também pode ser conduzida empregando o método de fluído supercrítico (SCM)(HASHEMINEJAD et al., 2011).

De forma geral, a primeira etapa do processo diz respeito à recepção da matéria-prima e das operações de análises e armazenamento temporário, seguido de operações de medidas do volume de material a ser admitido no equipamento, do volume de álcool e do teor de catalisador.

A reação de transesterificação ocorre em reatores contínuos que funcionam a temperaturas entre 60 e 250°C, sob pressão de 0,1 a 10 MPa, de modo a garantir uma razão de álcool para éster produzido de 5:15. A reação de transesterificação propriamente dita é a reação entre o ácido graxo ou um triglicerídeo com alcoóis de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, em presença de um catalisador que pode ser alcalino, ácido ou enzimático, utilizado preferencialmente nesta ordem (ELLIS et al., 2008).



R
gl

fonte: Parente (2003).

Figura 1- Fluxograma de produção de biodiesel

Os catalisadores alcalinos, como metilatos de sódio ou de potássio são os mais utilizados no Brasil. As principais vantagens deste tipo de catalisadores são justificadas pela alta reatividade destes compostos, bem como a pressão requerida ser menor quando comparados com outros. Catalisadores ácidos, como o ácido sulfúrico, ácido sulfônico e ácido fosfórico provocam corrosão nos equipamentos, implicando na aplicação de materiais alternativos, isto é, catalisadores sólidos sulfonados, que objetivam minimizar o problema da corrosão, assim como facilitar o processo de separação do catalisador da mistura. Por outro lado, os catalisadores enzimáticos tornam os custos do processo muito elevados em relação aos catalisadores químicos e são pouco utilizados na indústria, sendo mais aplicados em plantas piloto com fins de pesquisa (CHEN, JU e MOU, 2007).

A reação de transesterificação ocorre em três etapas distintas: na primeira, as moléculas dos triglicerídeos são atacadas por ânions do álcool, formando compostos comumente conhecidos como FAME, sigla inglesa para ésteres metilados de ácidos graxos, bem como moléculas de diglicerídeos. Na segunda fase da transesterificação ocorre ataque do ânion nas moléculas de diglicerídeos produzindo FAME e monoglicerídeos. Na terceira e última etapa do processo, as moléculas de monoglicerídeos são atacadas pelo ânion proveniente do álcool e novamente forma-se FAME e glicerol, coproduto de grande valor agregado. Posteriormente ocorre a separação das fases leve e pesada por decantação, já que a mistura entre o glicerol e o biodiesel é heterogênea e as fases são imiscíveis.

Na etapa final do processo de transesterificação de ácidos graxos ou de glicerídeos são necessárias reações de neutralização do catalisador e posterior separação da mistura, bem como da separação do álcool que está presente em excesso no sistema e do glicerol que foi formado. A etapa de separação do catalisador e do álcool ocorre em colunas de destilação acopladas aos reatores. Do ponto de vista ambiental, o volume de solvente aplicado e do gasto de energia demandado, representam um dos pontos críticos durante a produção de biodiesel (EEVERA et al., 2009)

Os principais resíduos presentes no biodiesel na forma de produto final são: água, álcool, traços de ácidos graxos livres e do catalisador. O conteúdo de ácido graxo livre deve ser inferior a 0,5% (m/v), caso contrário poderão ocorrer reações de saponificação, prejudidando seriamente a qualidade do produto. Estes mesmos resíduos também são encontrados no glicerol que dependendo da sua utilização poderá ou não ser purificado por meio de processos que incluem destilação, evaporação, ajuste de pH , dentre outros.

A produção de glicerol foi descrita pelo professor alemão Rochieder, a partir de uma reação de óleo de mamona com etanol. Durante os anos seguintes, pesquisas com outros óleos vegetais, foram conduzidas, porém apenas nos anos 1960 o produto obtido através da reação de transesterificação, de ésteres de ácidos graxos, passou a ser utilizado como combustível (BOZBAS, 2008).

A validação dos benefícios da produção de biodiesel depende de vários fatores, como, por exemplo, escolha da matéria-prima, do catalisador e do álcool, logística de armazenamento e distribuição e da escolha da tecnologia de produção, levando em consideração todos os resíduos que são gerados durante o processo (RANGANATHAN et al., 2008).

O quadro 1 apresenta as principais matérias-primas utilizadas na produção mundial de biodiesel.

EUA	EUROPA	BRASIL	CHINA
Glycina Max *(soja)*	*Brassica campestres*	*Glycina Max*	*Brassica campestres*
Helianthus annus (girassol)	*Helianthus annus*	Gordura animal	Óleo de fritura
Brassica campestres(colza)		*Gossypium* sp (algodão)	
Óleo de fritura			

fonte: Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2011), Nacional Biodiesel Board (2011), DERMIBAS (2009); SHARMA et al. (2008); e FUKUDA et al. (2001).

Quadro 1 – Algumas matérias-primas usadas para a produção de biodiesel.

No Brasil, o biodiesel é produzido principalmente, a partir de óleos vegetais, como o de soja. Devido aos diferentes tipos de solos e climas, o cultivo de inúmeras espécies é diversificado com finalidade de serem aproveitadas para produção de biodiesel e a escolha da matéria-prima é baseada no cultivo tradicional da região. Na Tabela 1 estão assinaladas as regiões brasileiras passíveis de cultivos de oleaginosas.

Tabela 1- Percentual das matérias-primas utilizadas para a produção de Biodiesel por região do Brasil

Matéria-Prima	Região				
	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul
Óleo de Soja	14,11%	49,98%	90,96%	45,36%	74,57%
Gordura Bovina		32,29%	5,39%	48,23%	23,35%
Óleo de Algodão	18,19%	17,73%	1,26%	1,52%	0,05%
Outros Materiais Graxos	67,71%		1,00%	0,83%	
Óleo de Fritura usado			0,92%	4,04%	0,09%
Gordura de Porco			0,01%		1,60%
Gordura de Frango					0,01%
Óleo de Palma / Dendê					
Ácido Graxo de Óleo de Soja			0,46%		
Óleo de Macaúba				0,02%	
Óleo de Nabo-Forrageiro					0,33%

fonte: Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2013)

Atualmente no Brasil a maior produção de biodiesel é proveniente do óleo de soja, com exceção da região Norte, onde se destacam outras fontes de material graxo, como os óleos de mamona e babaçu (ANP, 2013), embora estas matérias primas não são assinaladas no tabela apresentada pela Instituição. A oleaginosa que apresenta o melhor resultado é o dendezeiro, que permite um alto rendimento na extração de óleo por hectare, embora a planta demore muito para atingir sua produtividade máxima, ao contrário das outras oleaginosas, que têm cultura rotativa anual. A soja se caracteriza como um vegetal com a menor quantidade de grãos por produção de óleo e é a preferência dos produtores por resultar valorosos subprodutos, como o farelo e proteínas. Por outro lado, a plantação de mamona, se torna atraente por conta dos baixos custos de manutenção, e por gerar emprego e fomentar a agricultura familiar (BILICH, 2006).

Ferrari et al. (2005), utilizando o processo de transesterificação com catálise alcalina, verificaram que o teor de enxofre e carbono no biodiesel foram inferiores aos presentes no óleo diesel, representando uma diminuição nas emissões destes compostos na atmosfera. Os autores observaram um

aumento no número de cetano (relacionado com o tempo entre a injeção de combustível e início da combustão), o que geralmente resulta na redução da emissão pela exaustão e conseqüentemente na diminuição do consumo de combustível, além de e reduzir o barulho do motor.

Marchetti et al. (2007) realizaram uma revisão dos possíveis métodos de produção de biodiesel, como a tradicional transesterificação de óleos ou gorduras em diferentes alcoóis, metanol, butanol e etanol utilizando catálise alcalina (KOH, NaOH), catálise ácida(H_2SO_4) e transesterificação enzimática.

Candeia et al. (2008), estudaram a possibilidade da produção de biodiesel de soja a partir de dois álcoois, o metanol e o etanol, destacaram que o maior rendimento ocorreu com a utilização do álcool metílico (98,1%) apesar do bom resultado obtido com o álcool etílico (96%). Outra vantagem se deu em relação ao tempo, a obtenção do biodiesel com metanol levou metade do tempo necessário para a produção de biodiesel a partir de etanol.

Existe um crescente interesse na produção de biodiesel por algas. Talvez haja possibilidade desses organismos apresentarem uma maior competitividade em relação aos vegetais, considerando que além de não necessitar de grandes espaços para produção, tão pouco são considerados como alimento. O maior obstáculo para comercialização do biodiesel produzido a partir de algas é o alto custo na produção desses organismos responsáveis por uma alta eficiência na síntese de óleo (ELLIS e JANUAUN, 2010).

A Tabela 2 mostra comparativamente a produção de biodiesel a partir de algas e vegetais.

Tabela 2 - Comparação na produção de biodiesel a partir de algas e vegetais.

Fator	Alga	Vegetal
Tecnologia	Reator	Agricultura
Tempo de produção	5-7 dias em cultivo de batelada	Alguns meses
Concentração de óleo (%)	Mais de 40-50% de óleo nas células	Menos de 20% em sementes ou frutos
Terra ocupada (ha/prod)	0,010 - 0,013	2,24
Custo (US$/L)	2,4	0,6 -0,8
Potencial de desenvolvimento	Ilimitado	Limitado

fonte: ELLIS e JANAUN, 2010

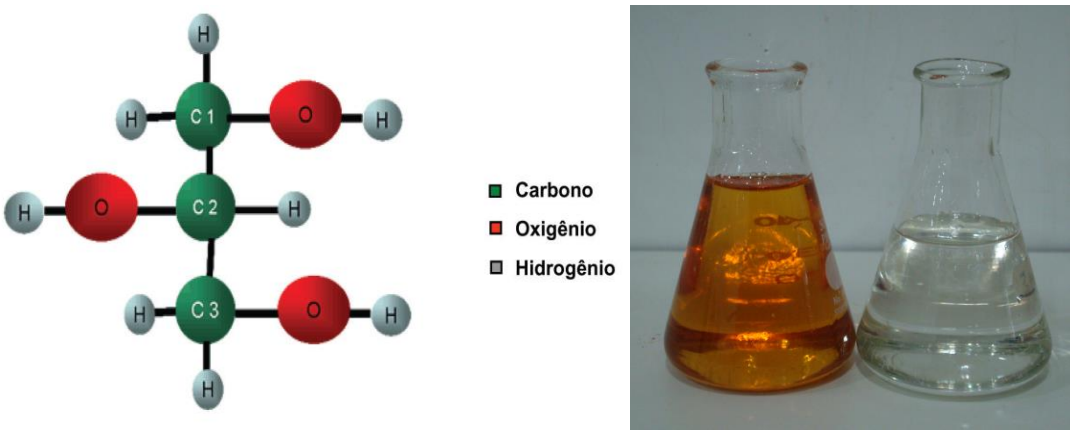
Para o Brasil atender a demanda interna obrigatória da mistura de 5% de biodiesel ao diesel comum, necessita-se uma produção de 2,6 milhões de toneladas do biocombustível por ano, gerando aproximadamente quase 300 mil toneladas de glicerol. Ressalta-se que o excedente de glicerol vem sendo queimado em caldeiras ou despejado no ambiente sem tratamento prévio. Porém soluções mais apropriadas vêm sendo estudadas tais como, processo de purificação mais econômica, substrato para produção de biomassa para aplicação industrial, produção de ácidos orgânicos, biossurfatantes, aromas, lipídeos e formas de utilização do glicerol como co-substrato em áreas impactadas; dentre outras aplicações (JOHNSON e TACONI,2007).

3.2. Glicerol

O glicerol (Figura 2) é um poliálcool descoberto em 1779, pelo químico sueco Carl W. Scheele. Quimicamente, o composto é denominado 1,2,3-propanotriol. O termo glicerina se aplica aos compostos comerciais purificados que contém normalmente quantidades iguais ou maiores a 95% de glicerol (ARRUDA et al, 2006).

O glicerol, na sua forma, pura apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com doce, solúvel em água e álcool, insolúvel

em éter e em clorofórmio. Por outro lado, o glicerol na sua forma bruta apresenta-se como um líquido viscoso, pardo escuro, contendo quantidades variáveis de sabão, metanol ou etanol, mono, di ou triglicerídeos, oligômeros de glicerol, polímeros e água (JAVANI et al.,2011; OOI et al., 2004).



(A) (B) (C)

Figura 2 - Estrutura química da glicerina (A), glicerina bruta(B) e glicerina pura(C).

No sistema metabólico dos micro-organismos, o glicerol é considerado fundamental como precursor de vários compostos e, como regulador de diferentes mecanismos bioquímicos intracelulares (LAGES, SILVA-GRAÇA e LUCAS, 1999). Em micro-organismos eucariotos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos (WANG et al., 2001). Nos seres humanos, o glicerol participa na termorregulação do corpo, resistência às altas temperaturas, resistência dos músculos em atividades físicas e resposta neural da variação da glicemia (YANG et al., 2009).

O glicerol é um coproduto natural do processo de transesterificação. Por causa do excesso de glicerina no mercado, gerado com a produção de biodiesel, a sua produção que era realizada por síntese química, a partir de cloreto de alil, via epicloridina, encontra-se em declínio. Um número variado de indústrias aplica a glicerina em seus produtos, tais como, a indústria farmacêutica, cosméticos, alimentos e petroquímica (ARRUDA et al., 2006).

Neste contexto, o glicerol apresenta-se como um composto muito versátil podendo ser aplicado em várias vertentes industriais, tais como na

fabricação de produtos para higiene bucal, de uso pessoal e para alimentos. As principais aplicações hoje são: cosméticos (40%), alimentos (24%), síntese de resinas (18%), e produtos farmacêuticos (7%). O glicerol também apresenta aplicação como lubrificante de máquinas industriais (POSADA E CARDONA, 2010; BONDIOLI, 2003).

Quando a inclusão foi de apenas 3% de biodiesel ao óleo diesel, resultou uma produção de 120.000 toneladas de glicerina bruta por ano para uma demanda nacional de aproximadamente 23.000 ton./ano. Com a obrigatoriedade do uso do biodiesel na Europa, o glicerol já se apresenta saturado no mercado. Há, portanto a necessidade de se considerar a grande demanda de glicerol, uma vez que pode representar comprometimento da saúde ambiental, estimulando pesquisas relacionadas ao aproveitamento do produto (JOHNSON e TACONI, 2007; HIRSCHMANN et al., 2005)

Processos termoquímicos para a transformação do glicerol em propilenoglicol, acetol, hidrogênio e vários outros compostos já se encontram consolidados na literatura (ALHANASH et al., 2008; CHIU et al., 2006; DASARI et al., 2005 CORTIGHT et al., 2002). Diversos processos biotecnológicos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos com intuito de transformar o glicerol em produtos com valor agregado, tais como, 1-3 propanodiol, ácidos orgânicos, lipídeos, butenol e carotenóides (MANTZOURIDOU, 2009; WEN et al., 2009; MU et al., 2008; KOUTINA et al., 2007,2008; MORGUNOV et al., 2004).

3.3. Glicerol como co-produto do biodiesel e suas possíveis aplicações

O desenvolvimento das tecnologias dos biocombustíveis acabou alternando o cenário da agricultura e da produção animal. Grãos antes empregados apenas na nutrição de animais, hoje, notoriamente competem com a produção de biodiesel, principalmente soja e milho, responsáveis pela base da alimentação de suínos e aves.

A literatura relata que o glicerol bruto possui energia bruta na faixa de 3600 a 3750 Kcal/Kg, enquanto a glicerina possui 4305 Kcal/Kg. Estudos desenvolvidos com suínos na fase de engorda afirmaram que o glicerol pode ser adicionado em 10% da dieta sem comprometimento no crescimento. Já em aves, o nível inicial pode ser de 10%, adicionado à dieta nutricional, entretanto,

deve ser diminuída quando o animal completa 17 dias, já que os altos níveis do substrato podem afetar os níveis de carcaça (HENN e ZANIN,2009; WALDROUP et al., 2006, CERRATE et al.,2006).

Em ruminantes, os estudos baseam-se no glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel a partir de matéria-prima não comestível. Apesar de apresentarem uma potencialidade tóxica, no rúmen destes animais ocorre uma transformação destes compostos em estruturas menos agressivas, toleradas por algumas espécies de ruminantes. A suplementação com glicerina bruta potencializa a fermentação aumentando a produção de propionato e a digestabilidade em todo aparelho digestivo do gado (FERRARO et al.,2009; WANG et al.,2001).

Alguns estudos abordaram a produção de etanol por micro-organismos, a partir do glicerol. Jarvis et al. (1997) observaram a produção de bioetanol por *Klebsiella planticola,* a partir de meio contendo glicerol no período de 42 dias de processo. Ito el al. (2005) através de seus estudos mostraram que a *Enterobacter aerogenes* HU-101 foi capaz de transformar resíduo de biodiesel contendo glicerol em H_2 e etanol.

Sharma et al. (2011) apresentaram rendimentos na conversão do glicerol bruto bastante promissores para produção de hidrogênio e 1,3-propanodiol. Na concentração de 3g/L de glicerol puro os valores de rendimento foram de 0.20 mol/mol de glicerol e 0.46 mol/mol de glicerol respectivamente. Utilizando glicose como co-substrato no processo em uma proporção de 3:1(glicerol:glicose), houve um aumento significativo no rendimento de hidrogênio e de 1,3-propanodiol; 0.37mol/mol glicerol e 0.65 mol/mol glicerol, respectivamente. Utilizando a somente o glicerol bruto as respostas na produção de hidrogênio foram semelhantes ao glicerol puro, 0,17- 0,18 mol H2/ mol de glicerol.

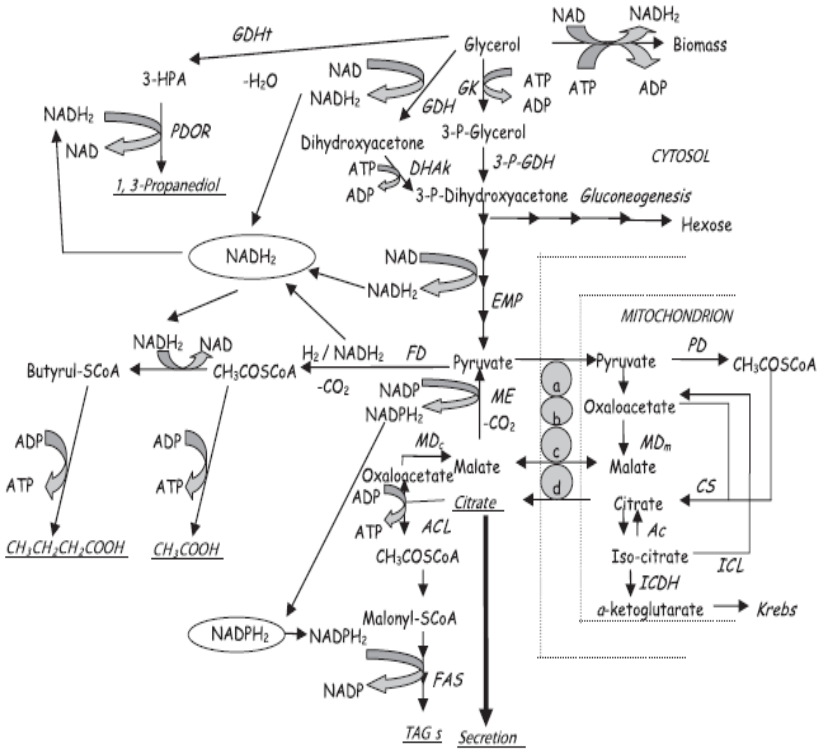
Anteriormente, Logan et al. (2009) utilizando células microbianas de eletrólise verificaram que a produção de hidrogênio foi menor utilizando glicerol buto como substrato provavelmente devido a presença de metanol e sabão, que podem estar dificultando o processo de eletrólise.

Outra aplicação do glicerol se deu como co-substrato da produção de biogás (RAHMAT, ABDULLAH, MOHAMED, 2010). Os autores observaram que o tratamento da fração orgânica de um esgoto produziu 1400 ml de metano

/dia e que após a adição do resíduo de glicerol esse número passou a ser de 2094 ml metano /dia. A adição de 1% v/v de glicerol propiciou um incremento da produção de 479 mL/d para 1210 mL/d de metano, correspondendo a um aumento de 60%.

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com intuito de buscar soluções em longo prazo para o aproveitamento do glicerol excedente da produção do biodiesel, avaliando o glicerol como uma promissora fonte de carbono para a bioconversão da molécula em produtos de alto valor agregado. A Figura 3 sintetiza as principais vias metabólicas utilizadas pelos micro-organismos para a formação produtos de interesse, tais como, biomassa, 1,3 propanodiol, ácido acético, etanol, ácido lático, dentre outros.

fonte: Xiu et al. (2007)



fonte: Xiu et al. (2007).

Figura 3- Principais vias do metabolismo microbiano do glicerol.

A Tabela 3 exemplifica a síntese de compostos de interesse industrias por alguns micro-organismos utilizando glicerol bruto proveniente da indústria do biodiesel, como fonte de carbono, encontrados na literatura.

Tabela 3 – Principais produtos da fermentação do glicerol bruto.

Micro-organismos	Produto	Referência
Aspergillus Níger	Ácido oxálico	Rymowicz et al. (2011)
Lactobacillus sp.	Ácido lático	Garai-Ibabe et al. (2008)
Yarrowia lipolytica	Ácido cítrico	Levinson et al. (2007)
Lentinula edodes	Biomassa Ácido graxo	Papanikolaou et al. (2010)
Clostridium butyricum	1,3-propanodiol	Papanikolaou et al (2008)
Klebsiella planticola	Etanol	Jarvis et al. (1997)
Pseudomonas aeruginosa	Biossurfatante	Santos (2011)
Enterobacter aerogenes HU-101	Bioetanol	Ito et al. (2005)

fonte: Elaboração própria

Levinson et al. (2007), obtiveram uma produção de 21,6g/L de ácido cítrico a partir de 40g/L de glicerol utilizando *Yarrowia lypolitica*. Em outro estudo com *Y. lipolytica* foi possível a partir de 200mg/L de resíduo glicerinoso proveniente da fabricação de biodiesel, obter a produção de 123mg/L de ácido cítrico, isto é um rendimento de aproximadamente 62% (RYMOWICZ et al., 2011).

Song e Lee (2001), estudando a fermentação de glicerol por *Anaerobiospirillum succiniciproducens,* verificaram que o micro-organismo converteu com eficiência a molécula em sucinato. Uma produção de 19g/L desse composto foi obtido quando o glicerol foi utilizado como única fonte de carbono em meio acrescido de extrato de levedura e uma produção de 29,6g/L quando o meio sofreu acréscimo de glicose, ficando claro também o papel do glicerol como co-substrato.

O composto 1,3 propanodiol (PDO) pode ser utilizado para produção de bioplásticos como poliésteres, poliéter e poliuretanos com excelentes propriedades plásticas (YANG et al., 2009; ZHAO et al., 2008). Os bioplásticos são ambientalmente interessantes visto que são biodegradáveis. Garai-Ibabe et al. (2008) e Claisse et al. (2000) observaram que bactérias produtoras de ácido lático, como o *Lactobacillus* sp., utilizaram o glicerol como única fonte de carbono para formação de 1,3 propanodiol e ácido propiônico. Cárdenas (2006) e Himmi et al.(1999), verificaram que apenas a adição de 4µg/L de biotina ao

meio, permitiu ao *Clostridium butyricum* converter altas concentrações de glicerol proveniente do biodiesel, em 1,3- PDO.

Aghaiea et al.(2009), observaram uma remoção de 67,4% de ferro de uma amostra de caulim iraniana quando utilizaram o fungo filamentoso *Aspergillus niger.* A partir da análise do método de superfície de resposta, cujas variáveis analisadas foram: concentração inicial de esporos, concentração de glicose e pH. Os pesquisadores conseguiram obter uma produção de 79,84 e 73,12 g/L de ácido oxálico e cítrico, respectivamente.

Na mesma linha científica Rymowicz et al. (2011), utilizaram o glicerol bruto proveniente da indústria do biodiesel em meio submerso também na presença de uma linhagem de *Aspergillus niger,* com o objetivo de clareamento do caulim. Em meio contendo 50g/L de glicerol bruto, o micro-organismo sintetizou 48,9g/L de ácido oxálico, proporcionando um clareamaneto de 79,2% do minério em oposição a 74%, quando não ocorrem enriquecimento do meio com ácido oxálico.

3.4. Surfactantes e biossurfactantes

Surfactante é um composto caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. O termo interface denota o limite entre duas fases imiscíveis, enquanto o termo superfície indica que uma das fases é gasosa. Outra propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de formar agregados chamados micelas que, geralmente, se formam a baixas concentrações em água. A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas chama-se concentração micelar crítica (CMC), sendo uma importante característica de um surfactante.

Estas propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases e sua utilização se concentra nas indústrias de petróleo, cosméticos, produtos de higiene e limpeza, sendo que este último é o setor que utiliza a maior parte dos surfactantes produzidos como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de

petróleo. Entretanto, o aumento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (Barros et al., 2007).

Os surfatantes, são moléculas anfipáticas que possuem uma porção hidrofílica (polar) e uma porção lipofílica (apolar). A porção lipofílica geralmente é uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção hidrofílica pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfóterica. Muitos dos biossurfatantes são do tipo não-iônicos (neutros), aniônicos e poucos catiônicos, cuja presença de grupos contendo nitrogênio concede certo grau de caráter catiônico à parte da molécula, como exemplo, a adsorção em sólidos dispersos e na floculação. A porção lipofílica da molécula está baseada em longas cadeias de ácidos graxos. A porção hidrofílica pode ser um aminoácido, peptídeo, hidróxido, fosfato, grupo carboxílico ou carboidrato (CHA et al, 2008; BOGNOLO, 1999).

Um tensoativo catiônico possui em geral a fórmula RnX+Y- , onde R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X é um elemento capaz de formar uma estrutura catiônica e Y é um contra íon. Em princípio, X pode ser N, P, S, As, Te, Sb, Bi e os halogênios. Dentre os tensoativos aniônicos mais frequentemente utilizados estão aqueles que possuem sais de ácidos carboxílicos (graxos) monopróticos ou polipróticos com metais alcalinos ou alcalinos terrosos, ácidos como sulfúrico, sulfônico e fosfórico contendo um substituinte de hidrocarboneto saturado ou insaturado. Para os anfóteros (os quais possuem ambos grupos aniônicos e catiônicos no meio hidrofóbico), e dependendo do pH da solução e da estrutura, pode prevalecer a espécie aniônica, catiônica ou neutra (MANIASSO, 2001)

Os tensoativos anfóteros mais comuns incluem N-alquil e C-alquil betaína e sultaína como também álcool amino fosfatidil e ácidos. Os tensoativos não-iônicos são derivados do polioxietileno e polioxipropileno (de compostos com alquil fenol e álcool, esteres de ácidos graxos, alquilaminas, amidas e mercaptanas) ou polialcoóis, ésteres de carboidratos, amidas de alcoóis graxos e óxidos de amidas graxas. Isto faz com que eles se distribuam nas interfaces formando um filme molecular, que reduz a tensão interfacial e superficial. (DESAI e BANAT, 1997; HEALY; DEVINE e MURPHY, 1996).

Todos estes compostos são capazes aumentar a solubilidade, o poder de detergência e a capacidade espumante. Vários segmentos industriais, como a indústria do petróleo, utilizam os benefícios dos surfatantes, principalmente para aumentar a solubilidade dos componentes do petróleo (MULLIGAN, 2011; CAMEOTRA e SING, 2008; BOGNOLO, 1999).

Muitos micro-organismos que produzem biossurfatantes são aeróbios e poucos são anaeróbios. A maior parte dos biossurfatantes é produzida pelo crescimento aeróbio de micro-organismos em meio aquoso contendo uma fonte de carbono (carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou misturas) e são secretados no meio de cultura durante o processo de crescimento auxiliando no transporte de compostos insolúveis através das membranas celulares. A composição e rendimentos dos biossurfatantes dependem do micro-organismo, pH, composição do meio, temperatura e substrato utilizado (GRISHCHENKOV et al, 2000; MULLIGAN, 2011). A Tabela 4 apresenta os principais surfactantes de origem sintética e natural.

Tabela 4- Principais surfactantes de origem natural e sintética.

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biossurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

fonte: Colla e Costa, 2010

A maior vantagem dos biossurfatantes em relação aos surfatantes sintéticos reside na sua biodiversidade estrutural, baixa toxicidade, biodegradabilidade. Apesar das vantagens apresentadas, os biossurfatantes não são amplamente utilizados devido ao alto custo de produção, associados à

baixa produtividade e ao uso de substrato caro. A utilização de resíduos industriais apresenta-se como uma possível estratégia para a valorização econômica do biossurfatante, assim como para redução da poluição ambiental (DESAI e BANAT, 1997; da Silva, 2009).

Enquanto os surfatantes sintéticos são classificados segundo a natureza do grupamento polar, os biossurfatantes são classificados principalmente por suas composições químicas e origem microbiana (DESAI e BANAT, 1997). A Tabela 5 mostra as principais classes de biossurfatantes.

Tabela 5 - Classificação dos biossurfatantes produzidos por diferentes micro-organismos.

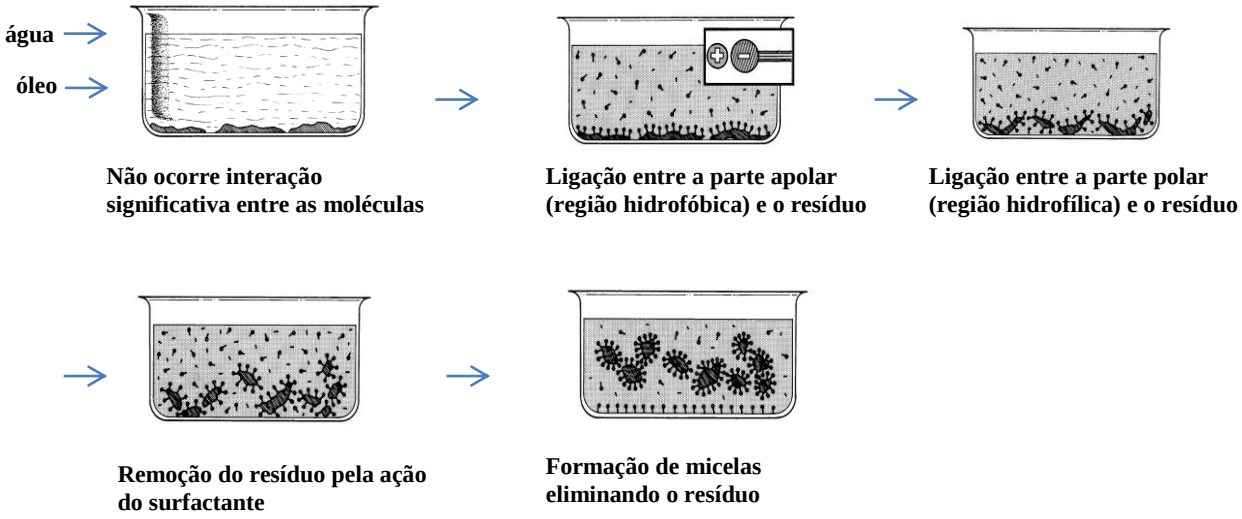
Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
- ramnolipídios	*Pseudomonas aeruginosa*
- soforolipídios	*Torulopsis bombicola, T. apicola*
- trehalolipídios	*Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.*
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	*Bacillus licheniformis*
- Viscosina	*Pseudomonas fluorescens*
- Serrawetina	*Serratia marcescens*
- Surfactina	*Bacillus subtilis*
- Subtilisina	*Bacillus subtilis*
- Gramicidina	*Bacillus brevis*
- Polimixina	*Bacillus polymyxa*
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
- Ácidos graxos	*Corynebacterium lepus*
- Lipídios neutros	*Nocardia erythropolis*
- Fosfolipídios	*Thiobacillus thiooxidans*
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	*Acinetobacter calcoaceticus*
- biodispersan	*Acinetobacter calcoaceticus*
- liposan	*Candida lipolytica*
- carboidrato-lipídio-proteína	*Pseudomonas fluorescens*
- manana-lipídio-proteína	*Candida tropicalis*
Surfactantes particulados	
- vesículas	*Acinetobacter calcoaceticus*
- células	Várias bactérias

fonte: Nitschke e Pastore (2002) ; Dos Santos (2011)

Os bioemulsificantes podem ser sintetizados por três vias: os produzidos exclusivamente a partir de alcanos como fonte única de carbono (*Corynebacterium* sp); os produzidos exclusivamente a partir de substratos miscíveis em água (*Bacillus* sp) e aqueles produzidos tanto na presença de

alcanos como na presença de substratos miscíveis em água (*Pseudomonas* sp). Geralmente a produção dos bioemulsificantes por leveduras requer a ausência de subtratos insolúveis em água, visto que estes representam um desafio no isolamento do biossurfatante (AMARAL et a., 2006).

Em função dos grupos lipofílicos e hidrofílicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se localizarem nas interfaces das fases fluidas com diferentes graus de polaridade. A adsorção a superfície de líquidos e a formação de micelas devem-se a solubilidade dos biossurfatantes (dos SANTOS, 2010) (Figura 4).

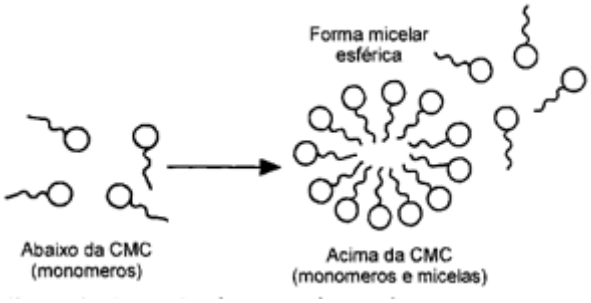


fonte: Própria autora.

Figura 4- Representação esquemática da atuação do surfatante.

A concentração que determina o início do processo de formação das micelas (micelização) chamada de concentração micelar crítica, CMC, é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante. Micelas são agregados moleculares, possuindo ambas as regiões estruturais hidrofílica e hidrofóbica, as quais dinamicamente se associam espontaneamente em solução aquosa a partir de certa concentração crítica (CMC), formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais, chamados micelas. Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros; quando a concentração está abaixo, porém próxima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas (Figura 5). A combinação destas

propriedades distintas confere à molécula características únicas na dissolução aquosa (MANIASSO, 2001).



fonte: Própria autora.

Figura 5- Formação do agregado micelar

Existem inúmeras aplicações para os biosurfatantes, tais como a biorremediação de áreas contaminadas e na recuperação avançada de petróleo, em razão do aumento da solubildade de contaminantes hidrofóbicos no solo e diminuindo a viscosidade do óleo, respectivamente (CALVO et al, 2009; CAMEOTRA e SINGH, 2008; WHANG et al, 2008); na remoção de metais pesados (DAS; MUKHERJEE e SEN, 2009); em aplicações terapêuticas (ZHAO et al, 1999); nos alimentos como emulsionantes de matérias primas; em produtos de higiene; na indústria têxtil, farmacêutica e cosmética (DESAI e BANAT, 1997; HEALY; DEVINE e MURPHY, 1996). O quadro 2 exemplifica melhor algumas aplicações dos biossurfatantes.

Funções	Campos de aplicação
Emulsionante e dispersante	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza e agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agente espessante	Tintas e alimentos
Sequestrador de minérios	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos e recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Mistura carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação melhorada de petróleo

fonte: Nitschke e Pastore (2002).

Quadro 2- Aplicações dos biossurfatantes

Das et al. (2009), produziram biossurfactantes estudando a bactéria marinha, *Bacillus circulans* e usando o glicerol, como fonte de carbono. Comparado com outras fontes de carbono, os resultados mostraram que a fonte de carbono afeta a qualidade e a quantidade da produção destes compostos e comprovaram também que a concentração mínima inibitória de biossurfactante nos testes de ação antimicrobiana foi mais significativa quando produzida a partir de glicerol, amido e sacarose em detrimento a meios contendo glicose.

Meira et al. (2007), avaliaram o aproveitamento de vários resíduos da cadeia de produção de biodiesel, farelos de algodão, canola, girassol, soja, farelo de girassol/bagaço de cana-de-açúcar (1:1), e perceberam que os substratos adicionados de glicerol apresentaram a máxima produção de 2,5g/L de extrato de ramnolipídeos parcialmente purificado ou 12,5g/Kg substrato seco de ramnolipídeos após 12 dias de fermentação.

Santa'Anna et al. (2002) utilizaram *Pseudomonas aeruginosa* PA1, e diversos substratos para a formação de biossurfactantes, entre eles, óleo de babaçu, manitol, glicerol e manose. A melhor fonte de carbono para a produção de biossurfactante foi o glicerol e na concentração de 3%v/v de glicerol houve a melhor produção, correspondente a 2,65g/L de ramnolipídeos.

Alguns pesquisadores estudaram a bioconversão de glicerol em biossurfactantes glicolipídicos pela levedura *Pzeudozyma antarctica* JCM 10317 e *Pzeudozyma siamenses* CBS 9960. Tais micro-organismos produziram de forma eficiente 16,3 g/L de manosileritritol em uma batelada alimentada de glicerol (MORITA et al., 2008; MORITA et al*.,* 2007).

Prieto et al. (2008) verificaram a produção de ramnolipídeos pela *Pseudomonas aeruginosas* LBM 10 em diferentes fontes de carbono, e perceberam que em todas as fontes utilizadas, de baixo custo e de fácil disponibilidade, foi possível a produção de biossurfatantes, obtendo melhores resultados com óleo de soja e glicerol.

Como dito anteriormente, o custo elevado do biossurfatante ocorre devido à utilização de substratos caros, assim como, em consequência das operações de extração e purificação. Portanto, faz-se necessário planejamento experimental para determinar e mesmo quantificar, a influência das variáveis sobre as respostas desejáveis, antecipando os melhores parâmetros a serem estudados assim como a otimização do rendimento dos processos (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Monteiro et al. (2007) fizeram a caracterização estrutural e molecular de um biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* quando cultivadas em um meio contendo glicerol e nitrato de amônio. O micro-organismo produziu uma mistura de doze ramnolipídeos, os quais reduziram tensão superficial até 27 mN/m. Hua et al. (2009) comprovaram que este micro-organismo foi capaz assimilar sete fontes de carbono diferentes e produzir ramnolipídeo, são elas: glicose, glicerol, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de semente de uva, diesel e querosene.

Haba et al. (2007) estudaram os efeitos da temperatura e dos nutrientes na produção de poli 3(hidroxi-alcanoatos) por *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044), em substratos oleosos. Os autores verificaram que os polímeros variaram na natureza e número dos monômeros e a mais alta produtividade, 8,2g PHA/(g biomassa residual.h), ocorreu à 37°C. Os micro-organismos também foram capazes de produzir até 10g/L de ramnolipídeos quando cultivados em meio contendo óleo de cozinha residual. Segundo Costa et al (2006), uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LBI, produziu

ramnolipídeos utilizando como substrato óleos naturais do ambiente brasileiro como óleo de cupuaçu, andiroba, dentre outros.

A utilização de substratos de baixo custo para a produção de biossurfatantes torna-se fundamental, considerando os valores dos processos fermentativos, como também, das operações de purificação (LI et al., 2007).

Obeserva-se na literatura estudos demonstrando que a produção de biossurfatante através da utilização de resíduos agroindustrias viabiliza, economicamente, o processo para obtenção desse polímero uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50% do custo final do produto. Esta estratégia diminui os custos de produção, assim como, diminuem os danos ambientais causados pelo descarte desses resíduos.

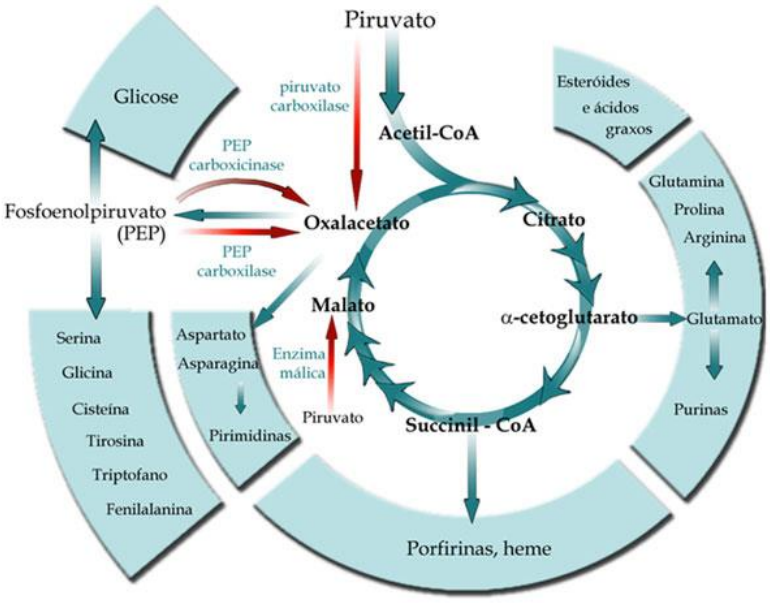
3.5. Lipídeos microbianos

Outra aplicação biotecnológica é a produção de lipídeos a partir do glicerol. O termo lipídio, tradicionalmente, tem sido usado para descrever ácidos graxos e seus derivados, terpenos, esteróis, carotenoides e ácidos biliares, que tem em comum a pronta solubilidade em solventes orgânicos, tais como: hexano, benzeno, clorofórmio ou metanol. Componentes do suco celular, os lipídeos podem ser sintetizados por micro-organismos, sejam procariotos ou eucariotos. A capacidade dos micro-organismos de sintetizarem lipídeos é conhecida desde o primeiro quarto do século XIX, mas o interesse pelo aproveitamento dessa capacidade de síntese data dos últimos 25 anos daquele século e ínico do século XXI (ANDRADE 2009).

Os lipídeos podem estar combinados na natureza com outros compostos, tais como: proteínas aminoácidos ou polissacarídeos. Muitos lipídeos contem glicerol, que podem ser esterificados com uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos e formar, monoglicerídios, diglicerídeos e triglicerídeos. Geralmente os triglicerídios e seus ácidos graxos compreendem uma grande fração dos lipídeos produzidos por fungos. Os ácidos graxos podem compreender até 88% da fração lipídica, e dentre eles, os compostos com dezesseis e dezoito carbonos são mais abundantes. Os ácidos graxos insaturados (oléico e linoleico) predominam sobre os ácidos graxos saturados (RUEGGE, 2001)

Nos micro-organismos, os lipídeos são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. A composição, qualidade e quantidade de lipídeos variam de espécie para espécie de acordo com condições de cultivo, disponibilidade de nutrientes e com estágio de crescimento (RATLEDGE, 2004).

O acúmulo de lipídio (Figura 6) pode ser realizado por dois caminhos: através da presença de precursores na síntese de ácidos graxos; ou através da absorção de óleos, ácidos graxos e triacilgliceróis do meio de cultura. A levedura *Yarrowia lipolytica* é facilmente encontrada em ambiente rico em substratos hidrofóbicos e com isso desenvolveu um mecanismo eficiente para uso destes substratos que consiste no acúmulo de frações de lipídeos, principalmente sob a forma de triacilgliceróis ou estéril ésteres (BEOPOULOS et al., 2009).



fonte: Nelson e Cox, 2011.

Figura 6- Biossíntese de lipídeos

Muitos autores têm estudado a síntese de gorduras por via microbiana, grande parte deles voltados para a possibilidade de obter alternativa para a carência de alimentos e outra, para a produção de energia. Além dessas perspectivas, a biotecnologia de lipídeos acena com outros usos industriais,

tais como interesterificação, obtenção de esteróis, de ésteres de ceras, de biossurfatantes e modificações de óleos comentíveis por lipases microbianas. Como supridores de lipídeos, os micro-organismos oferecem algumas vantagens potencias em relação aos animais e vegetais: grande rapidez de geração; menor área de produção, para uma mesma massa de material graxo e melhor controle da produção e do produto (RATLEDGE, 2004)

A gordura sintetizada pelos micro-organismos é encontrada no interior das células sob a forma de gotículas, nos vacúolos ou exteriormente, difusa no citoplasma. Sua composição define sua utilização; para a industrialização o conteúdo em ácidos graxos é importante e para alimentação o que mais interessa é a fração triglicerídica.

A qualidade dos lipídeos é dependente dos acompanhantes; para fins de alimentação é melhor quando os teores de esteróis e de fosfolipídeos são baixos. Ao contrário, se há interesse pela sua obtenção, é vantajoso obter menos triglicerídeos. Para alguns autores a presença de substâncias tóxicas não deve ser preocupante, porque os óleos antes de serem usados passam por refinamento, que devem eliminá-las.

Nem todos os micro-organismos são capazes de acumular gordura de forma substancial. Papanikolaou et al. (2008) observaram a ação do fungo *Mortierella isabellina*, que apresentou um rendimento de 0,08 g/g na produção de lipídeo por glicerol consumido, em experimentos conduzidos a temperatura de 33ºC e pH 7.0 ± 0.1 e glicerol puro e bruto, como fonte de carbono. Cabe ressaltar que todos os experimentos mostraram o mesmo rendimento em relação à utilização de glicerol puro e do proveniente da indústria do biodiesel o que evidencia o potencial de aproveitamento do glicerol bruto para fins industriais.

Os mesmos pesquisadores analisando quinze espécies de fungos observaram acúmulo de lipídeos em meio com limitação de nitrogênio e concentração de 30g/L de glicerol bruto. As leveduras apresetaram um acúmulo aproximado de 22% (m/m), sendo a espécie *Rhodotorula sp.* a mais eficiente. Com relação aos fungos o acúmulo foi de aproximadamente 42,6% (m/m), ocorrendo predominância de ácido linoleico. Nas mesmas condições a

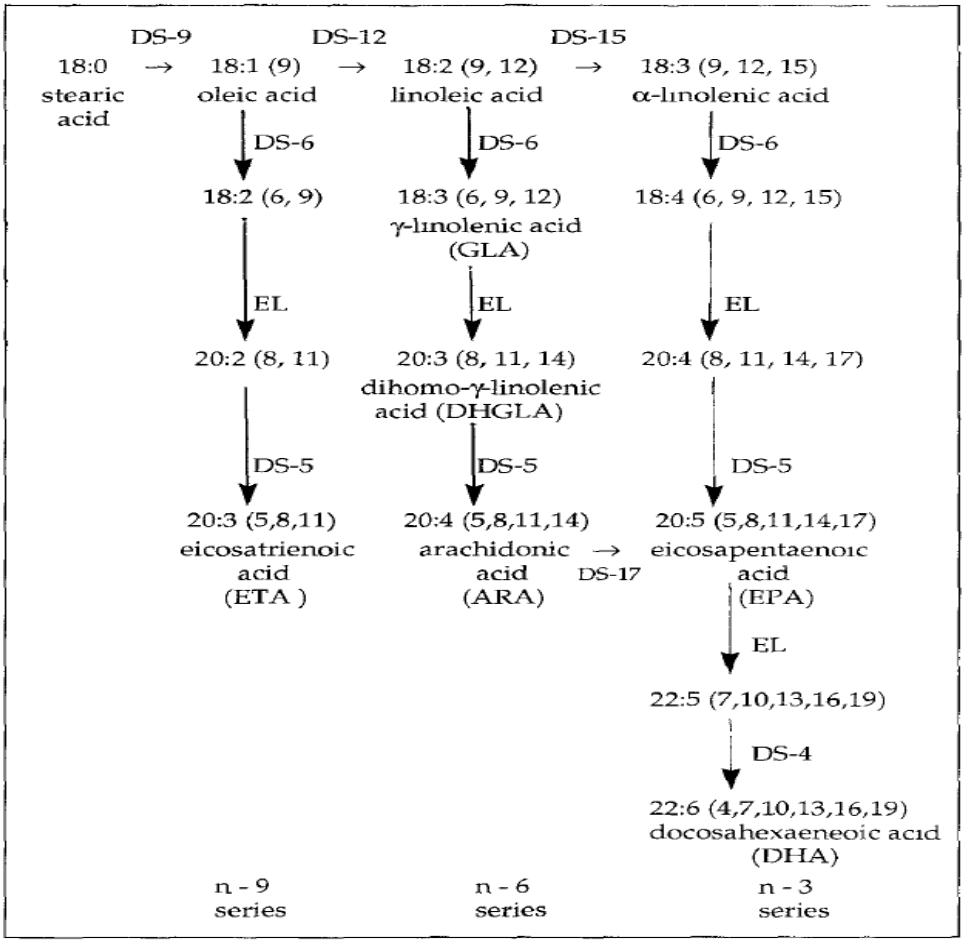
levedura *Yarrowia lipolytica* produziu 29,2g/L de ácido acético e 19,4g/L de manitol, enquanto a levedura *Pichia membranifaciens* sintetizou 28,4g/L de biomassa em presença de 90g/L de glicerol bruto.

Em estudo com *Yarrowia lipolytica*, Papanikolaou et al. (2002) obtiveram uma produtividade de 0,12g lipídeo/h, no crescimento em resíduo glicerinoso em um sistema contínuo. Os pesquisadores observaram que a inativação da ATP-citrato liase, mesmo em excesso de fonte de carbono diminuiu o nível de acúmulo de lipídio. Os fungos pluricelulares e leveduras são os organismos mais promissores oferecendo possibilidade de produção econômica produzindo ácidos graxos simples.

A pesquisa sobre lipídeos de micro-organismos serve como base para a identificação e exploração de oportunidades biotecnológicas, que incluem o desenvolvimento de produtos economicamente competitivos e aplicações.

3.5.1. Ácidos graxos insaturados

A produção microbiana de óleos de outra forma referida como *Single Cell Oil* (SCO), é agora uma realidade econômica**.** Existe considerável interesse nos ácidos graxos insaturados como fonte de alimentação funcional. Os ácidos graxos das séries n-3, n-6, n-9 (Figura 7) são precursores de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, atuando na prevenção de doenças cardíacas, sendo encontrados no tecido neural e na retina de seres humanos e animais (RATLEDGE, 2004).



fonte: Ratledge, 2004

Figura 7- Formação de ácidos graxos insaturados por micro-organismos.

Na atualidade, pesquisas têm enfatizado o importante papel dos metabólitos insaturados, tais como ácido γ-linolênico (18:3) da família ω6, ácido eicosapentaenóico (20:5) e ácido docosaexaenóico (22:6) da família ω3, representados por EPA e DHA, respectivamente. Embora os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) possam ser sintetizados no corpo a partir da biotransformação dos ácidos graxos essenciais por reações de dessaturação e elongação, a ingestão direta dos metabólitos ativos tem se mostrado eficiente, principalmente para gestantes, idosos, lactantes, crianças prematuras e para indivíduos que apresentam insuficiência da enzima Δ6-dessaturase, decorrente de carências nutricionais ou do próprio envelhecimento. O mercado mundial apresenta uma gama bastante ampla de suplementos alimentares (encapsulados) de AGPI ω6 e ω3 e de produtos nos quais estes ácidos são incorporados, como leites e derivados, fórmulas lácteas infantis, biscoitos, pães, ovos, massas e sucos de frutas (CARVALHO et al. 2003).

Os diversos ácidos graxos insaturados, seja monossaturado ou poli-insaturado, tornam-se de especial interesse em relação à prevenção e tratamento de diversas patologias. No metabolismo humano atuam como reguladores de concentrações de colesterol relacionados diretamente a doenças cardiovasculares. A administração de óleos ricos em ácidos graxos insaturados, ou seus concentrados, em humanos tem demonstrado efeitos benéficos na aterosclerose, trombose e arritmia. Outros efeitos resultantes da ingestão dos ácidos graxos insaturados foram observados em certos processos inflamatórios e alérgicos, como eczema atópico, psoríase, asma e artrite reumatóide. Também foram observados efeitos na síndrome pré-menstrual, diabetes e de certos tipos de câncer. Estudos enfatizam que estes ácidos afetam também as funções imunológicas, inibindo a proliferação de linfócitos, a produção de anticorpos e de citocinas pró-inflamatórias (BARÓ et al., 2002)

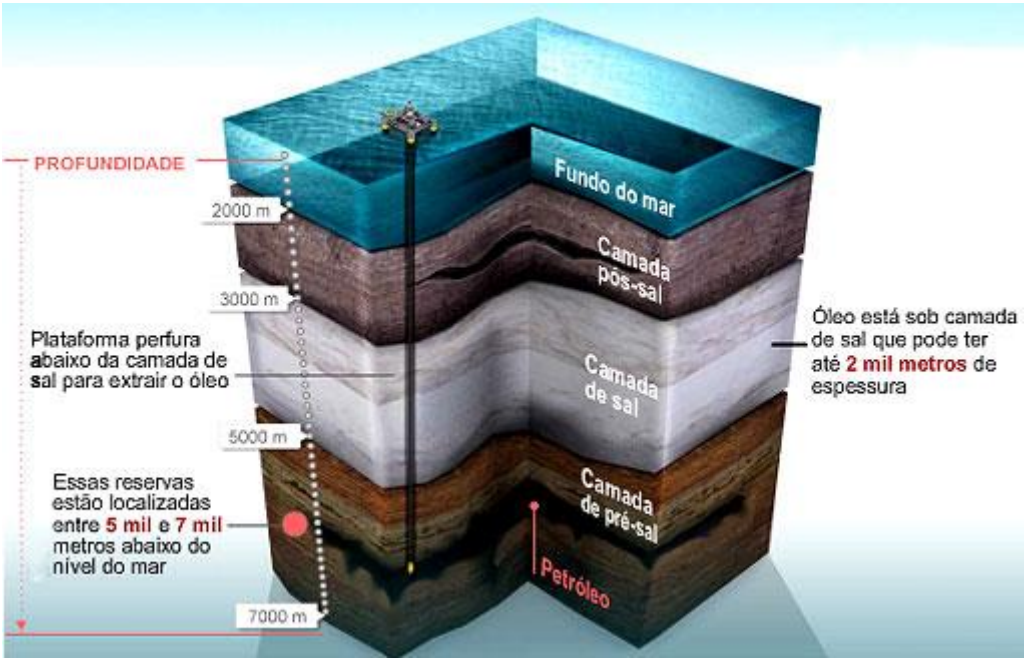
Sabe-se que os ácidos graxos insaturados, como dito anteriormente servem como suplemento alimentar. Alguns países não recomendam o uso de óleo animal, como fonte de ácidos graxos poli-insaturados para gestantes e recém-nascidos, visto que existe uma mistura dos ácidos docosa-hexaenoico e ecosapentaenoico, sendo o segundo inibidor da absorção do primeiro que é crucial para o desenvolvimento neural. Além disso, devido a poluição ambiental pode ser encontrados no fígado e em outros orgãos de peixes dioxinas, PCBs e metais pesados, como composto de mercúrio. Com isso os processos de síntese de lipídeos por micro-organismos tornam-se bastante interessante, já que estes são capazes de sintetizar unicamente um ácido graxo insaturado ou em concomitância com outro ácido graxo insaturado em menor quantidade (COX e NELSON, 2011).

3.6. Aplicações industrias para os biossurfatantes: Recuperação Melhorada de Petróleo.

O petróleo é formado a partir da decomposição da matéria orgânica ao longo do tempo, sendo encontrado nos poros de determinadas camadas sedimentares conhecidas como “rochas reservatório”. Trata-se, portanto, de um energético não renovável, o que aumenta a importância da descoberta de novos campos produtores ou de novas regiões produtoras. Segundo maior produtor de petróleo na América do Sul, o Brasil vive em constante crescimento no setor. No fim dos anos 1970, o País produzia, em média, 200 mil barris de

petróleo por dia. Em 2009, alcançou a marca de dois milhões de barris diários. O crescimento da produção neste período associou-se às grandes descobertas marítimas de petróleo e gás na Bacia de Campos, que começou com a descoberta do campo de Garoupa (RJ), em 1974, iniciando a busca em águas cada vez mais profundas.

No primeiro semestre de 2008, a Petrobrás anunciou a descoberta de um campo de petróleo no Pré-sal, abaixo de uma camada geológica de dois quilômetros de espessura de sal, ilustrada na figura 8, na Bacia de Santos. O potencial dessa descoberta e das seguintes na região do Pré-sal coloca o Brasil no mesmo nível de reserva dos grandes produtores mundiais. A preocupação com a melhoria na produção do óleo cresceu principalmente com a descoberta destas novas reservas. No Brasil os dados atuais indicam a ocorrência de reservatórios do tipo carbonato abaixo de uma camada de sal que se estende do litoral do Espírito Santo até o litoral de Santa Catarina. Estima-se que a camada pré-sal tenha uma área de 112 mil km2. Desse total, 41mil km2 já foram licitados e concedidos. Essa camada tem aproximadamente 800 km de comprimento e, em algumas áreas, 200 km de largura (LIMA, 2011). A figura 8 apresenta esquematicamente a posição da camada Pré-sal.



fonte: www.petrobras.br

Figura 8- Representação da camada Pré-sal

Os reservatórios de petróleo, assim que descobertos, possuem energia natural suficiente para produzir os fluidos até a superfície, denominados como “poços surgentes“. Isto é, possuem pressão suficiente para vencer as perdas no meio poroso, na coluna e linhas de produção. A quantidade de óleo que é recuperável é determinada por uma série de fatores, incluindo a permeabilidade das rochas, a força dos impulsos naturais (a presença de gás, a pressão da água adjacente ou gravidade), e a viscosidade do óleo. Quando a rocha reservatório está "compactada", como o xisto, o petróleo geralmente não pode fluir, mas quando elas são permeáveis, como no arenito, o petróleo flui livremente. O fluxo de petróleo é muitas vezes ajudado por pressões naturais ao redor das rochas reservatório, como o gás natural que pode estar dissolvido no óleo, gás natural presente acima do petróleo e água abaixo do petróleo e da força da gravidade (BORGES, 2009).

Porém, com o desencadear da produção, esta energia natural é reduzida, e a pressão disponível se torna insuficiente para continuar produzindo uma vazão economicamente viável, devido aos efeitos de descompressão dos fluidos no reservatório, das forças capilares, forças gravitacionais, efeitos da viscosidade e resistências oferecidas pelas tortuosidades e estrangulamentos dos canais porosos. Sendo necessário o uso de métodos de recuperação para o aumento da produtividade do campo.

3.6.1. Métodos de Recuperação de Petróleo

O tempo de vida de um reservatório de petróleo é dividido em três estágios (não sendo necessariamente dependentes). Na recuperação primária apenas a energia de formação é utilizada; na secundária técnicas especiais de recuperação são utilizadas para manter (parcialmente) a energia de formação, tais como injeção de água e re-injeção de gás natural. A característica dessa fase da produção é que apenas fluidos nativos do reservatório (na maioria das vezes água) são injetados dentro do reservatório e assim as condições naturais não são modificadas. E para aumentar ainda mais o fator de recuperação, parte-se para o terceiro estágio, que é a injeção de fluidos deslocantes que contem substâncias que naturalmente nunca estiveram em contado com o

reservatório, e que são capazes de modificar as condições de formação e de mecanismo de deslocamento (LAKATOS, 2008).

Apesar da utilização dos métodos de recuperação secundária, estes só conseguem elevar a recuperação média de 15% para 30% (restando 70% do óleo no reservatório) sendo que sua curva de produção continua a declinar. Na maioria dos casos, os campos já estão em avançado estágio de exploração e acabam atingindo seu limite econômico, passando a ser tamponados e abandonados, mesmo ainda contendo volumes consideráveis de acumulações de óleo (CARRERO, 2007). Os métodos de recuperação terciários são os mais indicados para a recuperação dos campos maduros, pois buscam recuperar reservatórios que apresentam óleos com alta viscosidade e elevadas tensões interfaciais. Neste cenário, as aplicações dos métodos convencionais de recuperação secundária não são suficientes.

Com o objetivo de aumentar o fator de recuperação e minimizar o efeito da parafinação em reservatório, vários métodos têm sido desenvolvidos, tais como: métodos químicos; com a injeção de polímeros e surfactantes, métodos térmicos e métodos miscíveis como injeção de solventes orgânicos (DONG et al., 2009) e métodos microbiológicos. A recuperação microbiológica de hidrocarbonetos (Microbial Enhanced Oil Recovery – MEOR) consiste na adição de bactérias junto à água de injeção na formação. O incremento na produção pode ser feito por efeitos biológicos ou bioquímicos.

Com relação aos efeitos biológicos, as bactérias em contato com o meio aquoso cheio de nutrientes, realizam reações metabólicas que incluem a quebra das cadeias mais longas dos hidrocarbonetos, produzindo um óleo mais leve, equivalendo-se a um craqueamento biológico do petróleo. Duplamente interessante, pois além de aumentar a recuperação do óleo pesado, este ainda se tornaria mais tecnicamente atraente. Sobre os efeitos bioquímicos, foi testada em laboratório a produção de produtos químicos através das atividades dos micro-organismos como: surfatantes que reduzem a tensão interfacial entre a água e o óleo, gases como (CO_2, N_2, H_2 e CH_4) que permitem elevar a pressão do reservatório, ácidos que atuam aumentando a porosidade e permeabilidade do meio poroso, solventes que levam à dissolução do óleo e, por fim, os polímeros que são responsáveis pelo controle da mobilidade. A

recuperação MEOR se assemelha muito à recuperação química, pois utiliza dos mesmos processos físicos para a recuperação (YOUSSEF ET AL., 2013).

A diferença essencial está no modo de introdução dos produtos químicos, no MEOR esses produtos são gerados dentro do reservatório. Parâmetros associados às propriedades das rochas e dos fluidos devem ser analisados, tais como pH, potencial de oxidação, temperatura, gases dissolvidos, geometria e tamanho dos poros, pressão, íons, minerais, sais e flora microbiológica. Uma das grandes aplicações deste método pode ser observada na estimulação cíclica de poços produtores, pois estes têm a função de remover os depósitos parafínicos e asfaltênicos próximos à região do poço.

Como em qualquer outro método de recuperação, existem vantagens e desvantagens neste método. Entre as vantagens, pode-se destacar sua atratividade econômica por necessitar de mínimas alterações nas facilidades de produção e nas facilidades de operação. Pode se aplicado para uma larga escala de óleos. Além de que, a atividade microbiológica pode ser facilmente interrompida ao cessar a injeção de nutrientes. Como desvantagens têm-se algumas restrições a reservatórios de elevadas temperaturas (T>72°C) e salinidades (teor sal>10%), que apresentam dificuldades no controle do perfil do desempenho microbiológico, como taxas de reação, concentrações requeridas do produto, estequiometria, falta de critérios para aplicação, necessidade de aperfeiçoamento do método através de testes laboratoriais e simulações para prever o mecanismo da recuperação do óleo. Para a aplicação microbiológica é importante que os micro-organismos sejam capazes de se moverem dentro do reservatório (YOUSSEF el al.,2009)

Estudos em laboratório e modelos matemáticos vêm sendo desenvolvidos para investigar o transporte dos micro-organismos na rocha reservatório, seu crescimento celular e suas retenções que reduzem a permeabilidade do meio poroso.

3.7. Planejamento Experimental

O planejamento de experimentos constitui uma ferramenta estatística que pode ser utilizada num programa de experimentos realizado com intuito de determinar, e mesmo quantificar, a influência das variáveis sobre as respostas desejáveis, sendo indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos

e para que análises estatísticas possam ser realizadas (RODRIGUES e IEMMA; 2005).

Dentre as vantagens do uso desta ferramenta, destaca-se a redução do tempo de experimentação, que permite menor número de experimentos; a redução dos custos relativos à execução dos ensaios, que está relacionado à redução da quantidade de experimentos; permissão da avaliação e minimização do erro experimental; bem como uma otimização multivariada e o não-requerimento de elevados conhecimentos de estatística.

O planejamento experimental trabalha com operações matemáticas simples, mesmo considerando em sua estrutura efeitos complexos como os de sinergia e antagonia (DE BARROS NETO *et al.*, 1995; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

O planejamento experimental funciona como um sistema de bloco, ou seja, o comportamento do bloco é conhecido pela forma como as variáveis de resposta, ou variáveis dependentes, respondem quando o experimentador promove mudanças nas variáveis de entrada, variáveis independentes, ou, simplesmente, fatores (DE BARROS NETO *et al.*, 1995).

Para a execução do planejamento experimental são necessários 4 fatores: (1) o planejamento ou o delineamento; (2) a realização dos experimentos; (3) a análise dos resultados; (4) a interpretação dos resultados (DE BARROS NETO *et al*., 1995; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Serão apresentados os Diagramas de pareto e de contorno, representando visualmente os efeitos estatisticamente mais significativos analisados na Tabela ANOVA, assim como as interações entre as variáveis dependentes (índice e emulsificação, diminução da tensão superficial e degradação de glicerol) e independentes (pH, concentração de glicerol e concentração inicial de biomassa) relacionadas a produção de biossurfatante. Os gráficos mostram a tendência dos melhores resultados relacionados aos parâmetros citados anteriormente.

A avaliação e as estimações dos efeitos são realizadas por pacote computacional *Statistica* TM99 *for* Windows®, versão 7,0, produzido pela Statsoft, onde são realizados todos os testes necessários a interpretação estatística.

3.8. *Yarrowia* sp. : Aspectos gerais

O gênero *Yarrowia* compreende um grupo de fungos leveduriformes encontrados em diversos ecossistemas, tais como rios e solos, e em casos especiais, em seres humanos e em animais. As espécies desse gênero compreendem organismos eucariotos, não fotossintéticos, constituídos por organelas citoplasmáticas, parede celular e membrana plasmática rica em esteróis principalmente ergoesterol (KUTZMAN e FELL, 2000; Andrade, 2010).

Geralmente as espécies são dimórficas, podendo aparecer microscopicamente na forma de leveduras apresentando células alongadas ou ovaladas, medindo em média 3 a 7 µm de largura e 3 a 14 µm de comprimento, na forma de micélio apresentando pseudohifas ou apresentar hifas verdadeiras**.** Além disso formam colônias úmidas, cremosas de aspecto liso, ou rugoso e coloração branco-amarelada (KUTZMAN e FELL, 2000).

3.8.1. *Yarrowia lipolytica*

A *Yarrowia lipolytica* (Figura 8) é uma levedura estritamente aeróbia que pertence à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos e foi anteriormente designada por *Candida lipolytica*. Este micro-organismo não é considerado patogênico e se encontra distribuído na natureza, em solo, águas e alguns resíduos industriais (KURTZMAM e FELL, 1998; ZINJARDE e PANT, 2002).

As colônias de *Yarrowia lipolytica* podem apresentar elevação, e em geral, curvatura convexa. Sob algumas condições de cultivos as células desta levedura podem apresentar pseudofilamentos e/ou formas elípticas típicas de levedura (KURTZMAM e FELL, 1998).

Esta levedura é bastante diferente dos modelos celulares mais estudados como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (consideradas leveduras “convencionais”) em relação à fisiologia, genética e biologia molecular e, portanto, pertence ao grupo das leveduras “não-convencionais”, sendo a espécie mais estudada desse grupo (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Por não ser considerada patogênica, a levedura já foi utilizada em aplicações industriais como na produção de proteínas de micro-organismos unicelulares, *aroma* de pêssego e ácido cítrico, em processos considerados pela *American Food and Drug Administration* como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (TSUGAWA *et al.*, 1969). Além disso, é capaz de excretar várias enzimas, como proteases, lipases, proteínas heterólogas, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (FICKERS *et al.*, 2011; FICKERS *et al.*, 2002).

Na maioria das leveduras "não-convencionais", como *Y. lipolytica*, em contraste com *S. cerevisiae*, a respiração em presença de oxigênio é essencial para o uso de açúcares e sendo aeróbio restrito, *Y. lipolytica* não tem sua taxa de respiração, seu conteúdo de citocromos ou propriedades mitocondriais afetados por altas concentrações de glicose (FLORES *et al*., 2000).

A gama de substratos utilizados por *Yarrowia lipolytica* inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glicose). Apesar de alguns trabalhos terem reportado a inclusão de sacarose nessa gama de substratos, algumas cepas não apresentam atividade invertásica detectável (KURTZMAN e FELL, 1988).

Algumas espécies de leveduras exibem dimorfismo, ou seja, a habilidade de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas: células ovóides e hifas bastante alongadas. *Yarrowia lipolytica* é um fungo que apresenta dimorfismo naturalmente, formando células de leveduras, pseudo-hifas e hifas septadas (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Embora existam vários mecanismos envolvidos na regulação do dimorfismo, a limitação do nitrogênio parece ser um dos sinais mais importantes envolvidos no processo. A formação de pseudo-hifas em *Saccharomyces cerevisiae* tem sido identificada como uma resposta à limitação de nitrogênio (ANDREA et al., 2010). Em contraste com *S. cerevisiae*, Szabo (2002) apresentou resultados mostrando que a formação de hifas em culturas de *Yarrowia lipolytica* foi inibida pela limitação de nitrogênio, enquanto que a fonte de carbono, aparentemente não foi importante para a formação de filamentos.

A complexidade e multiplicidade de genes permite que a *Y. lipolytica* utilize uma grande variedade de substratos, podendo acumular lipídeos em

níveis superiores a 50% do massa seca da célula. *Y. Lipolytica* pode, portanto, ser considerada uma levedura oleaginosa. A acumulação lipídica provavelmente é reforçada pelas muitas saliências na superfície da célula, facilitando a absorção de substratos hidrofóbicos a partir do meio. As cadeias alifáticas internalizadas são então divididas para atender às necessidades de crescimento, ou acumular de forma inalterada ou modificada, consistindo principalmente de triacilgliceróis (TAG) e ésteres de estéril (SE). A biossíntese de TAG é um outro processo de armazenamento de energia fornecendo ácidos graxos para a formação de fosfolipídeos de membrana. A formação de ésteres fornecem os esteróis necessários para a proliferação da membrana (RATLEDGE, 2005, MLICKOVA et al., 2004).

As moléculas se acumulam em um compartimento da célula especializada conhecido como o corpo de lipídeos, sendo constituído de lipídeos envolto por uma monocamada de fosfolípido, em que muitas proteínas com diversas atividades bioquímicas são incorporados (FUJIMOTO et al., 2008; ZWEYTICK et al., 2000). Os corpos lipídicos desempenham um papel fundamental, não só no armazenamento de lípidos, mas também no metabolismo, degradação e tráfico de substrato (BROWN, 2001).

Alguns modelos têm sido desenvolvidos para o estudo do metabolismo de lípidos. Estes modelos incluem *Saccharomyces cerevisiae*, que tem sido usada como um modelo genético em estudos que melhoraram grandemente a nossa compreensão do metabolismo lipídico (CZABANY, ATHENSTAEDT, DAUM, 2007). As enzimas envolvidas na biossíntese de TAG, armazenamento e degradação são muito similares entre espécies, e particularmente entre leveduras, mas *S. cerevisiae* não é uma levedura oleaginosa e acumula apenas quantidades moderadas de lípidos (inferior a 15% da sua biomassa). Além disso, ao contrário de *S. cerevisiae*, que produz quantidades similares de TAG e SE*, Y. lipolytica* armazena principalmente TAGs (> 90%). Esta levedura também é capaz em acumular quantidades significativas de ácido graxo livre no interior da célula.

As características únicas de *Y. lipolytica*, juntamente com a disponibilidade de ferramentas genéticas eficientes para esta espécie, têm estimulado o interesse no uso desta levedura, como modelo para a produção de bio-óleo, com grande potencial para aplicações biotecnológicas. Várias

tecnologias, incluindo várias configurações de fermentação, já foram utilizados para a produção de óleos (*Single Cell Oil*) pelas cepas de *Y. lipolytica* cultivadas em várias substratos agroindustriais, subprodutos ou resíduos (FICKERS ET AL., 2005; PAPANIKOLAOU ET AL., 2002). As potenciais aplicações destes processos incluem produção de lipídeos de reserva com estruturas específicas (por exemplo, óleos enriquecidos em ácidos graxos poli-insaturados essenciais) e a produção de óleos não-específicos para utilização como matérias-primas renováveis para a síntese de biocombustíveis.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4.1. Matérias-primas

Glicerol puro: utilizou-se o glicerol comercial (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) contendo pureza de 99,5% e o **Glicerol bruto**, obtido da planta piloto de produção de biodiesel de soja, cedido gentilmente pelo Professor Luís Guilherme da Costa Marques, do Instituto Virtual Internacional de Mudanças Globais – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro. O biodiesel de soja foi produzido por transesterificação não enzimática utilizando etanol e hidróxido de potássio (KOH) como catalisador do processo. O glicerol foi caracterizado e suas especificações estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Caracterização das amostras de glicerol bruto e glicerol PA.

Analitos	Resultados		Metodologia
	Glicerol bruto	Glicerol PA*	
Densidade (g/L)	1,05	1,26	ASTM D4052
pH	9,9	5,9	ASTM E70-07
Teor de etanol [% (m/m)]	2,8	NR	EN 14110
Água [% (m/m)]	9,3	NR	EN 12937
Teor de KOH [% (m/m)]	2,0	NR	BS 5711-5
Teor de glicerol [% (m/m)]	84,4	99,9	BS 5711-3
Monoglicerídeos [% (m/m)]	NR	NR	EN 14105
Diglicerídeos [% (m/m)]	1,0	NR	EN 14105
Triglicerídeos [% (m/m)]	< 0,5	NR	EN 14105
Alumínio [% (m/m)]	0,0015	< 0,6	ASTM D5185-09
Cálcio (µg/g)	< 0,2	< 0,2	ASTM D5185-09
Cromo (µg/g)	< 0,1	< 0,1	ASTM D5185-09
Cobre (µg/g)	0,52	< 0,006	ASTM D5185-09
Ferro (µg/g)	12,6	< 0,5	ASTM D5185-09
Magnésio (µg/g)	< 0,2	< 0,2	ASTM D5185-09
Manganês (µg/g)	0,11	< 0,02	ASTM D5185-09
Sódio (µg/g)	938	< 0,04	ASTM D5185-09
Chumbo (µg/g)	0,12	< 0,006	ASTM D5185-09
Zinco (µg/g)	1,08	0,20	ASTM D5185-09
Potássio (mg/g)	50,7	< 0,2	ASTM D5185-09

NR – não realizado
*Especificações do fabricante

As determinações quantitativas nos dois tipos de glicerol foram realizadas pelo Laboratório ASG do Brasil, no Rio de Janeiro e pelo Laboratório de Espectrometria Atômica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis.

4.2. Seleção das linhagens

A seleção foi realizada em relação à capacidade de produção de bioprodutos (ácido cítrico, oxálico e α-cetaglutarato e biossurfatante) pelas linhagens. Utilizou-se três linhagens da levedura *Yarrowia lipolytica*: ATCC 18943, IMUFRJ 52335, isolada do lago de Juturnaíba - RJ e IMUFRJ 50678, proveniente do estuário da Ilha do Fundão-RJ. Ressalta-se que o tempo de crescimento foi o mesmo para todas as linhagens que em 48 horas apresentavam-se em fase exponencial de crescimento.

A manutenção dos micro-organismos foi realizada por meio de subcultivos mensais, em tubos de ensaio contendo o meio ágar Sabouraud (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e óleo mineral, a fim de manter todas as suas características viáveis até o fim do estudo. A incubação foi conduzida à 30±1ºC e o armazenando à 4 ±1ºC em refrigerador (Brastemp 340L).

Para síntese do bioproduto utilizou-se o meio de cultura M1 de composição em g/L: KH_2PO_4 - 7,00; Na_2HPO_4 -2,50; $MgSO_4$ - 1,50; $CaCl_2$- 0,15; $FeCl_3$ - 0,15; $ZnSO_4$ - 0,02; $MnSO_4$ - 0,06; extrato de lêvedo - 0,50, $(NH_4)_2SO_4$ - 0,5 (PAPANIKOLAOU et al.; 2010). O meio foi esterilizado a 121ºC por 15 minutos. Para a escolha da linhagem, os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura (M1) adicionado de 30 g/L de glicerol P.A. e incubação (Tecnal, TE-420) sob agitação de 180 rpm a 28±1ºC /5 dias.

Após o crescimento das linhagens foram determinados os teores de ácido cítrico, ácido oxálico, ácido α-cetaglutarato e diminuição da tensão superficial.

4.3. Produção de biossurfatante

Considerando que a linhagem *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 apresentou diminuição significativa da tensão superficial do meio, experimentos foram conduzidos visando o efeito de alguns parâmetros no processo. Para a indentificação das variáveis importantes nas condições experimentalmente estabelecidas foi utilizado planejamento

fatorial 3^3 completo, representando 27 combinações com 3 variáveis em 3 níveis. Todo o tratamento estatístico desta etapa foi realizado através da análise dos dados no pacote computacional *Statistica* TM99 *for* Windows®, versão 7,0, produzido pela Statsoft.

Os experimentos foram conduzidos sob agitação e temperatura controladas (Tecnal, TE-420) em frascos Erlenmeyer com capacidade para 500mL contendo 100mL de meio mineral M1 adicionado de diferentes concentrações de glicerol P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) como única fonte de carbono e energia, variando pH, concentração de inóculo e de substrato (Tabela 7). Adotando-se como resposta tensão superficial, índice de emulsificação e consumo de glicerol. As variáveis de pH, concentração inicial de substrato e biomassa foram escolhidas através da literatura.

Tabela 7 – Matriz do planejamento experimental com seus respectivos valores absolutos e codificados.

Sistema	pH (A)	Concentração inicial de glicerol (g/L) (B)	Concentração inoculo(v|v%) (C)	**Sistema**	pH (A)	Concentração inicial de glicerol (g/L) (B)	Concentração inicial de inóculo (v|v%) (C)
1	5(-1)	30(-1)	10(-1)	**15**	6(0)	40(0)	30(1)
2	5(-1)	30(-1)	20(0)	**16**	6(0)	50(1)	10(-1)
3	5(-1)	30(-1)	30(1)	**17**	6(0)	50(1)	20(0)
4	5(-1)	40(0)	10(-1)	**18**	6(0)	50(1)	30(1)
5	5(-1)	40(0)	20(0)	**19**	7(1)	30(-1)	10(-1)
6	5(-1)	40(0)	30(1)	**20**	7(1)	30(-1)	20(0)
7	5(-1)	50(1)	10(-1)	**21**	7(1)	30(-1)	30(1)
8	5(-1)	50(1)	20(0)	**22**	7(1)	40(0)	10(-1)
9	5(-1)	50(1)	30(1)	**23**	7(1)	40(0)	20(0)
10	6(0)	30(-1)	10(-1)	**24**	7(1)	40(0)	30(1)
11	6(0)	30(-1)	20(0)	**25**	7(1)	50(1)	10(-1)
12	6(0)	30(-1)	30(1)	**26**	7(1)	50(1)	20(0)
13	6(0)	40(0)	10(-1)	**27**	7(1)	50(1)	30(1)
14	6(0)	40(0)	20(0)				

Inicialmente foi preparado um pré-inóculo, confeccionado a partir de uma cultura da levedura em caldo M1à 30±1ºC por 24 horas, do qual foram retiradas alíquotas com auxílio de uma alça de inoculação calibrada em 10µL, 0,5x 50mm de diâmetro (CIAL) e transferidas para frascos Erlenmeyer com capacidade para 500ml contendo 100 ml de meio mineral M1 (pH 7,0) adicionado de 20g/L de glicerol comercial como única fonte de carbono. O sistema foi mantido em incubadora termoestatizada a 200rpm, 30±1ºC por 24 horas (Tecnal, TE-420). Esse período foi oferecido para que o micro-organismo atingisse a fase exponencial de crescimento.

Após o desenvolvimento do pré-inóculo, alíquota de volumes distintos foram transferidas para frascos erlenmeyer com capacidade para 500mL

contendo 100mL de meio M1, nos quais os experimentos foram realizados, de acordo com as condições apresentadas na Tabela 7. O tempo de incubação foi de 96 horas em incubadora termoestatizada a 200 rpm a 30±1ºC. Ao final do período, alíquotas foram centrifugadas a 704g (Fanen,206) e em seguida, as células foram lavadas três vezes com água destilada estéril para proceder a quantificação das células.

Os experimentos de produção do bioproduto foram conduzidos em erlenmeyer de 500mL contendo 100mL do meio M1 nas condições estabelecidas pelo planejamento experimental de pH e concentração de glicerol, temperatura 30±1ºC sob agitação de 150rpm em incubadora termoestatizada (Tecnal, TE- 420) por 5 dias. O inóculo foi preparado nas mesmas condições de processo durante 48 horas; uma alíquota de 10 mL foi transferida para inoculação dos 100 mL do meio.

Durante 5 dias, em períodos de 24 horas, foram quantificados ~~as~~ concentrações de células, consumo de glicerol, acidez total, tensão superficial e índice de emulsificação (MORITA et al., 2007; GARAI-IBABE et al., 2008). Seção 4.4.

*4.4. Determinações analíticas**

4.4.1. Determinação do teor de glicerol residual

Foi utilizado para a determinação de glicerol um método adaptado ao descrito por Coks e Van Rede (1966) *apud* Leal (2004), utilizando técnica de titulação indireta. O princípio do método consiste na reação do glicerol presente na amostra com periodato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) em solução aquosa ácida para produzir formaldeído e ácido fórmico. A quantificação do ácido fórmico foi usado como medida indireta da concentração do glicerol. As amostras foram diluídas 1:1 com água destilada. Aproximadamente, 5 a 7 gotas do indicador azul de bromotimol foram adicionadas ao meio que posteriormente foi acidificado com ácido sulfúrico 0,4mol/L até atingir coloração verde. A solução foi posteriormente neutralizada com hidróxido de sódio 0,05 mol/L até atingir coloração azul. A seguir, 20 ml de solução de periodato de sódio foram adicionadas à amostra que foi mantida em repouso ao abrigo da

luz durante 30 minutos. Passado o período de repouso, foram adicionados 2 ml de etilenoglicol e o sistema foi novamente deixado repouso ao abrigo da luz por 20 minutos. Após o período a amostra foi diluída em 60 mL de água destilada e titulada com solução de hidróxido de sódio 0,125 mol/L utilizando potenciômetro(DIGIMED, DM-20) para determinar o ponto final, ao obter-se pH 8,1.

O teor de glicerol foi calculado através da seguinte equação 1:

$$G = (9{,}209N \times Vg / Va) \qquad \text{[Equação 1]}$$

Onde: G - Teor de glicerol, N - Normalidade da solução de hidróxido de sódio, Vg - Volume gasto na titulação, Va – Volume da amostra.

*Alíquotas do meio de cultivo retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos de 24h, foram submetidos às análises. As amostras foram centrifugadas a 1811xg por 25 minutos, e os sobrenadantes foram utilizadas para determinação dos teores de glicerol.

Para a determinação das respostas índice de emulsificação e tensão superficial foram utilizadas amostras do caldo fermentado com a presença das células. Testes preliminares confirmaram melhores resultados na presença de células junto ao caldo fermentado, devido provavelmente à presença de lipídeos na parede celular da levedura.

4.4.2. Determinação do índice de degradação do glicerol

O índice de degradação do glicerol foi determinado pela equação 2:

$$\%D = [(Gf \times 100) / Gi] - 100 \qquad \text{[Equação 2]}$$

Onde: %D – índice de degradação do glicerol, Gf – Concentração final do glicerol, Gi – Concentração inicial do glicerol.

4.4.3. Índice de emulsificação

O meio de cultivo após o processo foi utilizado para determinar o índice de emulsificação pelo método adaptado e descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Para determinação do índice foram utilizados 5,0 mL do líquido fermentado e 5,0 mL de querosene de aviação (Figura 9), homogeneização em vórtex por 2 minutos, a 25º C. A leitura foi realizada através de medição da altura da emulsão formada após 24 horas de repouso. O índice de emulsificação foi calculado através da equação: Índice de emulsificação (%) = H_e X 100 / H_t, onde H_e = altura da emulsão; H_t = altura total do líquido.

Figura 9- Aspecto da emulsificação do querosene de aviação.

4.4.4. Tensão superficial

A tensão superficial foi medida em tensiômetro da marca Fisher modelo 21, utilizando um anel de platina-iridio. As análises foram realizadas 25±1ºC e o aparelho foi previamente calibrado conforme o método descrito por Du Nouy (COOPER E ZAJIC,1979).

4.4.5. Determinação da massa seca da biomassa

A biomassa foi quantificada relacionando-se a absorvância em comprimento de onda de 650 nm em espectrofotômetro (Hach® Mod Oddyssey), com massa seca obtido a 80°C em estufa (Soc. Fabbe® modelo 119). Para ambas determinações as células foram previamente lavadas três vezes com água destilada.

A Absorvância$_{650nm}$ correspondeu a 0,42 g/L de células secas de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678

4.4.6. pH

Os valores de pH nas amostras foram determinados utilizando potenciômetro digital DM-20, com precisão de ±0,01, calibrado com soluções tampão fosfato 4,0 e 7,0 a 25 ºC.

4.4.7. Análises Cromatográficas

As concentrações finais de glicerol e de ácidos orgânicos foram determinadas por métodos cromatográficos, variando os dados da análise e o tipo de aparelho, conforme a Tabela 8. Todas as amostras e as fases móveis foram filtradas em membranas com porosidade de 0,22 µm não estéreis. As amostras foram somente diluídas com a fase móvel (1/9).

Tabela 8 - Características das análises cromatográficas para os diferentes substratos.

	Glicerol	Ácidos orgânicos
Aparelho	HPLC equipado com detector de Ultra Violeta Bomba: Waters 600 Pump Detector: Waters 2487 Coluna: HiperREZ XP Organic Acid/ Thermo Scientific	HPLC equipado com detector de Infra-vermelho Bomba: 510 pump Detector: 2414 Waters Coluna: HPX 87-P Aminex Programa intregrador: Empower 2005 Waters
Dados da análise	Programa Integrador: Empower 2005 Waters Fase Móvel: 0,1% Ácido Fosfórico Vazão: 0,6 mm Comprimento de onda: 230nm	Fluxo: 0,6 mm Fase móvel: H2O Temperatura: 80 ºC

Experimentos em biorreator

4.5. Experimentos relacionados à agitação, temperatura e aeração

Os experimentos foram conduzidos em biorreator com capacidade para 3L marca Multigen New Brunswick Scientific (Figura 10) contendo 1L de meio M1 adicionado de 50 g/L de glicerol bruto e pH 6. Os valores das variáveis foram selecionados de acordo com a literatura: temperatura (20º, 30º e 40ºC), aeração (0,5, 1,5, 2,0 vvm) e agitação (400, 600, 800 rpm).

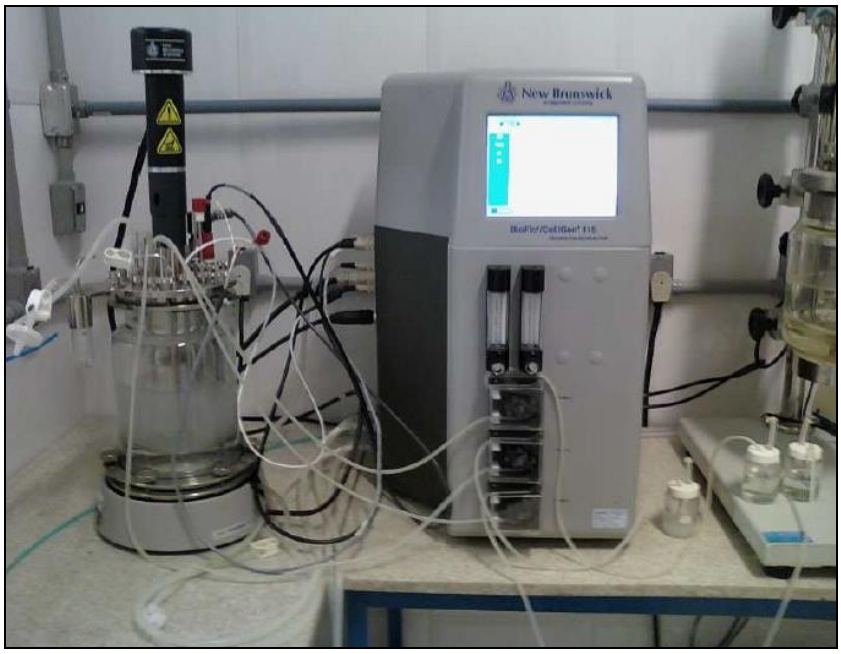


Figura 10- Biorreator utilizado no experimento, capacidade de 3L, modelo Bio Flo/ Celligen 115, New Brunswick Scientific (New Jersey, EUA).

4.6. Extração do Biossurfatante

Para a quantificação do biossurfatante produzido, 50 mL do caldo fermentado livre de células e com células foram tratados com etanol a 95% v/v e resfriados a temperatura de ± 5ºC. A mistura foi mantida em geladeira, à mesma temperatura, por 48 horas. Após este tempo o precipitado formado foi filtrado em equipamento Millipore® com papel de filtro Wathman® 44 e armazenado em placa de Petri mantida em dessecador (adaptado de FREITAS et al, 2009).

4.7. Purificação

O biossurfatante produzido foi tratado conforme Pimenta (2006). O método baseia-se na dissolução em uma solução aquosa de NaCl, precipitação com etanol a 95% v/v, ressolubilização em água, separação por precipitação e lavagem durante 10 a 15 minutos com soluções alcoólicas de concentrações crescentes em etanol: 70%, 80% e 90% (v/v), até etanol absoluto.

4.8. Caracterização do Biossurfatante produzido por análises qualitativas e quantitativas.

4.8.1. Determinação da Concentração Micelar Crítica

A concentração micelar crítica do biossurfatante foi determinada por tensiometria do anel (tensiômetro modelo K11, KRUSS). O método foi aplicado usando-se soluções do produto bruto em diferentes concentrações e a leitura da tensão superficial foi realizada em tensiômetro, utilizando um anel de platina-iridium. As análises foram realizadas a 25±1ºC (OZDEMIR; PEKER e HELVACI, 2004).

Com os valores de tensão superficial, foi elaborado um gráfico de tensão superficial versus logaritmo natural (lnC) da concentração, sendo o valor da CMC o ponto de descontinuidade no gráfico.

4.8.2. Determinação do Índice de Emulsificação em Diferentes Temperaturas e Concentrações de NaCl

A atividade emulsificante foi determinada para cada sistema listado na Tabela 9. Este ensaio teve como objetivo avaliar a estabilidade do biossurfatante bruto e puro em condições de salinidade semelhantes à água do mar e em níveis superiores a esta salinidade, associadas a diferentes temperaturas, conforme metodologia descrita por Abdel-Mawgoud, Aboulwafa, Hassouna (2009). Para realização do ensaio, 2 mL da solução em estudo foi transferida para um tubo de ensaio coberto por papel alumínio, mantido em estufa por uma hora na temperatura teste. Após este período, o tubo de ensaio foi retirado e deixado em repouso até atingir a temperatura do ambiente, adicionando-se posteriormente 2 mL de querosene de aviação para avaliação do índice de emulsificação.

Tabela 9- Planejamento experimental em relação ao índice de emulsificação em diferentes temperaturas e concentrações de NaCl.

Sistemas	NaCl (% m/v)	Temperatura (^oC)
1	3,5	50
2	5,5	50
3	3,5	100
4	5,5	100
5	4,5	75
6	4,5	75

4.8.3. Ensaio de tolerância ao cálcio

Foi avaliado o índice de emulsificação do querosene de aviação por soluções a 7,0 g/L de biossurfatante bruto e puro adicionados de $CaCO_3$ em diferentes concentrações (Tabela 10), com objetivo de observar o comportamento emulsificante do biossurfatante frente a diferentes concentrações de carbonato de cálcio, principal composto das rochas reservatório de petróleo.

Tabela 10- Ensaio de tolerância ao cálcio

Experimentos (7,0 g/L)	$CaCO_3$ (g/L)
1 e 1*	0,1
2 e 2*	1,0
3 e 3*	10

*Indica a duplicata.

4.8.4. Ensaio de índice de emulsificação em diferentes matérias-primas

Soluções de 7,0 g/L do biossurfatante puro e bruto foram avaliados em relação ao querosene de aviação, biodiesel, óleo cru e hexano.

4.8.5. *Análise Termogravimétrica (TGA)*

As amostras a partir do extrato puro e bruto foram obtidas a partir do método de precipitação com etanol 95%v/v a uma temperatura de 4+1ºC. O equipamento utilizado para as análises térmicas foi um analisador termogravimétrico modelo TGA- Q500, da TA Instruments (USA). A análise foi efetuada no intervalo entre 200ºC e 700ºC, em atmosfera inerte (nitrogênio) e taxa de aquecimento de 20ºC/min. O aparelho TGA-Q500 utiliza, aproximadamente, vazão de nitrogênio de 40 mL/minuto na balança e 60 mL/minuto na amostra. Nesta análise foram obtidas curvas de perda de massa e a primeira derivada correspondente (DTA), realizada no Laboratório de Apoio Instrumental (LAPIN 1) do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano.

O experimento consiste, basicamente, em depositar a amostra do em uma cápsula suspensa por um fio metálico de platina conectado a uma balança este conjunto é inserido em um forno. A curva de aquecimento é programada e as medidas de tempo, temperatura e massa da amostra foram efetuadas automaticamente. O equipamento possui, além do forno e da balança já mencionados, controladores de temperatura e um sistema computadorizado de aquisição de dados.

4.8.6. *Análise espectrofotométrica na região do infravermelho com transformada de Fourrier (FTIR)*

A análise espectrofotométrica na região do infravermelho foi realizada no Laboratório de Apoio Instrumental (LAPIN 1) do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano em espectrômetro FTIR (modelo Excalibur 3100,

Varian) e com acessórios MIRacle ATR(PIKE Technologies), todas com 100 aquisições e 4cm^{-1} de resolução.

4.9. Aplicação do biossurfatante em solo contaminado com compostos hidrofóbicos

A amostra de solo (franco-argiloso) utilizada no experimento foi cedido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), sendo procedente de local sem histórico prévio de contaminação, da cidade de São Paulo – SP, autoclavado previamente. O solo utilizado foi peneirado em malha abaixo de 1 *mesh*, homogeneizado por mistura e distribuído em saco plástico com capacidade aproximada de 500Kg, sendo armazenado à temperatura ambiente até o momento do uso.

Amostras de 20 g do solo foram contaminadas artificialmente com 10% de óleo diesel. As porções de areia contaminadas transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 ml foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- adição de 40 ml de água destilada (Controle),
- adição de 40 ml do extrato puro,
- adição de 40 ml de uma solução do biotensoativo bruto isolado no valor da CMC (7g/L) e
- adição de 40 ml de uma solução do biotensoativo bruto isolado cinco vezes o valor da CMC (35g/L).

As amostras foram incubadas em shaker (180 rpm) durante 24 h a temperatura de 28ºC e em seguida foram centrifugados a 5000 × g durante 20 minutos para a separação da solução de lavagem e a areia. O pH das amostras foi também medida antes e após o tratamento. Foi observado o potencial emulsificante da solução de lavagem (modificado da Silva et al., 2009).

4.10. Extração de lipídeos totais

A extração de lipídeos foi realizada através da suspensão da massa celular em clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) e posterior trituração em *Waring blender* por dois minutos seguido de agitação por duas horas à temperatura ambiente (DA SILVA *et al*., 2004, CALIXTO, 2010). O extrato lipídico foi filtrado a vácuo em filtro de vidro sinterizado. O resíduo celular foi ressuspenso em clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) e foi repetido o mesmo procedimento anterior. Em seguida, os dois extratos foram reunidos e evaporados à secura em evaporador rotatório a vácuo a temperatura de 40 ºC. O extrato lipídico bruto foi submetido à partição de Folch (clorofórmio / metanol / KCl 0,75%; 8:4:3 v/v) e o sistema foi deixado em repouso durante a noite para separação das fases (FOLCH *et al.,* 1957). Determinaram-se as massas dos lipídeos em balança (Shimadzu AY 220).

4.10.1. Fracionamento dos Triglicerídios

A fase inferior resultante da partição de Folch foi retirada e evaporada à secura. Em seguida, tal fase foi dissolvida em clorofórmio e analisada por cromatografia em camada fina (TLC) em placa de sílica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany). O solvente de corrida utilizado foi éter de petróleo/éter etílico/ ácido acético- 80:20:1 (v/v) e as bandas foram visualizadas pela revelação com vapores de iodo (Calixto, 2010) e confirmada com solução de molibdênio em H_2SO_4 (Berg et al., 2002). A identificação dos triglicerídios foi feita por comparação com a mobilidade cromatográfica utilizando como padrões: óleo de soja; azeite de oliva; fosfatidiletanolamina; ácido fosfatídico; palmitato colesterol; colesterol.

Após a confirmação da presença dos triglicerídeos de interesse, a amostra bruta foi aplicada em uma coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck, 18 cm). A coluna foi eluída com volumes iguais de clorofórmio, acetona e metanol, nessa sequência. As frações coletadas foram concentradas e analisadas por cromatografia em camada fina (TLC) em placa de sílica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany), conforme descrito anteriormente.

A fração rica em lipídeos parcialmente purificada (fração acetona) foi submetida ao fracionamento em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck, 18 cm). Para eluição foram usados como sistemas de solventes éter de petróleo /éter etílico nas proporções 100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 0:100 (v/v). As

frações eluídas foram recolhidas em tubos (5ml/ tubo), concentradas e analisadas por TLC conforme descrito anteriormente. Por fim, as frações contendo triglicerídeos foram reunidas e analisadas por TLC.

4.10.2. Identificação dos lipídeos

Aproximadamente 2,0 mg de amostra de TAGs foram solubilizadas em 1,0 mL de HCl:MeOH 1M e deixadas em vias fechados por 4h a 80ºC. Após a reação de transesterificação (Figura 11), o material foi seco, sob fluxo de ar, solubilizado em 1,0 mL de n-hexano, e particionado com água destilada 3vezes. A fase orgânica contendo os metil ésteres de ácidos graxos foi seca e solubilizada em 1,0 mL de acetona antes de ser analisada por GC-MS. Os picos foram identificados por seus espectros de massa utilizando-se um espectrômetro de massa acoplado ao cromatógrafo gasoso (Finnigan 4000 Gas Chromatography/Mass Spectrometer Electron Impact Mode).

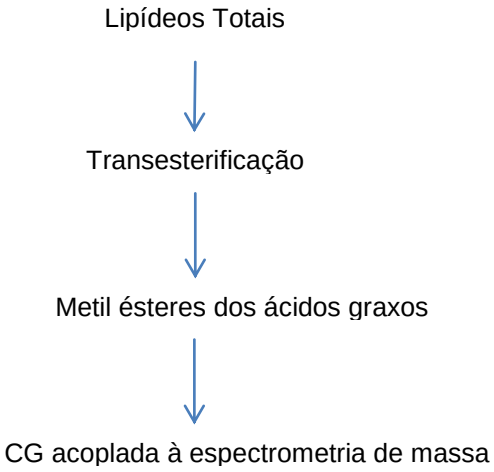


Figura 11- Resumo do processo descrito a cima para identificação de lipídeos.

Capítulo 5

Resultados e discussão

5.1 Seleção da linhagem de *Yarrowia lipolytica*

A partir de três linhagens da levedura *Yarrowia lipolytica*: ATCC 18943, IMUFRJ 52335 e IMUFRJ 50678, testes de produção de ácidos orgânicos e biossurfatante (expresso na diminuição da tensão superficial) foram realizados com o objetivo de selecionar micro-organismo, assim como, o bioproduto de maior relevância produzido.

Após 96 horas de processo foram quantificadas as concentrações de ácidos orgânicos e determinação de tensão superficial do meio (Tabela 11). A linhagem IMUFRJ 50678 além de produzir ácidos orgânicos diminuiu a tensão superficial em aproximadamente 50%. Vale ressaltar que de acordo com a literatura a levedura em questão é capaz de sintetizar ácidos orgânicos, biossurfatantes e acumular lipídeos (AMARAL et al., 2006; TRINDADE et al., 2008; BEOPUOLOS et al., 2009 e AXEL et al., 2010).

Tabela 11- Produção de ácidos orgânicos por *Yarrowia lipolytica* e tensão superficial (mN/m) do meio de cultivo.

Linhagem	Ácidos Orgânicos (g/L)			Tensão Superficial (mN/m)
	Ácido cítrico	Ácido oxálico	Ácido α-cetaglutarato	
YL51670	N.D.	2,15	0,16	49,94
YL2/51	N.D.	6,41	0,35	50,16
YL50678	2,79	8,90	N.D.	29,27

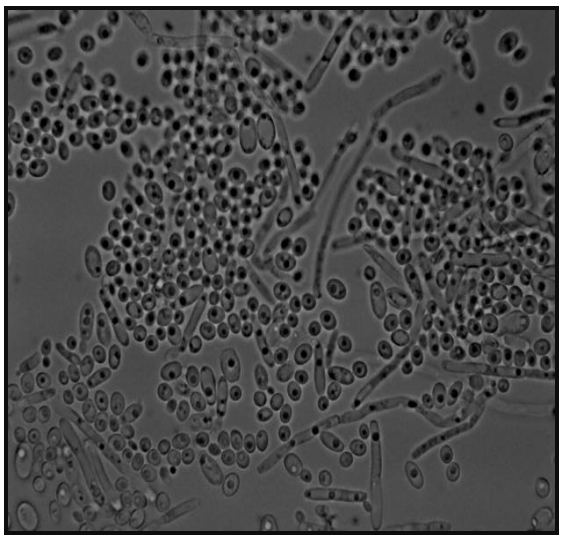
*Condição de processo: meio M1, 30 g/L de glicerol P.A., pH 6, 28ºC, 160 rpm, Tensão superficial do meio:56,51mN/m.
***** N.D.: não detectado

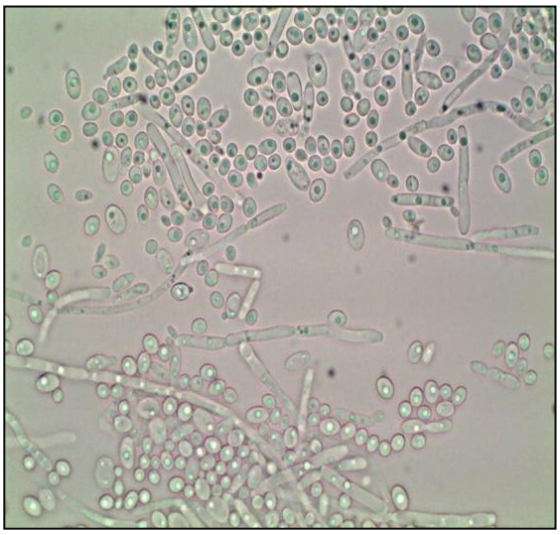
De acordo com os resultados obtidos os micro-organismos produziram baixos teores de ácidos orgânicos, entretanto, a linhagem YL 50678 promoveu diminuição significativa da tensão superficial do meio em 51,79 %. Em vista disso o trabalho passou a ser direcionado para produção de biossurfatante.

Referências têm sido publicadas relacionadas à produção de ácidos orgânicos e lipídio a partir de glicerol utilizando *Yarrowia lipolytica,* apresentando resultados distintos aos nossos (PAPANIKOLAOU et al., 2002; PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002; PAPANIKOLAOU et al.,2008). Os autores obtiveram rendimentos de 0,29 g/g de ácido cítrico e 0,05-0,10 g/g de lipídio por massa seca, sendo nossos rendimentos de aproximadamente 0,02 g/g de ácido cítrico e 0,42 g/g de lipídio por massa seca. Convêm salientar que os experimentos foram conduzidos utilizando as mesmas condições descritas na literatura, entretanto, os resultados não foram corroborados. Acredita-se que a diferença de resultados tenha sido devido às características das linhagens.

As colônias de *Yarrowia lipolytica* podem apresentar células em elevação, e em geral, curvatura convexa. Sob algumas condições de cultivos as células desta levedura podem apresentar pseudofilamentos e/ou formas elípticas típicas de levedura, como apresentado na Figura 12. Que representa os aspectos morfológicos da levedura de maior eficiência em relação ao teste de produção de ácidos orgânicos vista por microscopia.

Figura 12- Aspectos morfológicos da *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 vista por microscopia óptica- aumento de 1000 vezes (crédito: Jamille Lima)





O micro-organismo selecionado para o estudo foi capaz de produzir ácidos orgânicos, lipídeos e biossurfatante, corroborando com a literatura. André et al. (2010), pesquisando duas espécies de fungos, mostraram sua capacidade de utilizarem o glicerol como única fonte de carbono, em processo de batelada, produzindo ácido oxálico e lipídeos celulares. A linhagem *Aspergillus niger* NRRL 364 em aproximadamente 100 horas promoveu uma produção de 2,2 g/L de lipídio e 4,7 g/L de ácido oxálico em meio contendo 30g/L de glicerol, já a *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678, em nossos experimentos, no mesmo intervalo de tempo produziu 8,9 g/L de ácido oxálico. Papanikolaou e Agellis (2002) utilizando a cepa de *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7) nas mesmas condições de cultivo do presente estudo e intervalos de tempo similares obtiveram um rendimento entre 0,05-0,10 g de lipídio por grama de massa seca^{-1} ($Y_{L/X}$). Em contrapartida, *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 obteve um rendimento ($Y_{L/X}$) de 0,42g e 1,95g de lipídio por grama de massa seca em 48 e 96 horas, respectivamente.

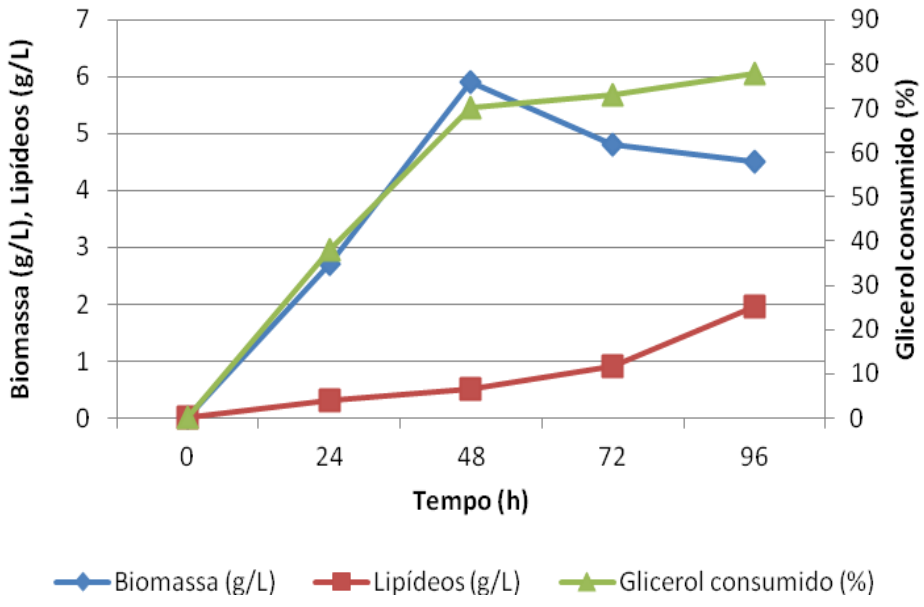
Os pesquisadores ainda obtiveram uma porcentagem de lipídio por massa seca, de aproximadamente 42%, empregando processo de fermentação contínuo, diferente deste trabalho.

Nas mesmas condições de processo do presente trabalho, porém apresentando concentração de 10g/L de glicerol no meio de cultura,

Papanikolaou et al.(2008) apresentaram uma produção de 4,4 g/L de lipídio acumulado no micro-organismo *Motierella isabelina* ATHUM 2935, correspondendo a 51% do lipídio por massa seca, o fungo apresentou uma concentração máxima de 2,0±0,5 g/L de ácido cítrico. A linhagem *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678, em presença de 30 g/L de glicerol P.A. apresentou uma concentração máxima de 2,79 g/L ($Y_{cit/glol}$ = 0,02g/g), inferior a *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 que em processo de batelada apresentou um rendimento de 0,29 g/g.

A Figura 13 apresenta o desempenho do micro-organismo em relação à produção de lipídio, biomassa e o consumo de glicerol em um intervalo de tempo de 96 horas, em meio mineral M1 contendo 30 g/L de glicerol, pH 6, concentração de 10% de inóculo e temperatura de 28±1ºC. As condições foram escolhidas a partir do crescimento celular.

Figura 13- Produção de biomassa (g/L), lipídio (g/L) e consumo de glicerol (%) por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678



A Figura 13 corrobora as informações citadas anteriormente, no tempo de processo o micro-organismo consumiu aproximadamente 70% de glicerol e sintetizou em 48 horas, grande quantidade de ácido oxálico, 8,9 g/L (dados não apresentados) e biomassa (5,9 g/L). A maior concentração de lipídeo (1,95 g/g) foi observada somente em 96 horas de processo.

5.2. Experimentos em *shaker* para avaliação da condição ótima para produção do biossurfatante

5.2.1. Crescimento celular da *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678.

A Tabela 12 apresenta o sumário da matriz experimental, com os níveis inferior (-1), superior (+1) e central (0). Os valores apresentados são referentes às médias dos valores do crescimento celular do micro-organismo.

Substrato, pH, aeração e temperatura ótima afetam diretamente o modo de crescimento de espécies distintas, os fatores do ambiente têm profunda influência sobre o crescimento dos fungos.

Tabela 12- Crescimento celular da *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 no tempo de processo.

Sistemas	pH	Concentração inicial de glicerol (g/L)	Concentração inicial de biomassa (%)	Crescimento celular (g/L)			Produtividade em 48h (gL/h)
				48h	72h	96h	
1	5	30	10	1,5	2,7	1,7	0,03
2	5	30	20	1,2	2,7	9,6	0,02
3	5	30	30	1,4	2,6	1,2	0,02
4	5	40	10	1,6	3,1	1,5	0,03
5	5	40	20	1,7	3,1	1	0,03
6	5	40	30	2	2	1,3	0,04
7	5	50	10	1,5	1,5	1,6	0,03
8	5	50	20	2,1	2,1	2,2	0,04
9	5	50	30	2,6	2,6	3,4	0,05
10	6	30	10	6,3	5,2	6,1	0,13
11	6	30	20	5,2	5	4	0,10
12	6	30	30	5,9	4,9	4,6	0,12
13	6	40	10	3,5	5,6	4,5	0,07
14	6	40	20	5,5	5,8	4,1	0,11
15	6	40	30	5,2	5,6	3,6	0,10
16	6	50	10	1,5	1,6	1,9	0,03
17	6	50	20	5,4	5,7	5	0,11
18	6	50	30	5,5	6,2	4,4	0,11
19	7	30	10	1,2	6	6,1	0,02
20	7	30	20	1,3	4,6	3,9	0,02
21	7	30	30	2,2	6,1	5,7	0,04
22	7	40	10	2,1	4,9	3,8	0,04
23	7	40	20	2,1	4,9	4,6	0,04
24	7	40	30	1,7	5,6	4,3	0,03
25	7	50	10	2,2	6	5	0,04
26	7	50	20	1,8	6,1	6,2	0,03
27	7	50	30	4,3	6,7	6,1	0,08

*A Absorvância$_{650nm}$ correspondeu a 0,42 g/L de células secas de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678

Nos sistemas com pH 5 e concentrações de 30 e 40 g/L de glicerol inicial os maiores crescimentos ocorreram no intervalo de tempo de 72 horas, assim como todos os sistemas com pH neutro, consumindo uma maior concentração de glicerol. Nos sistemas com pH 6 e concentração mínima de glicerol de 30 g/L ocorreu logo nas primeiras 48 horas um crescimento entre 5,0 e 6,3 g/L, com produtividade máxima de 0,13 gL/h . Juszczyk et al.(2013) utilizando cepas de *Yarrowia lipolytica* obtiveram utilizando 25 g/L de substrato inicial, um crescimento de 12g/L e uma produtividade de 1,3gL/h, resultados superiores aos obtidos nesse estudo.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 14) apresenta a interação mais significativa entre pH(A)/concentração inicial de biomassa (C), relacionado a variável crescimento celular. Este gráfico indicou que quando A e C estavam em níveis extremos (-1, +1) o crescimento celular diminuiu, porém quando A e C estavam em um nível central (0) a resposta se tendencia ao seu nível máximo.

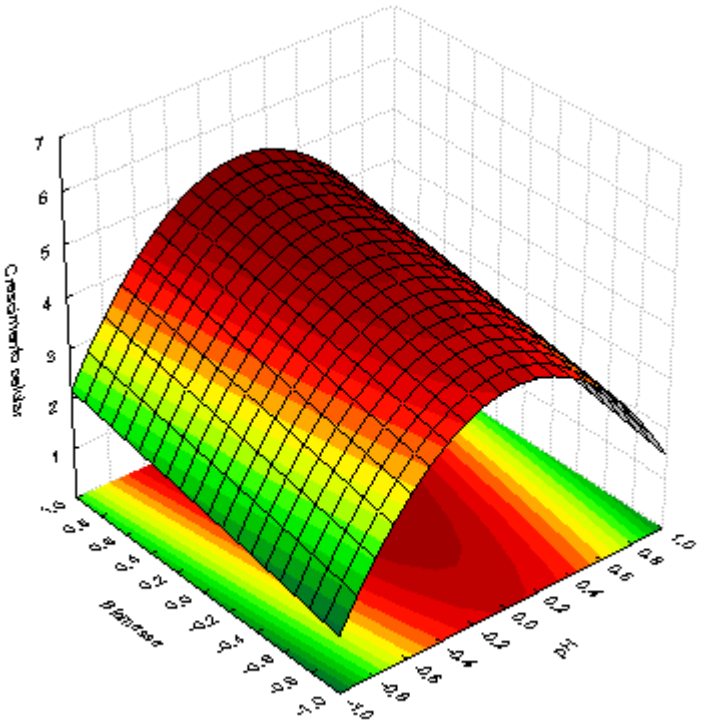


Figura 14- Gráfico de Superfície de Resposta da interação biomassa /pH; resposta; crescimento celular (48h).

Chatzifragkou et al. (2011) estudaram 15 fungos, dentre leveduras e zigomicetos, cultivando todos em meio mineral contendo 30 g/L de glicerol

como substrato, pH 6 e temperatura de 28±1ºC, observaram que em intervalo de tempo de 48-50 horas, a levedura *Rhodotorula* sp. foi capaz de produzir aproximademente 4,8g/L de biomassa e 0,3g/L de lipídio. *Yarrowia lipolytica* LFMB 19 foi o único micro-organismo sintetizador de ácidos orgânicos no estudo, produzindo no mesmo intervalo de tempo 5,8 g/L de biomassa, mesmo valor encontrado no presente estudo e produção de 10% (g/g) de lipídio.

Analisando os demais sistemas relacionados ao pH 6, pode-se perceber que os sistemas com concentração de glicerol de 40 e 50 g/L, independente da concentração inicial de inóculo, somente apresentaram melhores resultados após 72 horas, provavelmente devido a uma possível inibição do substrato.

5.2.3. Índice de emulsificação em querosene de aviação (QAV)

A matriz do planejamento experimental relacionado à resposta do índice de emulsificação é representada na Tabela 13, com nível superior (1), inferior (-1) e central (0). Os resultados apresentados são as médias entre as duplicatas.

Observa-se que os valores máximos para o índice de emulsificação foram superiores a 60% em alguns sistemas no tempo de 48 horas, atingindo valor máximo de 64,31%. Tal valor foi obtido no sistema 11, em que os níveis para pH e concentração inicial de biomassa foram centrais e nível inferior para concentração inicial de glicerol. Nos tempos de 72 e 96 horas os valores foram bastante similares. Para um estudo detalhado das influências dos parâmetros nesta resposta (E_{24}) o tempo de 48 horas parece ser o mais apropriado industrialmente, pois neste tempo alguns sistemas apresentaram uma atividade emulsificante bastante eficiente.

Tabela 13- Índice de emulsificação em querosene de aviação (E_{24}) no tempo de processo.

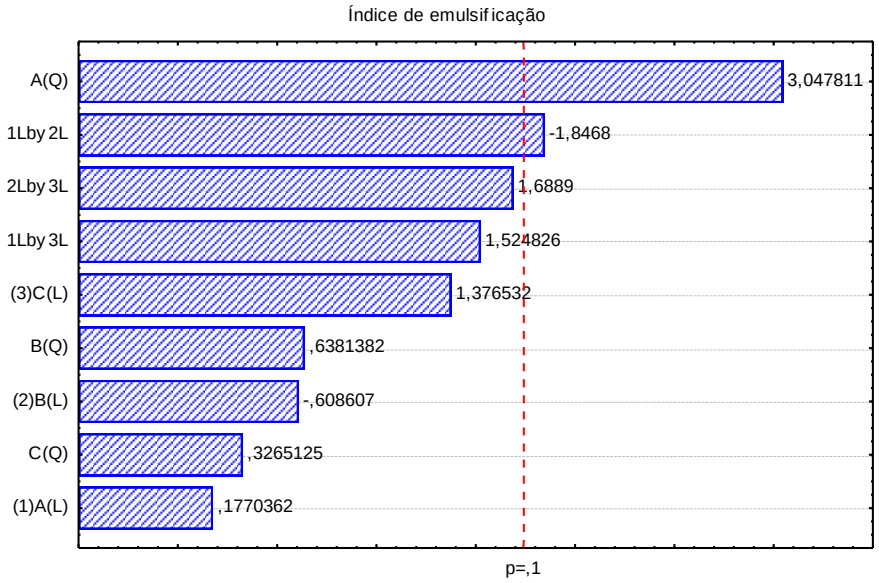
Sistemas	pH	Concentração inicial de glicerol (g/L)	Concentração inicial de biomassa (%)	Índice de emulsificação (%)		
				48h	72h	96h
1	5	30	10	59,31	66,66	67,12
2	5	30	20	13,62	63,21	63,13
3	5	30	30	8,18	63,21	61,65
4	5	40	10	44,16	61,65	57,24
5	5	40	20	28,85	60,03	63,49
6	5	40	30	23,7	61,5	64,31
7	5	50	10	8,89	59,34	66,73
8	5	50	20	55,65	65,29	66,52
9	5	50	30	53,71	64,07	61,55
10	6	30	10	48	56,74	62,38
11	6	30	20	64,31	64,63	67,25
12	6	30	30	62,85	65,83	70,62
13	6	40	10	47,64	48,32	59,62
14	6	40	20	60,22	60,69	64,79
15	6	40	30	58,2	64,37	66,34
16	6	50	10	36,36	61,39	69,27
17	6	50	20	53,33	63,46	64,1
18	6	50	30	60,9	67,17	66,59
19	7	30	10	11,2	62,03	59,02
20	7	30	20	55,09	57,37	59,62
21	7	30	30	55,43	57,99	54,31
22	7	40	10	44,94	65,08	59,87
23	7	40	20	48,75	63,13	53,87
24	7	40	30	38,77	63,11	56,01
25	7	50	10	14,83	58,56	60,83
26	7	50	20	2,92	43,4	57,11
27	7	50	30	42,79	52,68	61,99

Das et al. (2009) estudando a produção de biossurfatante por micro-organismo marinho, observaram dentre várias fontes de carbono que a maior produção de biomassa foi em meio contendo glicerol P.A. Em 60 horas de processo o micro-organismo apresentou uma diminuição de tensão superficial de 57,74 % e um índice de emulsificação (E_{24}) de 80%. Nesse estudo a levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 também utilizando apenas o glicerol bruto como fonte única de carbono e energia apresentou uma diminuição da tensão superficial de 40,16% e um E_{24} de 64,31%, no intervalo de tempo de 48 horas. Bueno (2008) analisando a linhagem *Bacillus* sp 2C em meio mineral e

óleo diesel como única fonte de carbono, obteve em 48 horas de fermentação apenas 33,3% de índice de emulsificação.

A partir do planejamento experimental verificou-se a influência das variáveis independentes (pH, concentração inicial de glicerol e concentração inicial de biomassa) sobre os valores do índice de emulsificação, buscando definir as faixas ótimas de operação, que levem ao máximo desta resposta.

Os dados do planejamento experimental foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) que é responsável por gerar o Diagrama de Pareto (Figura 15).



A:pH, B:Concentração inicial de glicerol, C:Concentração inicial de inóculo.

Figura 15- Diagrama de Pareto;
Variável Índice de Emulsificação

No Diagrama de Pareto (Figura 15), foi verificado que os parâmetros que influenciaram no índice de emulsificação foram a variável pH (A), a interação entre pH/concentração inicial de glicerol (AB) e a interação entre concentração inicial de glicerol/concentração inicial de biomassa (BC), respectivamente. Para a interação entre pH/concentração inicial de glicerol, observou-se um efeito negativo, ou seja, quando este parâmetro passou de um nível superior (+1) para um nível inferior (-1) a resposta foi aumentada.

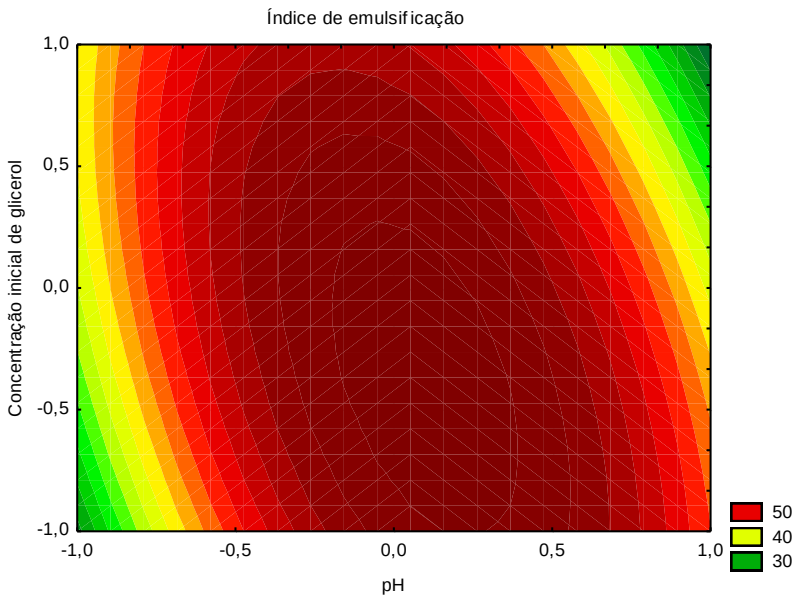


Figura 16- Gráfico de contorno da interação pH/concentração inicial de glicerol; resposta índice de emulsificação.

O gráfico de contorno (Figura 16) apresenta a interação mais significativa entre pH (A)/concentração inicial de glicerol (B), relacionado a variável índice de emulsificação. Este gráfico indicou que quando A e B estavam em um nível inferior, o índice de emulsificação diminui, porém quando A e B estavam em um nível central (0) a resposta se tendencia ao seu nível máximo.

5.2.4. Diminuição da Tensão superficial (DTS)

A Tabela 14 representa a matriz do planejamento experimental relacionado à diminuição da tensão superficial, com nível superior (1), inferior (-1) e central (0). Os resultados (figura 18) apresentados são as médias entre as duplicatas no tempo de 48 horas. O tempo foi selecionado a partir dos resultados da variável índice de emulsificação.

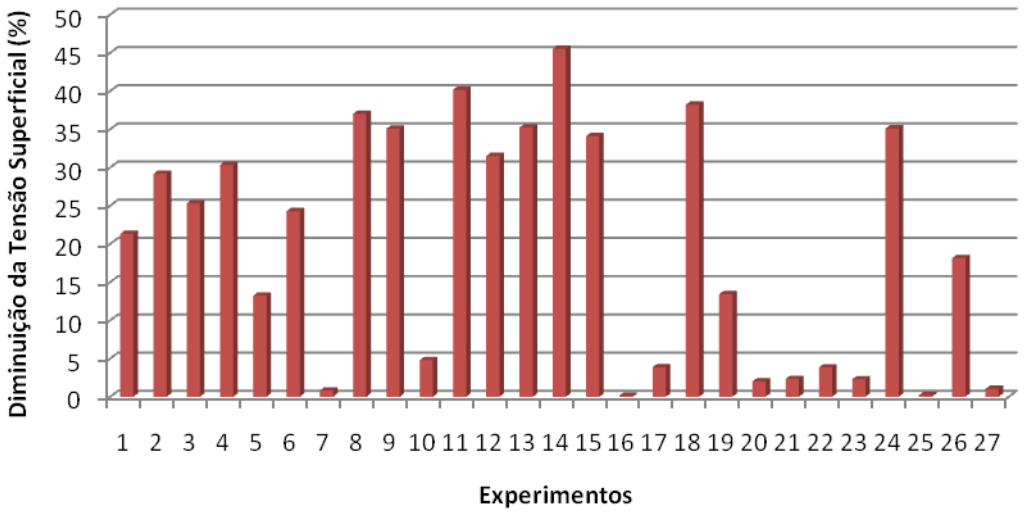
Tabela 14- Diminuição da Tensão superficial (DTS) no tempo de processo de 48 horas.

	pH	Glicerol (g/L)	Concentração inicial de biomassa (%)	DTS (%)		pH	Glicerol (g/L)	Concentração inicial de biomassa (%)	DTS (%)
1	5(-1)	30(-1)	10(-1)	21,31	**15**	6(0)	40(0)	30(1)	34,10
2	5(-1)	30(-1)	20(0)	29,18	**16**	6(0)	50(1)	10(-1)	0,14
3	5(-1)	30(-1)	30(1)	25,30	**17**	6(0)	50(1)	20(0)	3,85
4	5(-1)	40(0)	10(-1)	30,33	**18**	6(0)	50(1)	30(1)	38,23
5	5(-1)	40(0)	20(0)	13,24	**19**	7(1)	30(-1)	10(-1)	13,42
6	5(-1)	40(0)	30(1)	24,28	**20**	7(1)	30(-1)	20(0)	2,00
7	5(-1)	50(1)	10(-1)	0,81	**21**	7(1)	30(-1)	30(1)	2,33
8	5(-1)	50(1)	20(0)	37,02	**22**	7(1)	40(0)	10(-1)	3,84
9	5(-1)	50(1)	30(1)	35,07	**23**	7(1)	40(0)	20(0)	2,28
10	6(0)	30(-1)	10(-1)	4,80	**24**	7(1)	40(0)	30(1)	35,13
11	6(0)	30(-1)	20(0)	45,54	**25**	7(1)	50(1)	10(-1)	0,20
12	6(0)	30(-1)	30(1)	31,50	**26**	7(1)	50(1)	20(0)	18,14
13	6(0)	40(0)	10(-1)	35,23	**27**	7(1)	50(1)	30(1)	1,03
14	6(0)	40(0)	20(0)	40,16					

Tensão superficial do meio: 30 g/L- 56,51 mN/m; 40 g/L: 52,46 mN/m e 50 g/L: 49,35 mN/m.

Os sistemas 11 e 14 apresentaram uma diminuição da tensão superficial superior a 40%, passando a apresentar tensão superficial de 23,89 e 22,69 mN/m. Bueno (2009) utilizando meio contendo óleo diesel como única fonte de carbono e pH 6 apresentou apenas uma DST de 8,47%. Costa et al. (2006) utilizando a bactéria *Pseudomonas* LMI 6c e LMI 7a em presença de borra de soja conseguiram diminuir a tensão superficial de 60 mN/m para 31 mN/m. Fontes et al. (2010) trabalhando com *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50672 observaram uma melhor variação na tensão superficial (ΔTS), ΔTS 19,5 mN/m, utilizando concomitantemente glicerol (2%m/v) e glicose (4%m/v), em contrapartida, o presente estudo apresentou ΔTS de 10,97 e 12,30, respectivamente nos sistemas 11 e 14, utilizando apenas glicerol bruto.

O micro-organismo *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 se apresenta como potencial produtor de biossurfatante, visto que, alcançou diminuição na tensão superficial de 40% em alguns sistemas (Figura 17).



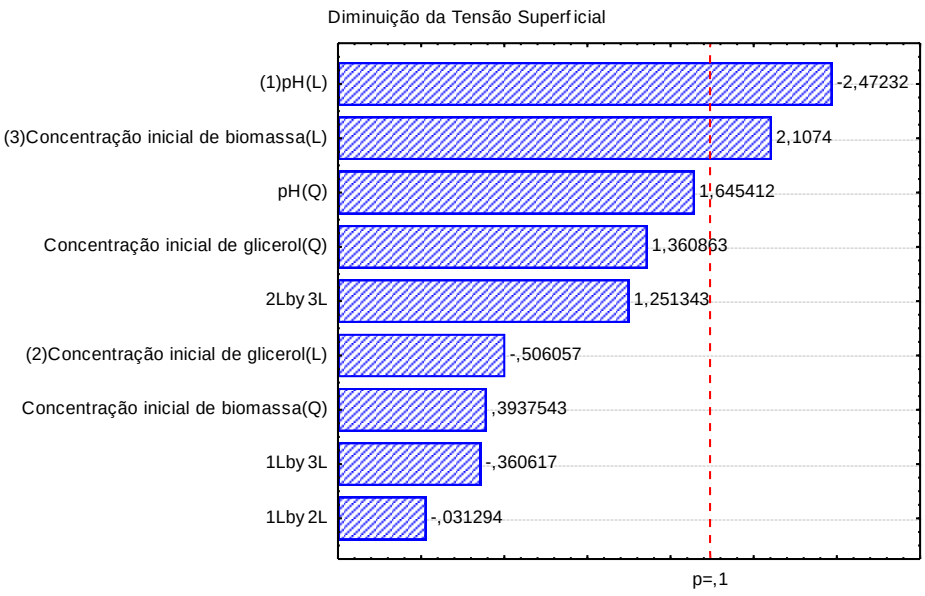
Experimentos: 1-A:5(-1), B:30(-1), C:10(-1); 2-A:5(-1),B:30(-1),C:20(0); 3-A:5(-1),B:30(-1),C:30(1); 4-A:5(-1),B:40(0),C:10(-1); 5-A:5(-1),B:40(0),C:20(0); 6-A:5(-1),B:40(0),C:30(1); 7-A:5(-1),B50(1),C:10(-1); 8-A:5(-1),B50(1),C:20(0); 9-A:5(-1),B:50(1),C:30(1); 10-A:6(0),B:30(-1),C:10(-1); 11-A:6(0),B:30(-1),C:20(0); 12-A:6(0),B:30(-1),C:30(1); 13-A:6(0),B:40(0),C:10(-1); 14-A:6(0),B:40(0),C:20(0); 15-A:6(0)B:40(0),C30(1); 16-A:6(0),B:50(1),C:10(-1); 17-A:6(0),B:50(1),C:20(0); 18-A:6(0),B:50(1),C:30(1); 19-A:7(1),B:30(-1),C:10(-1); 20-A:7(1),B:30(-1),C:20(0); 21- A:7(1),B:30(-1),C:30(1); 22-A:7(1),B:40(0),C:10(-1); 23-A:7(1),B:40(0),C:20(0); 24-A:7(1),B:40(0),C:30(1); 25-A:7(1),B:50(1),C:10(-1); 26-A:7(1),B:50(1),C:20(0); 27-A:7(1),B:50(1),C:30(1).

Figura 17- Gráfico da diminuição da Tensão Superficial por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678

Vale ressaltar que nos sistemas em que a tensão superficial foi modificada e o índice de emulsificação permaneceu sem mudanças significativas, um possível fator responsável por esta situação pode estar relacionada à produção de proteínas que de acordo com Wang et al.(2001) e Barros et al.(2007) pode contribuir para diminuição da tensão interfacial entre os componentes hidrofóbicos e hidrofílicos.

De acordo com o planejamento experimental verificou-se a influência das variáveis independentes (pH, concentração inicial de glicerol e concentração inicial de biomassa), buscando definir as faixas ótimas de operação, que levem ao máximo desta resposta.

Os dados do planejamento fatorial foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) que é responsável por gerar o Diagrama de Pareto (Figura 18).



A:pH, B:Concentração inicial de glicerol, C:Concentração inicial de inóculo.

Figura 18- Diagrama de Pareto;
Variável; Diminuição da Tensão Superficial.

Analisando o Diagrama de Pareto (Figura 18), pode-se verificar que os parâmetros que influenciaram a diminuição da tensão superficial foram o termos pH (A) e a concentração inicial de biomassa(C), respectivamente. Em relação ao pH observou-se um efeito negativo, ou seja, quando este parâmetro passou de um nível superior (+1) para um nível inferior (-1) a resposta foi aumentada. Já a concentração inicial de biomassa, apresentou um efeito positivo, isto é, quanto o parâmetro passou de um nível inferior (-1) para um nível superior (+1), houve um aumento na diminuição da tensão superficial, logo podemos ressaltar que a levedura obteve crescimento em seu pH ótimo, pH 5, sendo capaz de sintetizar o bioproduto, assim como em pH 7, onde a síntese em geral foi menor. Corroborando o estudo de Rodrigues et al. (2006), que sugere um ponto médio entre o pH ótimo de crescimento e o ótimo para a produção de um composto.

5.2.5. Consumo de glicerol por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678

A Tabela 15 apresenta o sumário da matriz experimental, com os níveis inferior (-1), superior (+1) e central (0). Os valores apresentados para consumo de glicerol são os valores médios.

Todos os sistemas apresentaram resultados promissores, em 48 horas de processo o micro-organismo consumiu mais de 65% do glicerol bruto inicial.

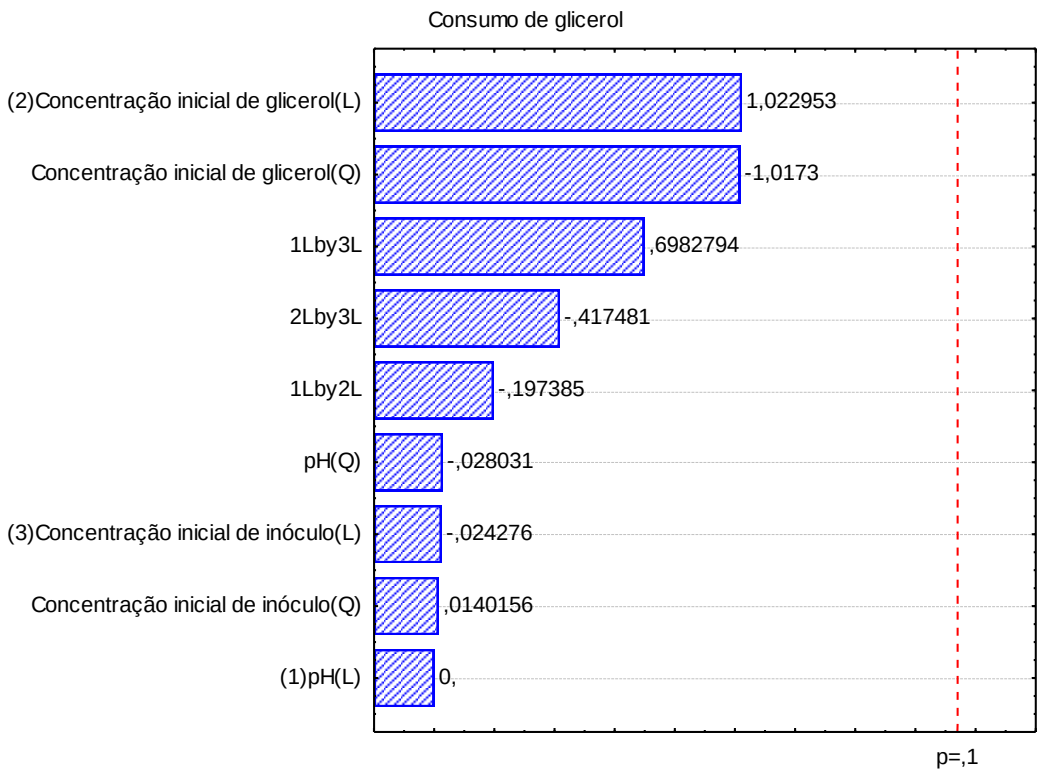
Na maioria dos sistemas, independentemente das variáveis, pH, concentração inicial de substrato e concentração inicial de biomassa a variação no consumo foi bastante similar, até mesmo relacionados ao tempo de cultivo.

Tabela 15 – Glicerol residual nos intervalos do processo.

Sistemas	pH	Concentração inicial de glicerol (g/L)	Concentração inicial de biomassa (%)	Glicerol residual (g/L))		
				48h	72h	96h
1	5	30	10	7,8	2,1	0,58
2	5	30	20	8,0	2,0	2,0
3	5	30	30	8,0	2,1	2,1
4	5	40	10	11,2	2,5	2,3
5	5	40	20	12,6	5,6	4,0
6	5	40	30	12,0	5,1	3,2
7	5	50	10	4,7	4,7	4,7
8	5	50	20	13,0	3,2	1,6
9	5	50	30	8,0	4,3	1,1
10	6	30	10	7,8	4,2	3,0
11	6	30	20	7,8	3,7	3,6
12	6	30	30	8,2	6,9	5,8
13	6	40	10	12,6	4,2	1,4
14	6	40	20	12,0	4,3	1,9
15	6	40	30	3,8	0	0
16	6	50	10	13,0	1,8	0
17	6	50	20	8,0	0	0
18	6	50	30	13,1	2,7	2,0
19	7	30	10	7,8	3,8	1,9
20	7	30	20	7,8	6,1	6,1
21	7	30	30	8,0	6,8	6,8
22	7	40	10	10,2	6,9	4,6
23	7	40	20	11,2	7,3	4,7
24	7	40	30	12,6	8,0	8,0
25	7	50	10	15,2	7,4	7,4
26	7	50	20	4,7	2,5	2,5
27	7	50	30	13,0	4,4	1,5

Diversos estudos sobre a utilização do glicerol como fonte única de energia e carbono já foram realizados com um número significativo de espécies de micro-organismos eucariotos, objetivando a produção de ácidos orgânicos e lipídeos celulares (CHI et al., 2007; EITHIER et al.2011). Como citado anteriormente, a levedura *Yarrowia lipolytica* tem capacidade de sintetizar uma diversidade de compostos a partir do glicerol como substrato.

No planejamento experimental verificou-se a influência das variáveis independentes (pH, concentração inicial de glicerol e concentração inicial de biomassa) sobre os valores do consumo de glicerol, buscando definir as faixas ótimas de operação, que levem ao máximo desta resposta.



A:pH, B:Concentração inicial de glicerol, C:Concentração inicial de inóculo.

Figura 19- Diagrama de Pareto
Variável: Consumo de Glicerol.

No Diagrama de Pareto (Figura 19), verificou-se que os parâmetros se comportaram de forma insignificante. Portanto nenhuma das variáveis independentes influenciou a variável dependente, consumo de glicerol.

A Tabela 17 resume os resultados significantes obtidos nessa fase experimental, ficando evidente que no tempo de 48 horas de fermentação, as respostas apresentaram melhores resultados. O valor de pH 6 apresentou melhores resultados, porém em relação a concentração inicial de glicerol e inicial de biomassa, todas as condições estudadas apresentaram resultados similares aos melhores resultados expressos na tabela a seguir, portanto as condições escolhidas foram máxima e mínima, respectivamente para o parâmetro de concentração inicial de glicerol e concentração inicial de biomassa, visto que o objetivo da tese é encontrar uma finalidade para o glicerol bruto proveniente da indústria do biodiesel.

Tabela 17- Respostas máximas no tempo de 48 horas de processo.

Respostas	Experimentos	Nível			Valor máximo*
		A	B	C	
Índice de emulsificação	11a e 11b	0	-1	0	64,31%
	12a e 12b	0	-1	+1	62,85%
Diminuição da tensão superficial	11a e 11b	0	-1	0	40,16%
	14a e 14b	0	0	0	45,54%
Crescimento Celular	10ª e 10b	0	-1	-1	6,3 g/L

Valor máximo*: valores obtidos a partir da média das duplicatas

5.3. Fase II: experimentos em biorreator para análise de variáveis.

Após a realização os experimentos anteriores verificou-se a necessidade de conduzir o processo em biorreator com objetivo de avaliar diferentes valores de temperatura (20º, 30º e 40ºC), aeração (0,5, 1,5, 2,0 vvm) e agitação (400, 600, 800 rpm) em meio contendo 50 g/L de glicerol bruto em pH 6, visto que não seria possível controlar as essas variáveis em shaker. Estes experimentos foram realizados em duplicata e os resultados reportados representam a média dos valores das respostas. Diferentemente dos experimentos em *shaker*, cujos resultados apresentaram valores ótimos em 48 horas de processo, em biorreator os valores significantes foram obtidos somente em 96 horas, devido provavelmente a adaptação do micro-organismo à novas condições (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004).

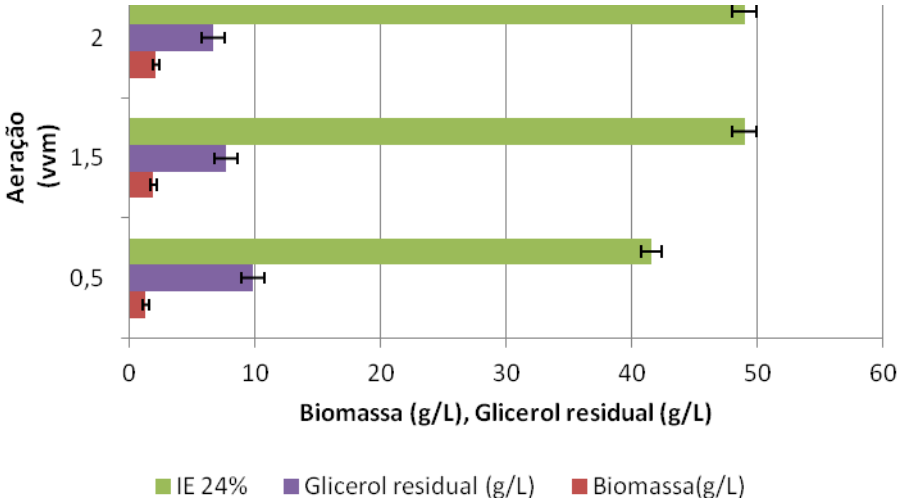
Em temperatura de 30±1ºC, verificou-se um maior crescimento celular, comprovando a temperatura ótima para o crescimento do micro-organismo (RYMOWICZ et al., 2008), assim como maior índice de emulsificação (Tabela 18). O crescimento em biorreator foi notório, afirmando o substrato como uma fonte adequada de crescimento para a *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678. A taxa de crescimento específico foi $\mu_{máx} = 0,24\ h^{-1}$, similar a encontrada por Papanikolaou et al. em seus estudos com a mesma espécie de micro-organismo.

Tabela 18- Produção de biossurfatante por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 em diferentes temperaturas.

Temperatura (ºC)	Índice de emulsificação (E_{24}%)	Glicerol remanescente (g/L)	Massa seca (g/L)
20	23,1	28,4	1,2
30	46,2	15,3	2,9
40	16,7	35,8	1,0

Condições do experimento: meio citado contendo 50g/L, pH=6, inóculo inicial de $6,2x10^4$ cél/mL.

No seguinte experimento notou-se que a concentração de biomassa máxima foi de 2,1 g/L quando a aeração atingiu 2,0 vvm, em cerca de 96 horas de processo. O gráfico em função da aeração em 96 horas de fermentação confirma esta afirmação (Figura 20). Conforme esta figura quanto maior a transferência de oxigênio no meio de produção observaram-se maiores valores do crescimento celular e do índice de emulsificação.



Concentração inicial de glicerol 50g/L; pH 6,0; temperatura 30±1 ºC; inóculo inicial= $6,2x10^4$ cél/mL; tempo de processo 96 h; agitação de 800 rpm, Consumo de glicerol:± 50%.

Figura 20 – Parâmetros estudados em função da concentração de aeração para *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678.

Passando de 96 horas, a porcentagem do oxigênio que antes era quase nula, devido ao consumo pelo micro-organismo (fase estacionária), passou a aumentar, indicando o momento da fase de declínio. Com concentração de 2,0 vvm de oxigênio, verificou-se um consumo superior a 50% do substrato, portanto foi à concentração utilizada no experimento de agitação.

Em relação à agitação foi observado que nos valores de 400 e 600 rpm, os índices de emulsificação e os valores de crescimento foram semelhantes (Tabela 19), porém em agitação de 800 rpm a levedura apresentou um maior crescimento celular e maior índice de emulsificação, portanto este valor foi utilizado nos experimentos posteriores. Convém enfatizar que a agitação tem influência na taxa de transferência de nutrientes para as células.

Tabela 19- Crescimento e produção de bioemulsificante em função da agitação por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 em glicerol bruto.

Agitação (rpm)	Índice de emulsificação (E_{24}%)	Massa seca (g/L)
400	42,1	0,81
600	44,5	1,23
800	55	2,29

Condição do experimento: meio citado contendo 50g/L de glicerol bruto; pH 6,0; aeração 2,0 vvm; temperatura de 30±1ºC; inóculo 6,2x10^4 cél/mL. *Os resultados são a média de 3 experimentos.*

5.4. Síntese do biossurfatante por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 em função dos melhores valores dos parâmetros estudados.

A partir da verificação dos melhores valores dos parâmetros, foram realizadas bateladas no mesmo biorreator com capacidades para 3 litros, no qual foram seguidas as condições de experimento: temperatura 30±1ºC, aeração 2,0 vvm, pH=6, agitação de 800 rpm, inóculo 6,2x10^4 cél/mL de células iniciais, em meio M1 contendo 50 g/L de glicerol bruto, visando a extração do bioproduto e quantificação dos lipídeos.

Com aproximadamente 96 horas de processo observou-se a ocorrência máxima de formação do biossurfatante havendo redução de tensão superficial da água de 72 mN/m para 34,2 mN/m. As leveduras caracterizam-se por produzirem biossurfatantes extracelularmente. Porém alguns micro-organismos não conseguem excretar os biossurfatantes os quais permanecem aderidos à célula (WU e JU, 1998). Devido a este contexto, algumas condições foram selecionadas para determinar a melhor resposta para os índices de emulsificação:

1º) líquido metabólico com células de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678;

2º) líquido metabólico livre de células, isto é, o caldo fermentado passou por processo de centrifugação e;

3º) líquido metabólico com células após tratamento destas com hexano (substância apolar responsável pela extração dos lipídeos).

Os valores de tensão superficial apresentaram-se diferentes para o líquido metabólico contendo célula de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 e livre de células. O segundo apresentou valores semelhantes ao da água, afirmando

que o bioproduto não foi excretado para o meio, permanecendo aderido às células do micro-organismo. Os valores do índice de emulsificação permaneceram semelhantes, em torno de 40%, para o líquido metabólico com células após tratamento com hexano e contendo células de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678, corroborando o fato de que o mais provável é que o biossurfatante esteja aderido as células não sendo excretado para o caldo fermentado (Tabela 20).

Tabela 20- Índice de emulsificação em querose de aviação em soluções com diferentes características.

	Meio de cultivo com células	Meio de cultivo sem células	Solução com células centrifugadas –tratadas
Índice de emulsificação em QAV (%)	42,9	7,7	42,8
Massa seca total (g/L)	9,5	-	2,2

Condição do experimento: meio citado contendo 50g/L, pH 6, 2,0vvm, temperatura de 30±1ºC, 800rpm e $6,2x10^4$ cél/mL de inóculo inicial. *Os resultados são a média de 3 experimentos.*

Haba et al. (2007) selecionaram 9 isolados de *Pseudomonas* sp. capazes de crescer em meio contendo óleo (óleo de girassol e oliva) e acumular compostos tensoativos, variando a tensão superficial final do meio entre 34 a 36 mN/m. Costa et al. (2008) utilizando cepas da bactéria *Pseudomonas* sp. obtiveram uma redução de 60mN/m para aproximadamente 31 mN/m. Este trabalho apresentou resultados semelhantes dos demais pesquisadores; utilizando cepa de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 a redução foi de 72 mN/m para 34,2 mN/m como citado anteriormente, representando uma diminuição de quase 50%.

O acúmulo máximo do biossurfatante produzido pela *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678, ocorreu na fase exponencial de crescimento do micro-organismo, cerca de 25,12 g/L, representando um Yp/s de 0,88 g de produto /g de substrato. Segundo Santos (2010), o efeito da redução da tensão superficial está diretamente relacionado a concentração da solução do biossurfatante até atingir valores da concentração micelar crítica (CMC). Vale ressaltar que do ponto de vista biotecnológico é de maior interesse trabalhar com o extrato

contendo células, cujo os resultados foram mais promissores e assim diminui-se os gastos e o tempo de extração.

5.5. Caracterização do Biossurfatante sintetizado por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678

A) Características

O extrato do biossurfatante recuperado impuro apresentou uma coloração amarelada e o extrato de biossurfatante parcialmente purificado apresentou uma coloração mais amarela-esbranquiçada (Figura 21), ambas com odor adocicado, apresentando-se bem fino após secagem à temperatura ambiente em dessecador.

Os extratos de biossurfatante foram obtidos de formas similares a partir da mesma metodologia (adaptado de Freitas et al, 2009), sendo diferente apenas no início do processo de extração. Na extração do biossurfatante parcialmente purificado, o caldo fermentado foi centrifugado para retirada das células, diferentemente do biossurfatante impuro, sem proceder centrifugação para retirada das células, logo todo o caldo fermentado foi utilizado. Os caldos fermentados com células e livre de células foram submetidos a processo de precipitação com álcool 95%v/v, sob agitação intensa, e a solução resultante foi mantida em geladeira a ±4ºC por 12 horas. Passado este tempo a solução foi centrifugado a 10000xg por 20 minutos e o precipitado formado (biossurfatante) foi armazenado em placa de Petri e mantido em dessecador até estar completamente seco. Abdel Mawgoud, Abouuwafa e Hassouna (2009) caracterizaram um ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* a partir de óleo de soja e observaram que o líquido deste composto apresentava coloração marrom amarelada, de aparência viscosa e pegajosa com odor de fruta.

Biossurfatante recuparado
Parcialmente purificado

Biossurfatante recuparado
bruto

Figura 21- Extratos de bissurfatante seco por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 (crédito: Jamille R. C. Lima)

B) Concentração Micelar Crítica

A concentração micelar crítica (CMC) é um dos parâmetros mais importantes a serem avaliados em um tensoativo, como ponto de ebulição e fusão em sustâncias puras, podendo ser determinada pela variação das propriedades físicas como a tensão superficial e é onde moléculas de surfactantes se associam dinamicamente no seio do liquido para formar micelas que são agregados de dimensões colidais, pois há um acúmulo na superfície. A importância deste parâmetro esta no fato de que a partir da CMC a tensão medida permanece constante (ANDRADE, 2010).

Na Figura 22 a diminuição da tensão superficial da água de aproximadamente 70 mN/m para 36 mN/m. O valor da CMC foi 7,0 g/L para o biossurfatante impuro. Em concentrações superiores a CMC o tensoativo excedente tende a formar micelas no interior da solução, as quais não modificam significativamente o valor da tensão superficial. Vale ressaltar que não foi realizada a CMC para o biossurfatante parcialmente purificado, pois outros experimentos, citados anteriormente, mostraram melhores resultados quando utilizado o biossurfatante impuro, tornando-se este mais interessante industrialmente. O biossurfatante impuro de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 apresentou diminuição da tensão superficial semelhantes ao biossurfatante sintetizado por *Candida antarctica*, de aproximadamente 70 mN/m para 36 mN/m, diferente da *Candida glabrata* que apresentou uma diminuição da tensão superficial chegando a 28 mN/m (Andrade, 2010).

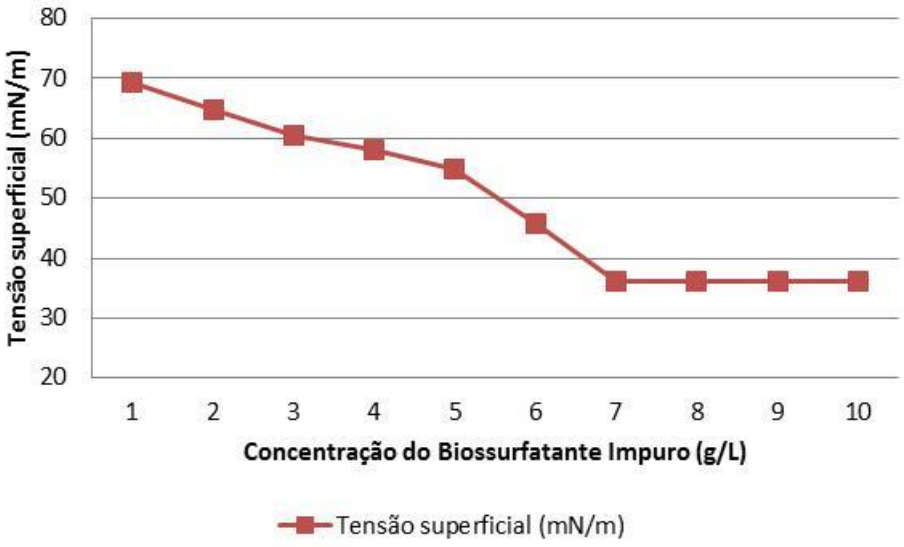


Figura 22- Tensão superficial em função da concentração do biossurfatante impuro.

C) Tolerância ao cálcio

Sabe-se que as rochas reservatório, onde o petróleo esta armazenado, são compostas principalmente de areia e calcário (carbonatos de cálcio). Este teste teve como objetivo observar o comportamento emulsificante do biossurfatante frente a diferentes concentrações de carbonato de cálcio, importante na recuperação do petróleo. A Figura 23 mostra os resultados do índice de emulsificação do querosene de aviação para soluções 7,0 g/L do biossurfatante bruto e parcialmente purificado adicionadas de concentrações de 0,1; 1,0 e 10 g/L de $CaCO_3$. Notou-se que não houve diferenças significativas entre o resultado do biossurfatante parcialmente puro e o impuro em presença de 0,1 e 1,0 g/L do carbonato, entretanto, quando se usou 10 g/L do sal o efeito sobre o índice de emulsificação foi grande. O valor máximo alcançado foi em torno de 42% para solução 7,0 g/L do biossurfatante adicionada de 0,1 g/L de $CaCO_3$.

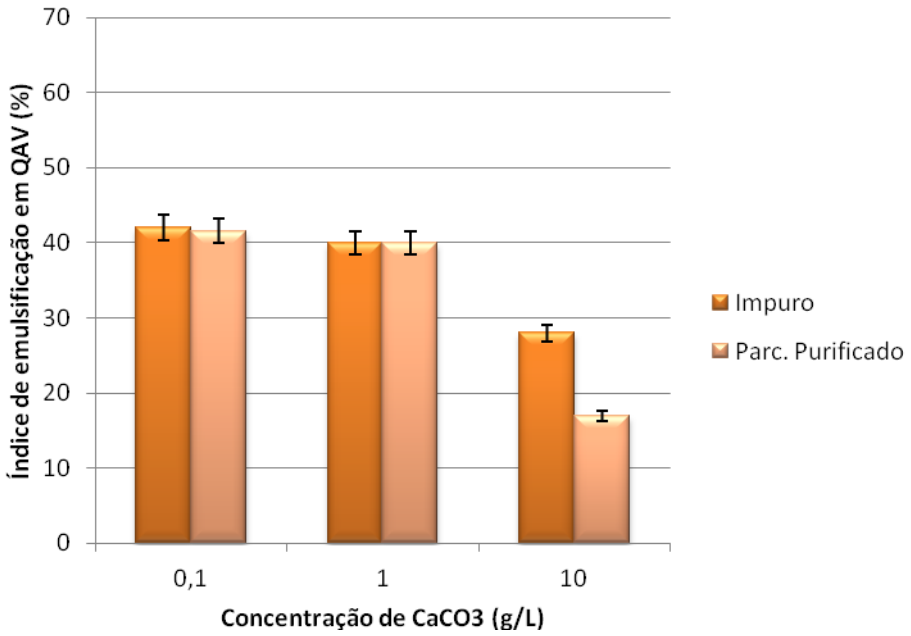


Figura 23- Efeito das concentrações de CaCO3 no índice de emulsificação do querosene de aviação para soluções 7,0 g/L do biossurfatante impuro e parcialmente purificado.

Dos Santos (2010) trabalhando nas mesmas condições com ranminolipídeos também notou que não houve muita diferença entre os resultados do extrato puro e o impuro nas diferentes concentrações de carbonato de cálcio e quanto maior esta concentração menor era o índice de emulsificação. O valor máximo alcançado foi 20% para o extrato impuro, enquanto este trabalho apresentou 42% no índice de emulsificação quando adicionada de 0,1 g/L de CaCO3.

D) Estabilidade em alta temperatura

Os testes com as soluções de biossurfatante bruto e parcialmente purificado apresentaram-se termoestáveis. A Figura 24 mostrou que não houve variação significativa na atividade emulsificante do querosene de aviação nas soluções 7,0 g/L do biossurfatante bruto e parcialmente purificado, quando expostos a temperatura de 121±1ºC por 1 hora, respectivamente 60% e 30%. Silva et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes com o extrato de biossurfatante impuro, quando submeteram o produto produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 a mesma temperatura deste trabalho por

1 hora, aproximadamente 55% de índice de emulsificação em querosene de aviação.

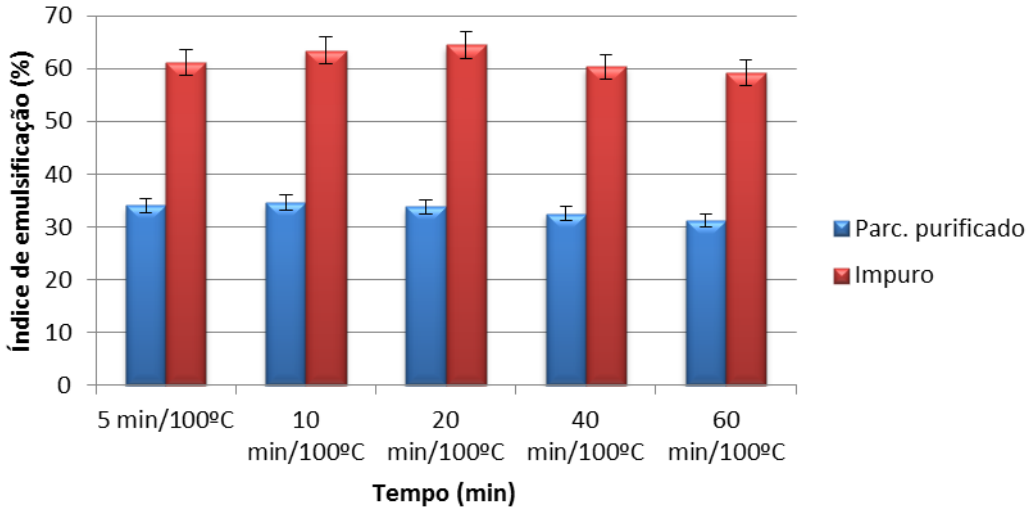


Figura 24- Efeito da alta temperatura no índice de emulsificação do QAV pelos extratos de biossurfatantes impuro e parcialmente purificado.

Vale ressaltar que as mesmas soluções do biossurfatante impuro e parcialmente purificado, passando por processo de autoclavagem, a temperatura de 121±1ºC por 20 mim, apresentaram uma perda semelhante, 10% no índice de emulsificação, em ambas as soluções (Figura 25). No entanto, o biossurfatante impuro apresentou resultados melhores que o parcialmente purificado, obtendo valores maiores que 50% antes e depois do processo de autoclavação.

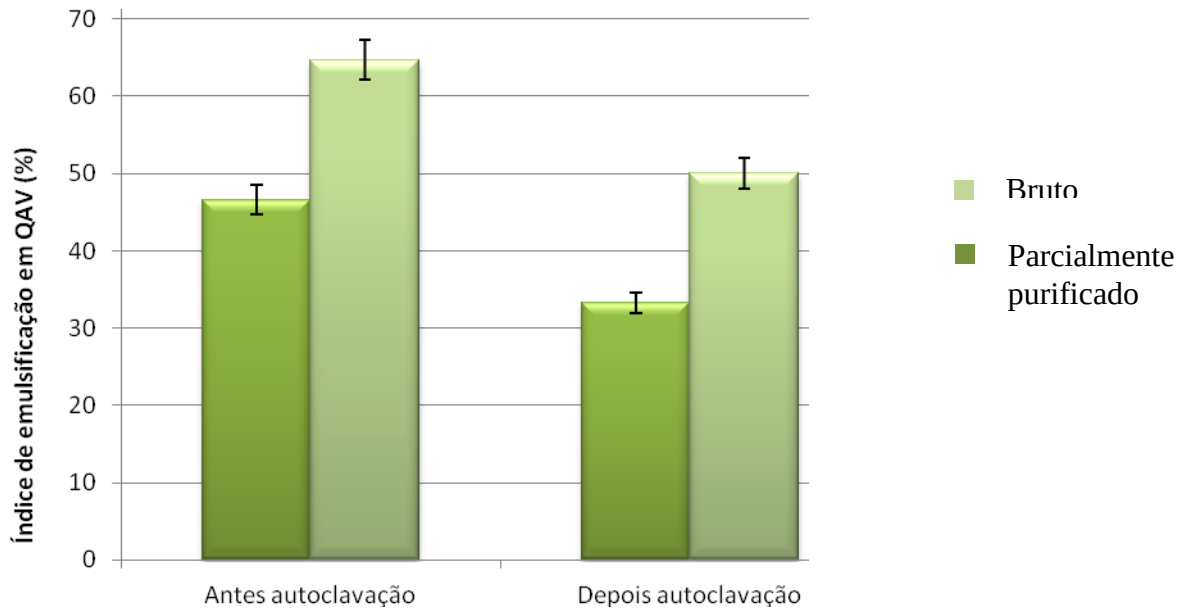


Figura 25- Efeito da autoclavação no índice de emulsificação do querosene de aviação por soluções a 7,0 g/L do biossurfatante bruto e parcialmente purificado.

Devido a considerações econômicas da indústria do petróleo, os resultados acima tornam-se bastante interessantes, visto que não existe a necessidade de etapas de purificação que é responsável pelo aumento em 60% do custo da produção total de biossurfatantes. Sendo assim o biossurfatante poderia ser utilizado na sua forma impura, sendo este, formado de caldo de cultura fermentado (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Portanto, a aplicabilidade do biossurfatante na sua forma bruta apresentou-se bastante interessante, devido aos resultados apresentados em altas temperaturas sem etapas de tratamento prévio, podendo atuar na recuperação melhorada do petróleo (MEOR).

E) Índice de emulsificação de diferentes produtos

Em relação ao extrato de biossurfatante impuro o índice de emulsificação do querosene de aviação (QAV) apresentou valor significativo, de 64% o que não ocorreu com o hexano obtendo-se valor relativamente baixo, de 26% (Figura 26). Para os demais produtos, óleo cru, óleo de soja, óleo de canola e biodiesel de soja, foram observadas a emulsão completa das soluções. Quando o bioproduto foi parcialmente purificado, os melhores resultados no índice de emulsificação ocorreram em óleo se soja, óleo de canola e biodiesel

de soja, respectivamente, 66,6; 58,3 e 62,5%. Em relação ao índice de emulsificação em hexano e em querosene de aviação, os resultados foram similares, cerca de 28%. Considerando-se os resultado obtidos, convém fazer um estudo mais profundo da operação de purificação, a fim de determinar os motivos que levaram ao abaixamento a atividade emulsificante.

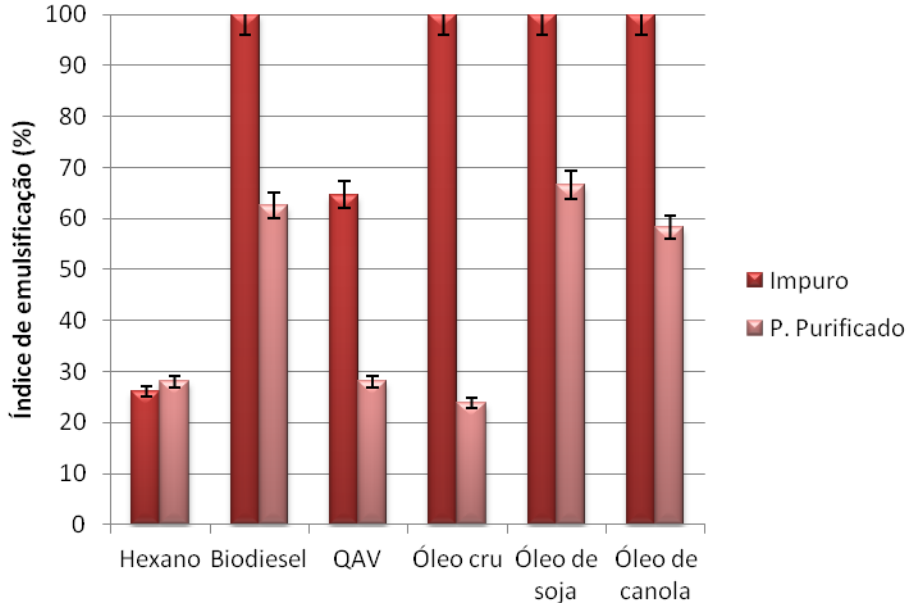


Figura 26- Índice de emulsificação de diferentes matérias-primas pela solução a 7,0g/L de biossurfatante puro e impuro.

Abdel Mawgoud, Abouuwafa e Hassouna (2009) em estudos realizados com soluções de ramnolipídio produzido por *Pseudomonas aeruginosa* BS20 a partir de óleo de soja apresentaram índice de emulsificação do extrato de biossurfatante impuro, em torno de 60%. No entanto o ramnolipídio não obteve sucesso na emulsificação de matérias-primas de outras fonte vegetais, diferentemente deste estudo que apresentou resultados de 100% de emulsificação para o extrato impuro e parcialmente purificado. O índice de emulsificação em óleo cru apresentou-se significativamente diferente nos extratos parcialmente purificado e impuro, respectivamente 38,8 e 100%. Pode-se concluir que o extrato de biossurfatante impuro foi mais eficiente em diferentes compostos do que o parcialmente purificado.

F) Estabilidade em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) à diferentes temperatura

A preocupação com a melhoria na produção do óleo cresceu, principalmente com a descoberta de novas reservas em um campo de petróleo chamado Pré-sal, encontrando-se abaixo de uma camada geológica de dois quilômetros de espessura de sal. Logo se fez necessário a análise de experimentos em condições semelhantes. Para o melhor entendimento da resposta do índice de emulsificação do querosene de aviação em relação aos parâmetros temperatura e concentração de sal foi confeccionado um diagrama de Pareto. Os valores médios das respostas estão descritos na Tabela 21.

Tabela 21- Resultado da influência do cloreto de sódio (NaCl) nas soluções de biossurfatante impuro e parcialmente purificado.

Sistemas (7g/L)	**NaCl (% m/v)**	**Temperatura (^oC)**	I.E (%) * Impuro	I.E(%)* Parc. purificado
1	3,5	50	46,6	32,4
2	5,5	50	45,4	31,2
3	3,5	100	33,2	24,6
4	5,5	100	33,2	23,4
5	4,5	75	40	29,2
6	4,5	75	40,6	29,6

*Valores médios das duplicatas
*I.E : Indice de emulsificacao em querosene de aviação.

No Diagrama de Pareto (Figura 27), pelo qual foram revelados os efeitos negativos e positivos, ao nível de confiança de 95%, verificou-se que o parâmetro que mais influenciou no índice de emulsificação foi a temperatura. Entretanto, este efeito foi negativo, ou seja, quando este parâmetro passa de um nível inferior (-1) para um nível superior (+1) o índice de emulsificação foi diminuido.

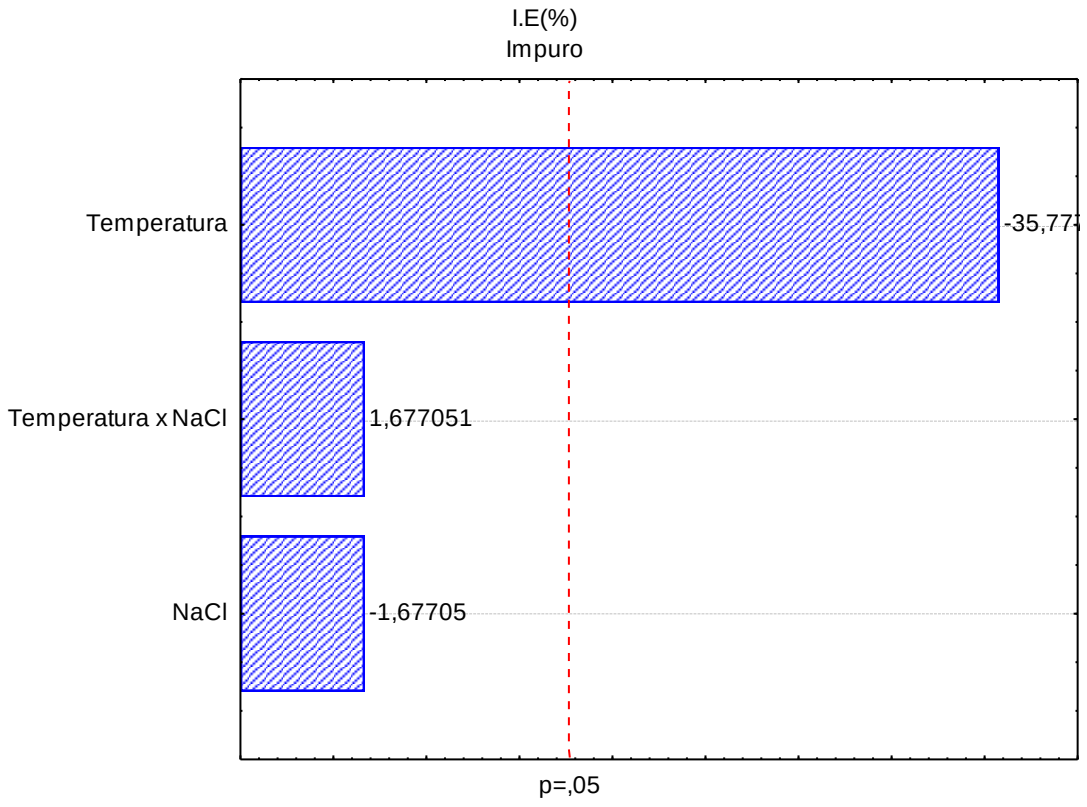


Figura 28- Diagrama de Pareto do efeito da salinidade e temperatura em relação ao índice de emulsificação em QAV.

Vale ressaltar que a concentração de cloreto de sódio (NaCl) analisada isoladamente nas mesmas concentrações apresentadas na tabela em temperatura ambiente, não obtiveram mudanças significativas (Tabela 21). Pesquisadores utilizando ramnolipídeos de diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* UCP0992 e *P. aeruginosa* BS20 também observaram uma constância nos valores dos resultados em média 60 % e 35%, respectivamente, quando analisadas concentrações que variaram de 2,0 a 6,0 % (m/v) de cloreto de sódio. O respectivo trabalho obteve média de 36% no índice de emulsificação para o extrato impuro e 30% para o extrato parcialmente purificado.

5.6. Análises instrumentais

A) Análise Termogravimétrica (TGA)

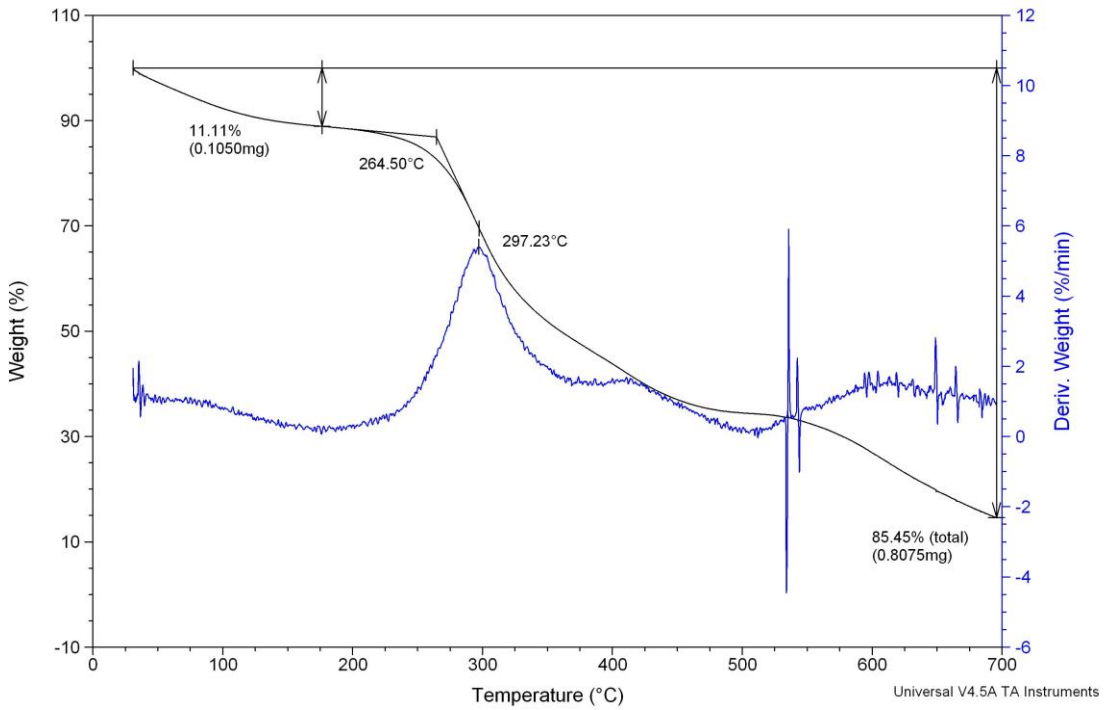
A análise termogravimétrica se baseia no estudo da variação de massa de uma amostra resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação)

em função da temperatura. É um processo continuo que envolve a medida da variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo a uma temperatura constante. Com o resultado é possível caracterizar o perfil de degradação de polímeros e muitos outros materiais. A termogravimetria derivada DTG indica as temperaturas correspondentes ao início e ao instante em que a velocidade de reação é máxima e auxiliam na visualização de curvas termogravimétricas (MOTHE e AZEVEDO, 2009).

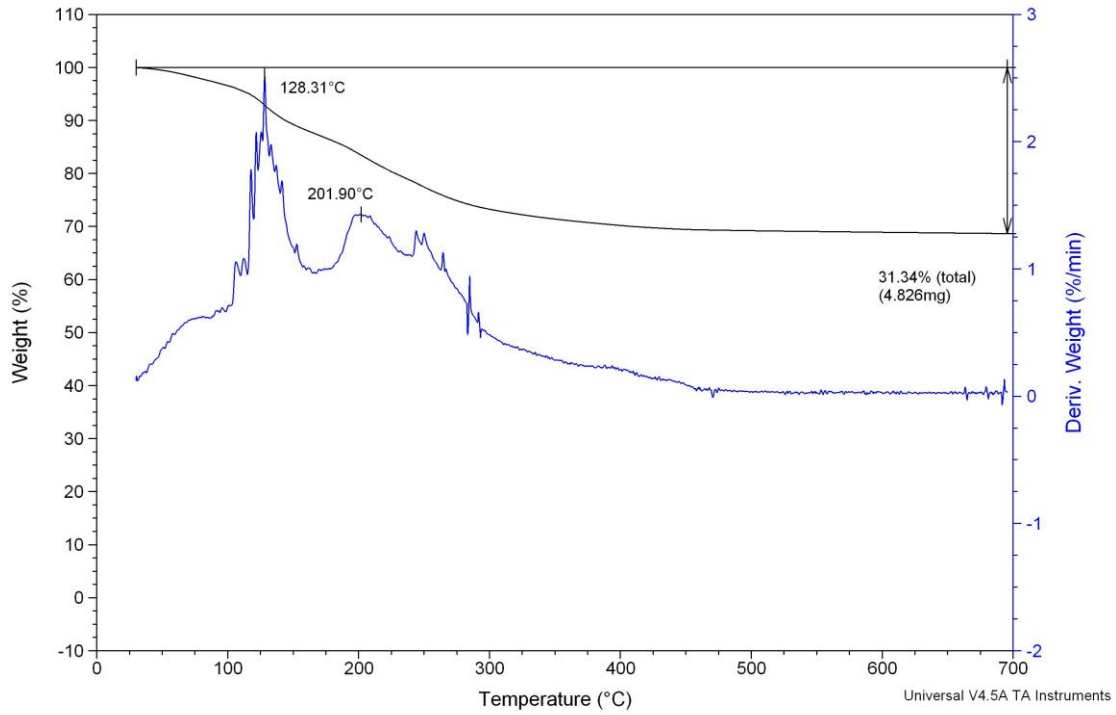
Na tentativa de purificar os extratos para melhor visualização do polímero na curva termogravimétrica, após a extração do bioproduto, foi realizada purificação utilizando precipitação com etanol a temperatura ambiente e filtração em membrana de pequena porosidade (0,8µm) em ambos os extratos.

A Figura 28 mostra as curvas termogravimétricas (TG) além das curvas termogravimétricas derivadas (DTG), das amostras do extrato de biossurfatante parcialmente purificado (a) e impuro (b). Observou-se um padrão diferenciado na curva termogravimétrica do extrato de biossurfatante parcialmente purificado (Figura 28b) quando comparada a curva termogravimétrica do extrato impuro, principalmente no que diz respeito ao resíduo formado a 700ºC, que sugere uma grande quantidade de material inorgânico, cerca de aproximadamente 68%. O extrato impuro (Figura 28b) apresentou o resíduo final de cerca de 14,55%.

A umidade se mostrou diferente para as duas curvas, em torno de 11% no extrato impuro e 6,3% no extrato parcialmente purificado. A temperatura inicial de decomposição variou para o extrato impuro (264,5ºC curva b) quando comparada ao extrato parcialmente purificado (128,31ºC curva a). Sabe-se que a temperatura inicial indica a estabilidade térmica de um determinado composto. Quanto mais elevada esta temperatura menor será a degradação (MOTHE e AZEVEDO, 2009).



(a)



(b)

Figura 28 – Curvas termogravimétricas do extrato de biossurfatante impuro (a) e parcialmente purificado (b).

Assim como o descrito por dos Santos (2010), o polímero produzido em seu trabalho também se encontrava na faixa de temperatura de degradação entre 200ºC e 300ºC. A Figura 29 comprova que a presença do polímero ocorre

no extrato impuro, isto é, no que permanece com as células. O extrato parcialmente purificado, isto é, aquele cuja ausência de células após a precipitação com etanol e a filtração em membranas, apresentou apenas resíduos inorgânicos, quanto mais a cima do eixo da temperatura maior a concentração de inorgânicos.

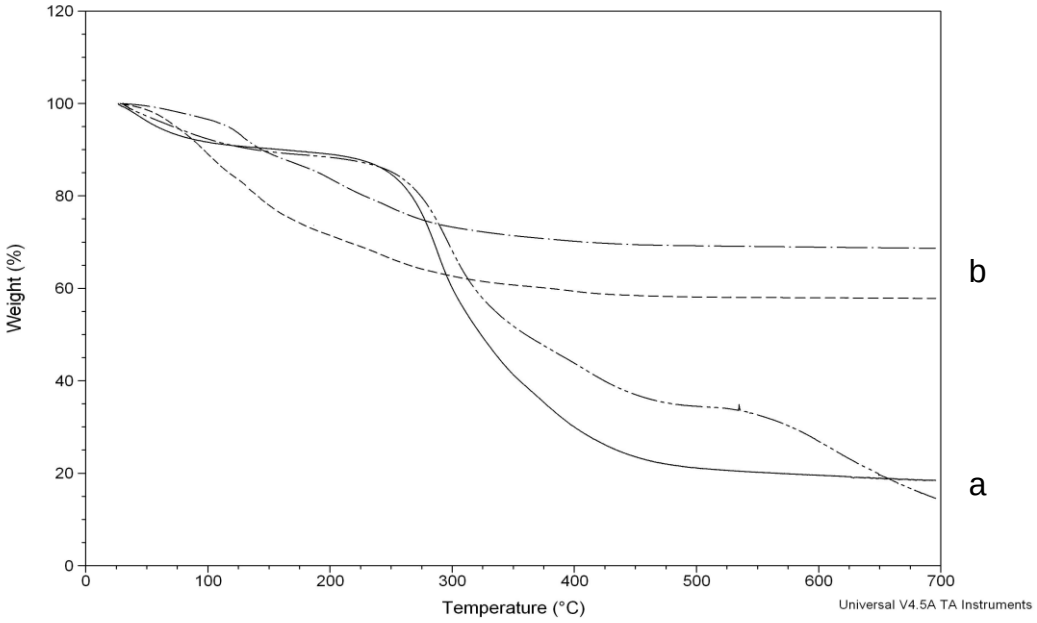


Figura 29- Gráfico comparativo entre as duas curvas termogravimétricas do extrato impuro(a) e parcialmente purificado(b).

B) Análise espectrofotométrica na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas.

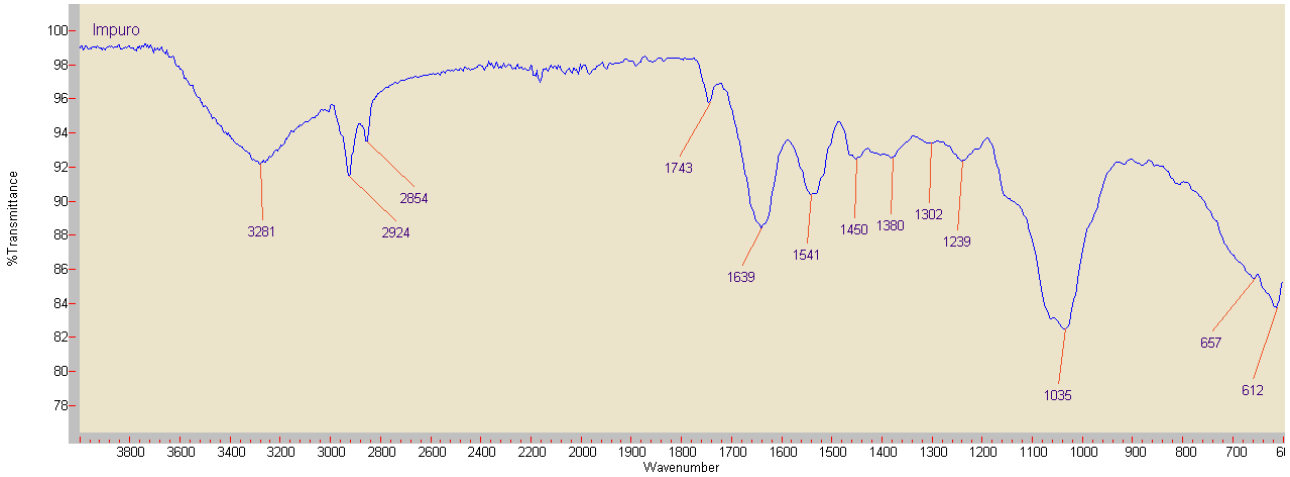
Esta é uma metodologia que detecta similaridades ou diferenças nas estruturas químicas dos compostos. Pode ser usada para a quantificação dos biossurfatantes, pois a grande maioria possui um radical carbonila, ligação

éster ou acido carboxílico, os quais absorvem energia na região infravermelha do espectro eletromagnético.

Os espectros FTIR do biossurfatante parcialmente purificado e impuro foram comparados ao espectro obtido do biossurfatante sintetizado por *Candida glabrata* (ANDRADE, 2010) além da comparação com a literatura (LOPES E FASCIO, 2004). As duas áreas preliminares para serem examinadas em um espectro são as regiões de 4000 a 1300 cm-1 e de 900 a 650 cm-1 onde estão situadas as absorções de grupamentos funcionais importantes.

A análise das principais funções do extrato impuro (Figura 30 a) apresentou as bandas 1743 e 1639, função carbonila; 2924 e 2854, função ácido carboxílico; 3261, função amida; 3261, função amina e 1743, função éster. O extrato parcialmente purificado (Figura 30 b) apresentou ausência da função éster e ácido carboxílico, apresentando a banda 1654, referente à função carbonila e a banda 3227 referente a função amina. Os dados obtidos estão de acordo com Andrade (2010) e confirmam a presença do bioproduto no extrato impuro, devido a presença do radical carbonila, ligação éster ou ácido carboxílico, os quais absorvem energia na região infra-vermelho do espectro eletromagnético.

(a)



(b)

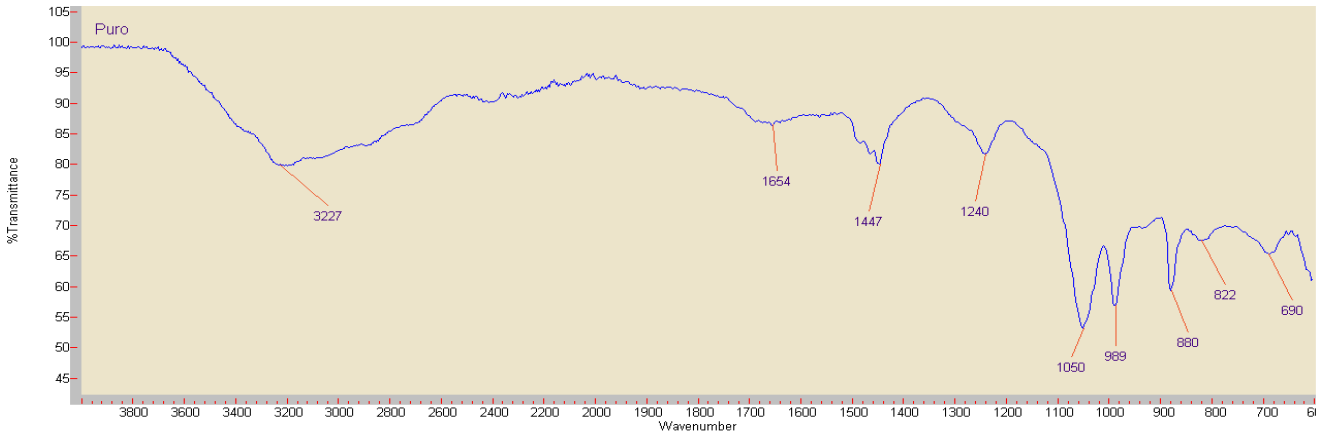


Figura 30- Espectrofotometro na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do extrato impuro e parcialmente purificado sintetizado por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678.

5.8. Aplicação do biossurfatante impuro em solo contaminado com compostos hidrofóbicos

O tratamento foi realizado com o extrato do bioproduto parcialmente purificado e impuro, sendo este nas concentrações da CMC e cinco vezes maior que a CMC.

O extrato impuro sintetizado por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678, foi aplicado em solo franco-argiloso, oriundo de São Paulo, contaminado com óleo diesel, de acordo com Silva et al. modificado (2010). O resultado de biorremediação apresentou valores significativos sobre a remoção do óleo diesel em solo franco-argiloso, obtendo 99% de remoção, no sistema que foi aplicado a concentração micelar crítica (7g/L). Com cinco vezes a concentração micelar crítica a porcentagem de remoção do óleo diesel foi apenas de 13%, provavelmente devido a formação de micelas.

Andrade et al.(2010) trabalhando com meio de cultivo contendo biossurfatante em contado intermitente com células de *Candida lipolytica* e *Candida glabrata* foi capaz de remover respectivamente, 81,7% e 95,7% de óleo pesado no solo.

5.9. Extração de lipídeos

A partir das melhores condições observadas nos experimentos: pH=6; 50g/L de glicerol bruto; temperatura de 30ºC; aeração 2,0vvm e 800 rpm de agitação, realizou-se uma batelada em biorreator com capacidade de 3 litros, para análise de "*Single Cell Oil*", também conhecidos como lipídio de célula única, em períodos de 24 horas.

Foi verificada produção de lipídeos pelas células de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678, observando uma reserva máxima de lipídio de 2,70 g/L com 42,7% (m/m massa seca), acumulado nas células da levedura em 72 horas de processo. Esses lipídeos foram determinados como lipídeos totais, podendo estar presentes tanto no interior das células quanto sendo constituintes da sua estrutura extra-celular. A tabela 22 apresenta os dados quantitativos originados pela *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 a partir da cinética em meio de cultivo contendo 50 g/L de glicerol bruto em relação a produção de lipídio.

Tabela 22- Dados quantitativos relacionados à produção de lipídeos por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678.

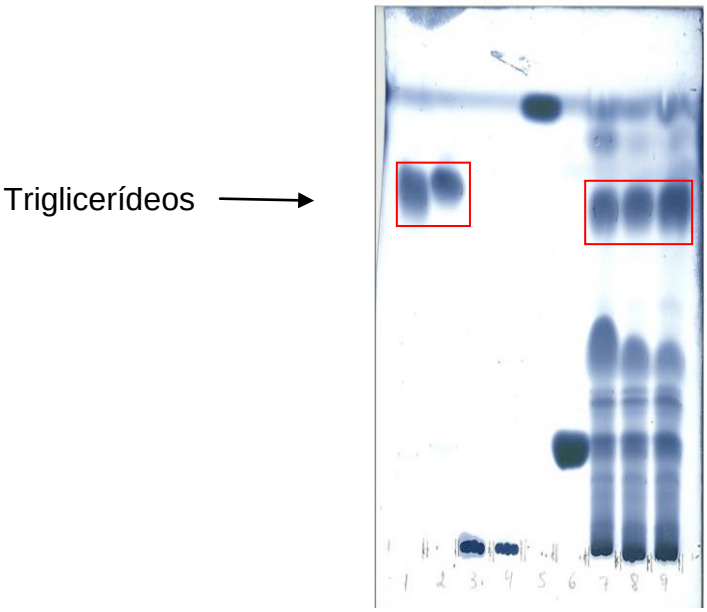
Tempo de processo (h)	S_r (gL^{-1})	$L_{máx}$ (gL^{-1})	Lipídio % (gg^{-1})	$Y_{L/S}$ (gg^{-1})	$X_{máx}$ (gL^{-1})
0	0	0	0	0	0
24	9,83	2,36	46,27	0,05	5,10
48	10,45	2,55	42,85	0,06	5,95
72	11,53	2,70	42,72	0,07	6,32

Condição do experimento: pH6±1, 800 rpm, 2,0 vvm, 30º±1 ºC, 50 g/L de substrato inicial e $6,2x10^4$ cél/mL de inóculo inicial.

Com o aumento da produção de biomassa ocorreu aumento significativo na produção de lipídeos. Quando a biomassa ($X_{máx}$) alcançou valores de 6,32g/L, obtivemos valores máximos de lipídeos de 2,70g/L. A porcentagem de acúmulo de lipídio em relação ao massa seca de células manteve uma faixa em torno de 40%, informação interessante já que confirma a potencialidade do micro-organismo em acumular lipídeos (BEOPOULOS et al., 2009). Papanikolaou e colaboradores obtiveram valores semelhantes de rendimento do produto em relação ao substrato ($Y_{L/S}$) que o presente trabalho, respectivamente 0,08 e 0,07.

De acordo com o resultado da análise da amostra inicial por cromatografia em camada fina (Figura 31), podem-se observar diferentes classes lipídicas,

incluindo os triglicerídeos, classe, na qual estão localizados os ácidos graxos. Com tal resultado, pudemos verificar que o micro-organismo em questão foi capaz de produzir ácidos graxos em todos os intervalos observados, quando comparado com os padrões testados, que possuem em sua composição diferentes ácidos graxos. Essa produção pode ser confirmada, uma vez que os compostos produzidos possuem RFs (índice de retenção) próximos aos do padrão utilizado, referente a triglicerídeos.



Padrões: 1- óleo de soja; 2- azeite de oliva; 3- fosfatidiletanolamina; 4- ácido fosfatídico; 5- palmitato de colesterol; 6- colesterol; 7- Amostra 24h; 8-amostra 48h; 9- amostra 72h. Revelado em vapor de iodo e solução de molibdênio em H_2SO_4.

Figura 31- Cromatografia em camada fina de lipídeos totais produzidos pela *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678

A partir desse resultado inicial, as amostras foram submetidas a dois fracionamentos em coluna de sílica gel 60. O primeiro fracionamento foi realizado usando os solventes clorofórmio:acetona:metanol, cuja fase eluída com a acetona e contendo os compostos de interesse, foi submetida a um outro fracionamento, visando uma purificação mais refinada dos compostos de interesse (os triglicerídeos). Essa purificação foi realizada, também, em coluna de sílica gel 60, mas utilizando outro sistema de solventes: éter de petróleo /éter etílico nas proporções 100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 0:100 (v/v), com maior afinidade a esses compostos. As frações eluídas que apresentaram o grupo lipídico puro de interesse, os triglicerídeos, foram unidas e pesadas. Após pesagem, verificou-se que a amostra obtida em 48 horas possuía um valor

aproximado de 300,5mg/L de triglicerídeos, enquanto as demais amostras apresentaram uma quantidade de aproximadamente 18mg/L de triglicerídeos produzidos (Figura 32).

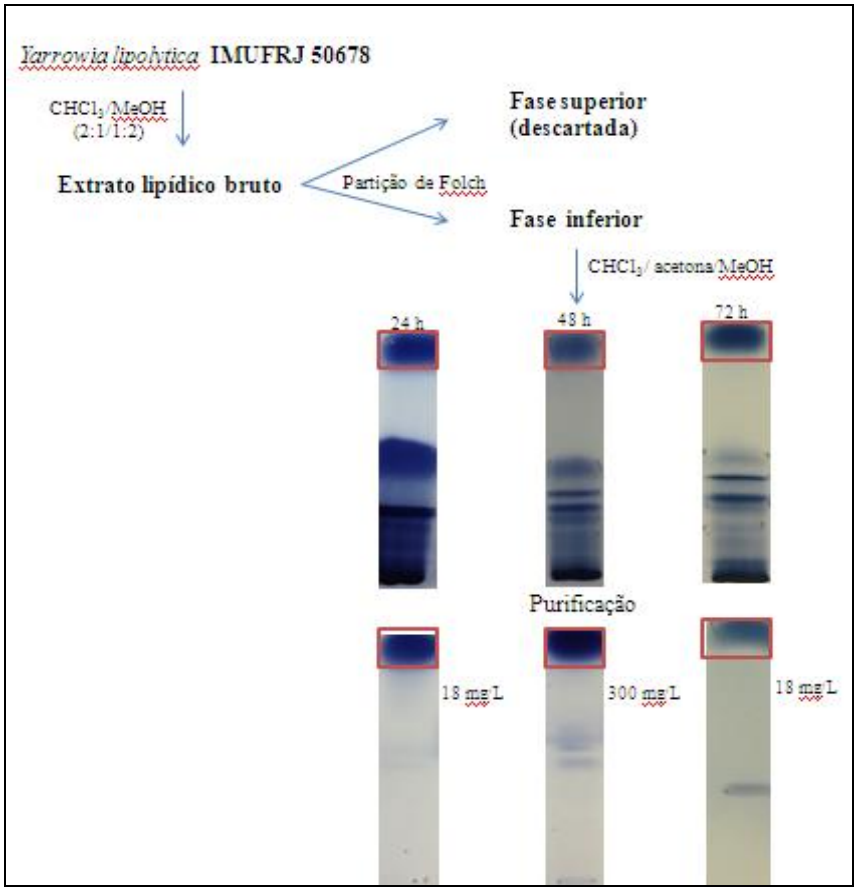


Figura 32- Resultados da extração e purificação do extrato lipídico bruto para a obtenção de triglicerídeos purificados.

Após a purificação da fração de triglicerídeos, que possuíam Rf semelhantes ao dos padrões de óleo de soja e azeite de oliva foram submetidos a processo de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-MS) para identificação dos metil ésteres de ácidos graxos. Primeiramente a identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação de tempo de retenção dos componentes da amostra com a dos padrões autênticos dos ésteres metílicos dos ácidos graxos. Vale ressaltar que a análise não possibilitou a observação dos componentes dos triglicerídeos, isto é, não se pode afirmar pela técnica usada se o triglicerídeo é formado por um único ácido graxo (simples) ou por mais de um ácido graxo (misto). A Figura 33 a seguir apresenta os cromatogramas nos tempos de 24, 48 e 72 horas e os respectivos ácidos graxos produzidos e seus percentuais.

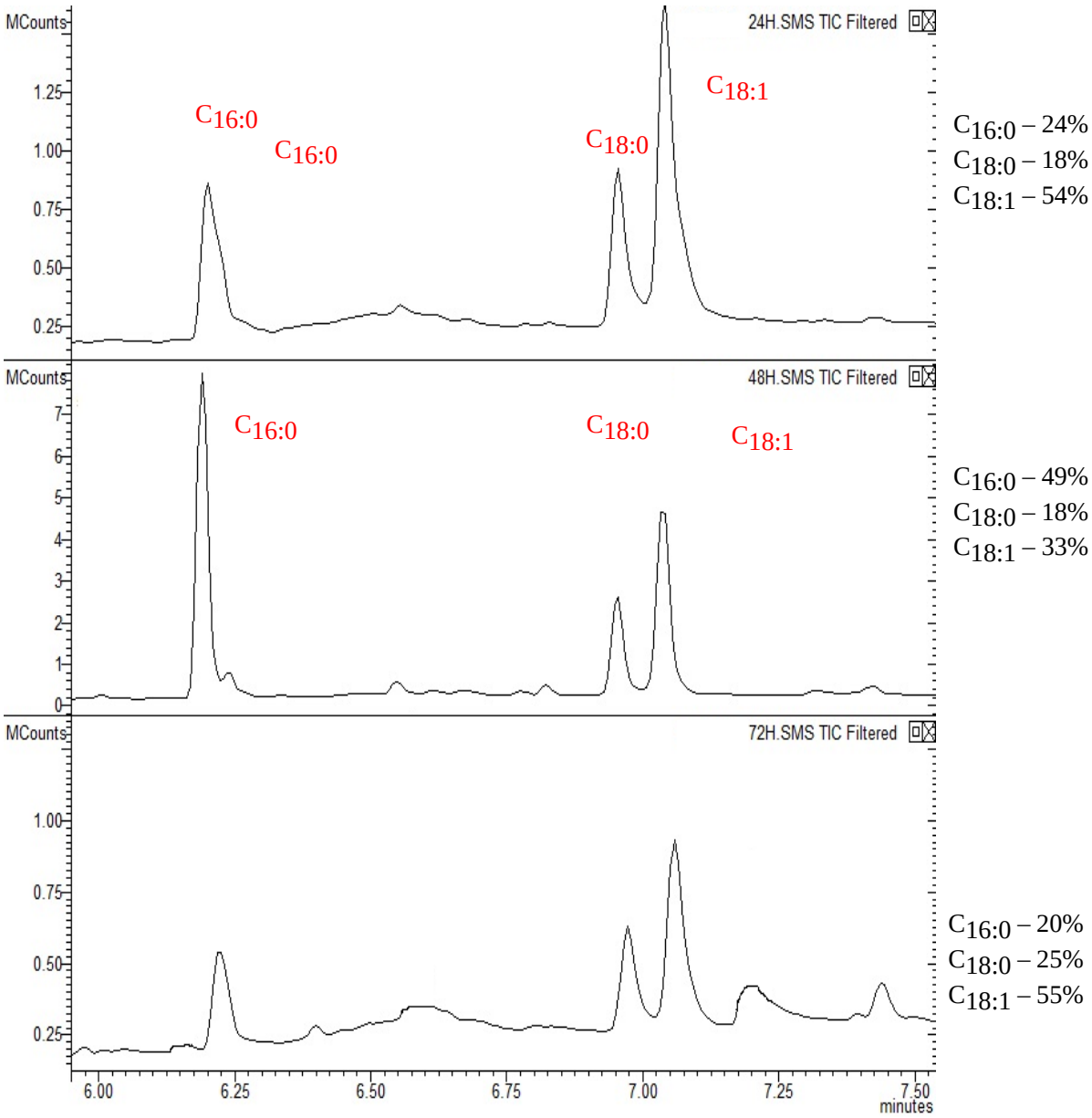


Figura 33- Cromatograma nos diferentes tempos com o percentual dos ácidos graxos sintetizados pela *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678

A tabela 23 apresenta as os 3 íons moleculares identificados pela técnica de MS, sendo m/z 270, 298, 296 [M^+]. Juntamente com esta tabela, a Figura 34 corrobora com os picos visualizados nos cromatogramas, visto que cada ácido apresentou uma fragmentação específica, assim como seus principais fragmentos.

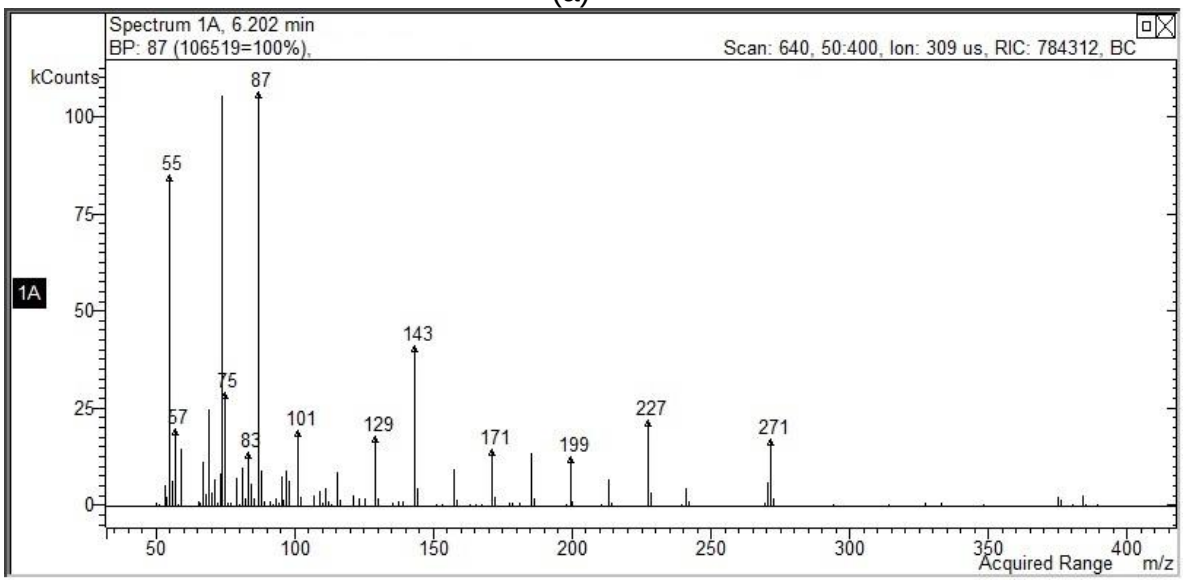
Tabela 23- Principais fragmentos dos diferentes ácidos graxos presente na amostra.

Ácidos graxos	Representação	Principais fragmentos (m/z)
Ác. palmítico	$C_{16:0}$	55, 57,73,75,87,101,129,143,171,199,227,270(M+)
Ác. Esteárico	$C_{18:0}$	55,57,74,75,87,83,101,129,143,157,185,199,255, 298(M+)
Ác. Oleico	$C_{18:1}$	55,69,81,96,98,110,135,265,296(M+)

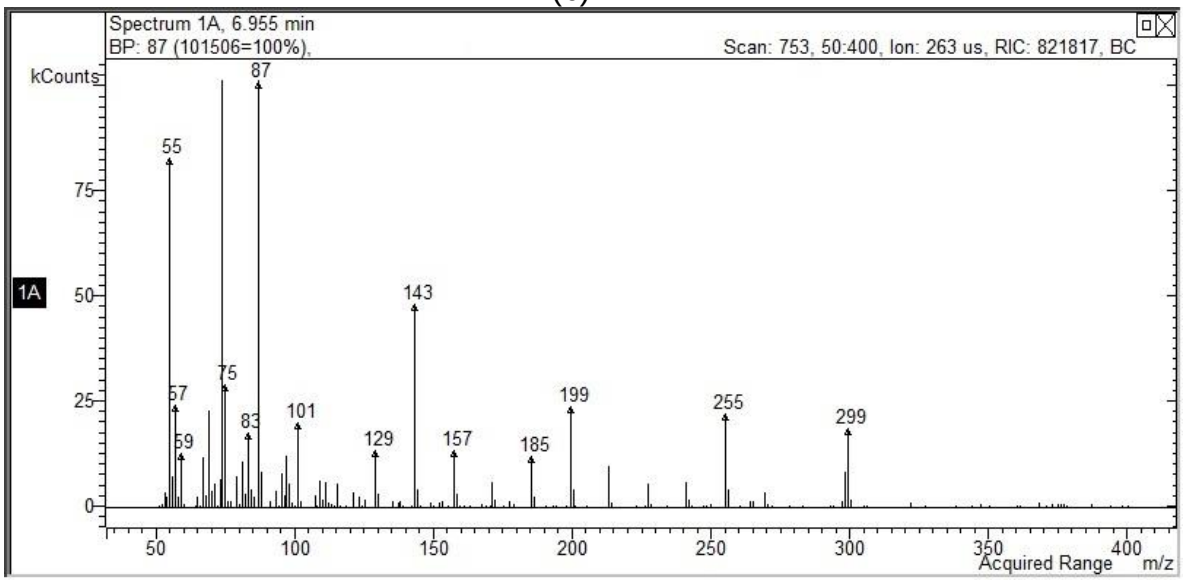
Fonte: elaboração própria

Os fragmentos de massa foram comparados ao descrito por Tim et al. (1982) para corroborar os cromatogramas, afirmando a presença dos ácidos a cima citados. Observar-se que os fragamentos mais abundantes ocorrem em m/z 50 e m/z 100. A Figura 34 apresenta as principais massas dos fragmentos observados no espectrômetro de massa referente aos ácidos palmítico (a), esteárico (b) e oleico (c) e as estruturas que os representa. De acordo com Thurnhofer e Vetter (2005), os ácidos graxos saturados são determinados pela m/z 87, ácidos graxos insaturados pela m/z 74 e os poli-insaturados pela m/z 79 e m/z 81 (Figura 35).

(a)



(b)



(c)

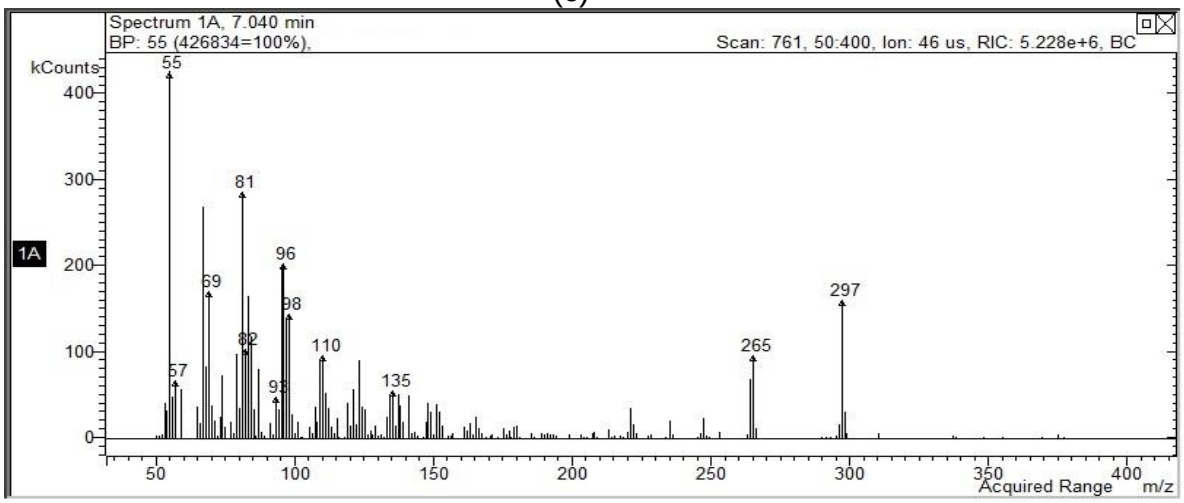
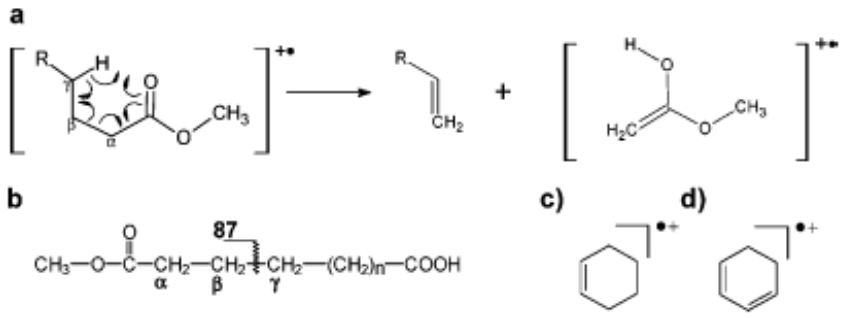


Figura 34- Resultado do MS- referente aos ácidos palmítico (a), esteárico (b) e oleico (c).



(a) Formação de m/z 74 via re-arranjo McLafferty ; (**b**) formação de m/z 87 por clivagem; (**c**) estrutura proposta para m/z 81 e (**d**) estrutura proposta para m/z 79.

Fonte: Vetter e Thurnhofer, 2005

Figura 35- Estruturas selecionadas para determinação dos ácidos graxos.

O aparecimento desses fragmentos citados corroboram os cromatogramas e afirmam os ácidos como sendo, palmítico, esteárico e oleico. Papanikolaou et al.(2008) observaram em estudos com *Mortierlla isabelina*, utilizando glicerol bruto, que os principais ácidos graxos sintetizados foram o oleico, linoleico, palmítico, assim como, ácidos em menores concentrações como, o esteárico, palmitoleico e γ- linolênico, sendo o último produzido nos momentos inicias do crescimento.

Neste estudo, o micro-organismo *Yarrowia lipolytica* IMURFJ 50678, sintetizou os ácidos oleico, esteárico e palmítico. Em 24 e 72 horas de processo, houve maior concentração de ácido oleico, diferentemente do processo em 48 horas que apresentou maior concentração de ácido palmítico . Vale ressaltar que só foram testados neste estudo os ácidos a cima citados, portanto os percentuais que eventualmente venha a faltar não invalidaram o estudo.

Comparando com outros micro-organismos na literatura, percebemos que assim como os demais, a levedura em estudo foi capaz de acumular grandes percentuais de ácido esteárico e oleico. No entanto quando comparada a cepas da mesma espécie, *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678, apresentou maior acúmulo dos ácidos oleico, palmítico e esteárico, assim como maior percentual de lipídio por massa seca (Tabela 24).

Tabela 24- Porcentagem lipídica e perfil dos ácidos graxos em leveduras

		Ácidos graxos		
Espécie	Lipídio (% gg^{-1})	C16:0	C18:0	C18:1
Cryptococcus curvatus	58	25	10	57
Candida sp. 107	42	44	8	31
Lipomyces starkeyi	63	34	5	51
Yarrowia lipolytica	6-14	16	12	40
Yarrowia lipolytica	36	11	1	28
Yarrowia lipolytica IMUFRJ 506*78*	43	20	25	55

Assim sendo, convêm enfatizar que a levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 foi capaz de sintetizar compostos com possível valor comercial, podendo ter diversas aplicações industriais, tais como, biossurfatante na recuperação terciária de petróleo, uma vez que não é necessária a purificação do extrato obtido, se tornando mais interessante do ponto de vista biotecnológico. Já os ácidos graxos, após purificação, podem ser empregados na indústria de alimentos, visto que a levedura produz uma porcentagem interessante de ácidos graxos, os quais podem originar ácidos poli-insaturados de grande valor. Logo, a cadeia de produção de biodiesel se apresenta economicamente viável, visto que seu coproduto produzido em larga escala, poderá apresentar valor econômico.

Capítulo 6

Conclusões

- ✓ Testes preliminares apontaram levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 capaz de sintetizar ácidos orgânicos em maior quantidade dentre as demais linhagens, produzindo 9,28 g/L de ácido oxálico e 2,79 g/L de ácido cítrico em meio contendo glicerol P.A. As linhagens também sintetizaram ácido α-cetaglutarato em menores quantidades;

- ✓ A levedura apresenta-se como um micro-organismo capaz de acumular lipídeos em um nível significativo (0,42 g de lipídeo/ g de massa seca);

- ✓ Nas condições de pH 6, concentração de inóculo 10% e concentração inicial de 30 g/L de glicerol foram obtidos os seguintes rendimentos : $Y_{ox}/_{glol}$ =0,67 g/g; $Y_{cit}/_{glol}$ =0,02g/g e $Y_{L}/_{x}$ = 0,42g/g;

- ✓ Em 48 horas de processo o sistema com pH 6, 30g/L de glicerol e 10 % de inóculo apresentou o melhor crescimento celular 6,3 g/L;

- ✓ O sistema com pH 6, concentração inicial de 30g/L de glicerol e concentração de inóculo 20%, apresentou uma diminuição de tensão superficial de 40,16% e um índice de emulsificação para QAV de 64,31% em apenas 48 horas de processo;

- ✓ A levedura IMUFRJ *Yarrowia lipolyca* 50678 apresentou-se como potencial produtor de biossurfatante, já que apresentou uma DTS superior a 33% em alguns sistemas;

- ✓ Alguns sistemas com pH 6, concentração inicial de 50g/L de glicerol, indiferente da concentração inicial da biomassa apresentaram 100% de consumo de glicerol com 96 horas de processo, com 48 horas de processo alguns sistemas ultrapassou 70% de consumo de glicerol, enfatizando o enfoque industrial;

- ✓ Com aproximadamente 96 horas de processo observou-se a ocorrência máxima de biossurfatante havendo redução de tensão superficial de 72 mN/m da água para 34,2 mN/m, porém a levedura não produziu biossurfatante extracelularmente;

- ✓ Obteve-se um rendimento para o ensaio em biorreator de 0,88 g de produto bruto/g de substrato;

- ✓ Os espectros FTIR do extrato de biossurfatante apresentaram grupamentos carbonila; carboxílico; amida; amina e éster;

- ✓ A técnica de termogravimetria mostrou que o biossurfatante esta agregado as células;

- ✓ Observou-se um padrão diferenciado na curva termogravimétrica do extrato de biossurfatante puro quando comparada a curva termogravimétrica do extrato bruto, principalmente no que diz respeito ao resíduo formado a 700ºC, que sugerindo uma grande quantidade de material inorgânico,

aproximadamente 68%. No extrato purificado o resíduo final ficou em torno de 14,55%.

6.1 Observações:

- ✓ Em relação à variável Índice de Emulsificação, o gráfico de Pareto apresentou os parâmetros pH e interação do pH com a concentração inicial de inóculo como parâmetros significativos. No gráfico de efeitos os níveis mais baixos de pH e da concentração inicial de glicerol, assim como os níveis mais altos apresentaram valores mínimos para esta variável.;

- ✓ Em relação à variável Diminuição da Tensão Superficial, o gráfico de Pareto apresentou os parâmetros pH e concentração inicial de inóculo como parâmetros significativos;

- ✓ As variáveis independentes analisadas (concentração inicial de glicerol, concentração inicial de biomassa e pH) estatisticamente apresentaram influência insignificante em relação a concentração inicial de glicerol;

- ✓ O processo ocorreu em pouco tempo, 96 horas, utilizando meio mineral e glicerol sem alimentação adicional, gerando significativamente um baixo custo ao processo;

- ✓ Após análise de alguns parâmetros em biorreator, observou-se que as melhores respostas relacionadas ao índice de emulsificação ocorreram em temperatura de 30±1ºC, 2,0 vvm de aeração e 800 rpm de agitação. As respostas apresentaram IE_{24}%= ±50% para QAV, consumo de glicerol superior a 50% e massa seca aproximada de 2,0g/L;

- ✓ A levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 produziu biossurfatante a partir de glicerol bruto e o meio fermentado apresentou IE_{24}%= 100 para biodiesel, óleo cru, óleo de soja e óleo de granola e IE_{24}%= 64 para QAV.

- ✓ O extrato de biossurfatante bruto e o puro não sofreram alterações expressivas quando exposto a altas temperaturas por tempos distintos e em

relação ao processo de autoclavagem, em ambos houve perda de 10% no índice de emulsificação;

- ✓ A atuação do biossurfatante na sua forma bruta foi estável quando submetido a altas temperatura (100°C), sendo indicado para recuperação melhorada do petróleo (MEOR);

- ✓ Os índices de emulsificação do QAV foram constantes em presença de 0,1 1,0 g/L de $CaCO_3$, ocorrendo uma diminuição significativa na presença de 10g/L;

- ✓ O extrato de biossurfatante na CMC (7g/L) removeu 99% do óleo diesel em solo franco-argiloso;

- ✓ Em 72 horas de processo observou-se uma produção máxima de 2,7g/L de lipídio total. Sintetizando ácidos oleico, esteárico e palmítico, sendo o primeiro o de maior significância (55 %).

6.2 Sugestão para trabalhos futuros

- ✓ Purificar o biossurfatante, podendo assim identificá-lo;
- ✓ Aplicar o biossurfatante em solos contaminados decorrentes das atividades relecionadas a indústria do petróleo;
- ✓ Testar o biossurfatante em sistemas verossímeis ao encontrado em poços de petróleo maduros;
- ✓ Aplicar o biossurfatante em sistemas para inibir a formação de biofilme;
- ✓ Purificação dos ácidos graxos obtidos;
- ✓ Aplicação dos ácidos graxos na alimentação de animais de diversas espécies.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10004. Resíduos sólidos – Classificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2004, 71p.

ABDEL-MAWGOUD A., ABOULWAFA M. M., HASSOUNA N. A-H. Characterization of Rhamnolipid Produced by Pseudomonas aeruginosa Isolate Bs20. Ap. Biochem. Biotech. v.7, p.329–345, 2009.

AGHAIEA, E.; PAZOUKI, M.; HOSSEINIA, M. R.; RANJBARA, M.; GHAVIPANJEHB, F. Response surface methodology (RSM) analysis of organic acid production for kaolin beneficiation by *Aspergillus niger. Chem. Eng J.* Oxford. v. 147, n. 2-3, p. 245-251, 2009.

ALHANASH, A.; KOZHEVNIKOVA, E. F.; KOZHEVNIKOV, I. V. Hydrogenolysis of glycerol to propanediol over Ru: polyoxometalate bifunctional catalyst. *Catal. Letters*. Basel. v. 120, n. 3-4, p. 307-311, 2008.

AMARAL, P. F. F. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Tese (Biotecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

ANDRADE, R.F.S. Produção, caracterização e aplicação de biossurfatante de C. lipolytica e C. glabrata utilizando resíduo industrial como substrato

alternativo. Dissertação de mestrado, Universidade Católica de Pernambuco. 2010.

ANDRE, A.; DIAMANTOPOULOUB, P.; PHILIPPOUSSISB, A.; SARRIS, D.; KOMAITISA, M.; PAPANIKOLAOUA, S. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Ind Crops Products*. Amsterdam. v. 31, n. 2, p. 407–416, 2010.

ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO E GÁS. Gás natural e Biocombustíveis. Disponível em <http://www.anp.gov.br>. Acesso em 04 jun. 2013.

ARRUDA ,P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Rev Analytica.* São Paulo, n. 26, p. 56-62, 2006.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Method D4052-96. Standard test method for density and relative density of liquids by digital density meter. Book of Standards. v. 05.02, ASTM: West Conshohocken, 2002, 5p.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Method D5185-05. Standard test method for determination of additive elements, wear metals, and contaminants in used lubricating oils and determination of selected elements in base oils by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). Book of Standards. v. 05.02, ASTM: West Conshohocken, 2005, 8p.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Method E70-97. Standard test method for pH of aqueous solutions with the glass electrode. Book of Standards. v. 05.02, ASTM: West Conshohocken, 2002, 6p.

AXEL, A.; PANAGIOTA, D.; ANTONIOS, P.;DIMITRIS, S.; MICHAEL, K.; SERAPHIM, P. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Ind Crops Prod.* Amsterdam. v. 31, n. 2, p. 407–416, 2010.

BAJPAI, D.; TYAGI, V. K. Biodiesel: source, production, composition, properties and its benefits. *J Oleo Sci.* Tokyo, v. 55, n. 10, p. 487-502, 2006.

BALAT, M.; BALAT. H. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. *Energy Converti Manag.* Amsterdam, v. 49, n. 10, p. 2727-2741, 2008.

BARRETO-BERGTER, E; PINTO, MR & RODRIGUES, ML. Structure and biological functions of fungal cerebrosides. An Acad Bras Cienc. v. 76, n. 1, p.67-84.2002

de BARROS NETO, B. Como fazer experimentos, 3ª. ed.,UNICAMP: Campinas, 2007. 480p.

BARROS, F.F.C.; de QUADROS, C.P.; JUNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quim. Nova*, vol. 30, no. 2, p.409-414, 2007.

BARROS, F.F.C.; de QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. v. 28, p. 979-985, 2008.

BARTH, G. e GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiol. Rev.* Amsterdam. v. 19, n. 4, p. 219-237, 1997.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J-L.; MOLINA-JOUVE, L. e NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lip Res.* Oxford. v. 48, n. 6, p. 375–387, 2009.

BILICH, F.; DA SILVA, R. G.. Análise de viabilidade do potencial de biodiesel na produção agrícola brasileira. *Revista Novos Paradigmas*. Brasília, v. 1, p. 7-18, 2006.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* Amsterdam. v. 152, n. 1, p. 41-52, 1999.

BONDIOLI, P. From oilseeds to industrial products: present and near future of oleochemistry. *Italian J Agron.* Bologna, v. 7, n. 2, p. 129-135, 2003.

BORGES, S.M.S. Recuperação Avançada de Petróleo (EOR) com a Utilização da Glicerina Bruta (GB) co-produto da produção de Biodiesel . Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia. 2009.

BOZBAS, K. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renew Sust Energy Rev.* Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 542–552, 2008.

BROWN, D. A. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol.* Amsterdam. v. 11, n. 11, p. 446-469, 2001.

BS – BRITISH STANDARDS. Method EN 12937. Petroleum products - Determination of water - Coulometric Karl Fischer titration method.18 Jan 2001.

BS – BRITISH STANDARDS. Method EN 14105. Fat and oil derivates. Fatty acid Methyl Esteres (FAME) – Determination of free and total glycerin and mono-, di-, triglycerides contents. 15 May 2003. 22p.

BS – BRITISH STANDARDS. Method EN 5711-5. Methods of sampling and test for glycerol. Determination of alkalinity or acidity: volumetric method. 30 Nov 1979, 2p.

CALIXTO, R. O. R. Caracterização de glicoproteínas e glicolipídeos e superfície de fungo *Cladospurum (Amorphotheca) resinae*. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Sci Total Environ.* Amsterdam. v. 407, n. 12, p. 3634 – 3640, 2009.

CAMEOTRA, S.; SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *Int Biodeterior Biodegradation.* Barking. v. 62, n. 3, p. 274–280, 2008.

CANAKCI, M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. *Biores Technol.* Barking, v. 98, n. 1, p. 183-190, 2007.

CANDEIA, R. A.; FREITAS, J. C. O., CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, F. C., SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Análise comparativa do biodiesel derivado do óleo de soja obtido com diferentes álcoois. Diponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congressso2006/Armazenamento/AnaliseComparativa2.pdf>. Acessado em 03 mar 2008.

CÁRDENAS, D. P., PULIDO, C., ARAGON, O. L., ARISTIZÁBALL, F. A., SUÁREZ, Z. R.; MONTOYA D. Evaluación de la producción de 1,3-

propanodiol por cepas nativas de *Clostridium sp.* mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiesel. *Rev. Col. Cien. Qui. Farm.* Bogotá, v. 35, n. 1, p. 120-137, 2006.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFF, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. *Quim. Nova*. São Paulo. v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CERRATE S, Y. F.; WANG, Z.; COTO, C.; SACAKLI, P.; WALDROUP, P. W. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. *Int J Poult Sci*. Faisalabad. v. 5, n. 11, p. 1001–1007, 2006.

CARRERO, E., QUEIPO, N. V., PINTOS, S., ZERPA, L., E., J *Petroleum Scence & Engineering*, 58, 30. 2006.

CHA, M.; LEE ;N.; KIM, M.; KIM, M.; LEE, S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida. Bioresour Technol*. Barking. v. 99, n. 7, p. 2192–2199, 2008.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; AIKATERINI BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy.* Amsterdam. v. 36, n. 2, p. 1097-1108, 2011.

CHENG, Y.; LU, Y.; GAO, C.; WU, Q. Alga-based biodiesel production and optimization using sugar cane as the feedstock. *Energy Fuels*. Washington. v. 23, n. 8, p. 4166–4173, 2009.

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexanoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem.* Barking. *v.*42, n. 11, p.1537-45, 2007.

CHIU, C.W.; DASARI, M. A.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. Removal of residual catalyst from simulated biodiesel's crude glycerol for glycerol hydrogenolysis to propylene glycol. *Ind. Eng. Chem. Res*. Washington. v. 45, p. 791–795, 2006.

CLAISSE. O; LONVAUD-FUNEL, A. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiol*. London, v. 17, n. 5, p. 513-519, 2000.

COOPER, D.G.; ZAJIC, J. E.; GERSON; F. Production of Surface-Active Agents Two*Bacillus* Species. App Environ Microbiol**.** n.1, v.37, p. 4-10,1979.

COKS, L. V.; VAN REDE, C. Laboratory handbook for oils and fats analysis. 1st. ed., Academy Press: London, 1966, 419 p.

COLLA, L. M. e COSTA, J.A.V. Obtencao e aplicacao de biossurfatantes. Vetor. n.13, p. 85-103, 2010.

COOPER, D.G. E GOLDENBERG, B.G. Surface-Active Agents from two *Bacilllus* Species. *App Environ Microbiol.* Washington. v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

CORTRIGHT, R. D.; DAVDA, R. R.; DUMESIC, J. A. Hydrogen for catalytic reforming of biomass-derived hydrocarbons in liquid water. *Nature*. London. v. 418, p. 964–967, 2002.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, M.; EBERLIM, M. N.; CONTIERO, M. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochem.* Oxford, v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006.

CZABANY, T.; ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim Biophys Acta.* Amsterdam. v. 1771, n. 3, p. 299-309, 2007.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresour Technol.* Barking, v. 100, n. 2, p. 1015-1019, 2009.

DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Appl Catal A.* Amsterdam, v. 281, n. 1-2, p. 225-231, 2005.

DEMIRBAS, A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. *Energy Convers Manage.* Amsterdam, v. 44, n. 13, p. 2093–2109, 2003.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energ Conv Manag.* Oxford, v. 50, n. 9, p. 1481–1486, 2009.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Washington. v. 61, n. 1, p. 47-64. 1997.

DONG, M., MA, S., LIU, Q., *Fuel*. 88, 1049. 2009.

DOSSIN, T. F.; REYNIERS, M-F.; BERGER, R. J.; MARIN, G. B. Simulation of heterogeneously MgO-catalysed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial production. *Appl Catalysis B.* Amesterdan, v. 67, n. 1-2, p. 136-148, 2006.

EEVERA, T.; RAJENDRAN K.; SARADHA S. Biodiesel production process optimization and characterization to assess the suitability of the product for varied environmental conditions. *Renewable Energy* . Amsterdam. v. 34, n. 3, p. 762–765, 2009.

ELLIS, N.; GUAN, F.; CHEN, T.; POON, C. Monitoring biodiesel production (transesterification) using in situ viscometer. *Chem Eng J.* Amsterdam, v. 138, n. 1-3, p. 200-206, 2008.

ETHEIR, S.; WOISARD, K.; VAUGHAN, D.; WEN, Z. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresour Technol.* Barking. v. 102, n. 1, p. 88-93, 2011.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.; DA SILVA; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Quím Nova.* São Paulo, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol Adv*. Oxford. *Artigo no prelo.* 2011.

FICKERS, P.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica. J Appl Microbiol.* Washington. v. 96, n. 4, p. 742–749, 2004.

FLORES, C-L.; RODRÍGUEZ, C., PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* Amsterdam. v. 24, n. 4, p. 507-529, 2000.

FOLCH, J; LEES, M & SLOANE STANLEY, GH. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226: 497-509.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; NELE,M.; COELHO,M.A.Z. Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica. J Biom Biotechn.* p.8, 2010.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. M. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carb Polym*, n.78, p.549–556, 2009

FUJIMOTO, T.; OHSAKI, Y.; CHENG, J.; SUZUKI, M.; SHINOHARA, Y. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol*. Bethesda. v. 130, n. 2, p. 263–279, 2008.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of Oils. *J Biosci Bioeng.* Osaka, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

GARAI-IBABE, G.; IBARBURU, I.; BERREGI, I.; CLAISSE, O.; LONVAUSD-FUNEL, A.; IRASTORZA, A.; DUEÑAS, M. T. Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cider making. *Int J Food Microbiol*. Amsterdam, v. 121, n. 3, p. 253-261, 2008.

GRISHCHENKOV, V. G.; TOWNSEND, R. T.; MCDONALD, T. J.; AUTENRIETH, R. L.; BONNER, J. S.; BORONIN, A. M. Degradation of Petroleum Hydrocarbons by Facultative Anaerobic Bacteria Under Aerobic and Anaerobic Conditions, *Process Biochemistry*, n. 35, p. 889-896, 2000.

HABA, E.; VIDAL-MAS, J.; BASSAS,M.; ESPUNY,M.J.; LLORENS, J.; MANRESA, A. Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. *Biochem Eng J*. Barking. v. 35, n. 2, p. 99–106, 2007.

HAN, M.; YI, W.; WU, Q.; LIU, Y.; HONG, Y.; WANG, D. Preparation of biodiesel from waste oils catalyzed by a Brønsted acid ionic liquid. *Bioresour Technol.* Barking, v. 100, n. 7, p. 2308-2310, 2009.

HEALY, M.G.; DEVINE, C.M.; MURPHY, R. Microbial Production of biosurfactants. *Resour Conserv Recyc*. Amsterdam. v. 18, n. 4, p. 41-57, 1996.

HENN, J. D.; ZANIN, A. O agronegócio do biodiesel: potencialidades e limitações da utilização da glicerina (coproduto) na alimentação de suínos e de aves. CONGRESSO SOBER- Sociedade Brasileira de Economia, 47, Porto Alegre, 2009.

HIMMI, E-H.; BORIES, A., BARBIRATO, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum. Biores Technol.* Oxford, v. 67, n. 2, p. 123-128, 1999.

HIRSCHMANN, S.; BAGANZ, K.; KOSCHIK, I.; VORLOP, K. D. Development of an integrated bioconversion process for the production of 1,3-propanediol from

HUA, Y.; QIANG,J.; JINSHAO, Y.J.; PENG, U.; QIN, H.; ZHANG, N.; HE, B. Characteristics of biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochem.* Barking. v. 44, n. 3, p. 302-308, 2009.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Method EN 14110. Fat and oil derivates. Fatty acid Methyl Esteres (FAME) – Determination of methanol content. 15 May 2003, 14p.

ITO, T.; NAKASJHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J Biosci Bioeng.* Osaka, v. 100, n. 3, p. 260-265, 2005.

JARVIS, G. N.; MOORE, E. R. B.; THIELE, J. H. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *J Appl Microbiol.* Oxford, v. 83, n. 2, p. 166-174, 1997.

JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. The glycerin glut: option for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Progress.* Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 338-348, 2007.

JUSZCZYK, P. et al. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from Biodiesel production. Bioresource technology, v. 137, p.124-131,2013.

KOUTINAS, A.; DU, C.; WANG, R. H.; WEBB, C. Production of chemicals from biomass. In: CLARK, J.; DESWARTE, F. (Ed.). Introduction to chemicals from biomass. 1st. ed., Wiley Inter-Science: New York, p. 77–101. 2008.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeasts, a taxonomic study. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, p. 308-309,1988..

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerence in yeast: a study of 42 species. *Microbiology.* Reading, v. 145, n. 9, p. 2577-2586, 1999.

LEAL, M. C. M. R. Tratamento sequencial enzimático-anaeróbio aplicado aos efluentes das indústrias de laticínios. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

LEVINSON, W. E., KURTZMAN, C. P.; KUO, T. M. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enzyme Microb Technol.* Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 292–295, 2007.

LI, L., DU, W., LIU, D., WANG, L. e LI, Z. "Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, pp. 58–62.2006.

LIMA, P.C.R. *Pré-Sal - O Novo Marco Legal e a Capitalização da Petrobras*, 1a ed., RJ: Editora Synergia: Rio de Janeiro, 2011

LOGAN, B. E.; SELEMBO, P. A.; PEREZ, J.M.; LLOYD, W. A. High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. *Int J Hydrogen Energy.* Oxford. v. 34, n. 13, p. 5373 – 5381, 2009.

LAKATOS, I., LAKATOS-SZABÓ. J.*, Int. J. Oil, Gas and Coal Technology,* 1, 46. 2008.

LOPES, W.A. e FASCIO,M. Esquema para interpretação de spectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. Quim. Nova, Vol. 27, N. 4, p. 670-673, 2004.

LOZADA, I.; ISLAS, J.; GRANDE, G. 2010. Environmental and economic feasibility of palm oil biodiesel in the Mexican transportation sector. *Renew. Sustain. Energy Rev.* Amsterdam. v. 14, n. 1, p. 486–492, 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbiologia de brock. 10 ed.São Paulo: Pretince hall, 2004, p.579.

MANIASSO, Nelson. Ambientes micelares em química analítica. *Quím. Nova* [online]., v .24, n.1, p. 87-93, 2001.

MANTZOURIDOU, F.; NAZIRI, E.; TSIMIDOU, M. Z. 2008. Industrial glycerol as a supplementary carbon source in the production of β-carotene by *Blakeslea trispora*. *J. Agric. Food Chem.* Washington. v. 56, n. 8, p. 2668–2675, 2008.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. *Renew Sust Energ Rev.* Oxford, v. 11, n. 6, p. 1300–1311, 2007.

MEHER, L.C., VIDYA SAGAR, D., NAIK, S.N. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel. *Biores Technol*. Barking, v. 97, n. 12, p. 1392-1397, 2006.

MEKHILEF,S.; SIGA, S.; SAIDUR,R. A review on palm oil biodiesel as a source of renewable fuel.*Ren Sust Energy Rev*, v. 15,n.4, p. 1937-1949. 2011

MEIRA, J. A; CAMILIOS, N. D.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Aproveitamento de resíduos da cadeia produtiva do biodiesel para a produção de Biossurfactante. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2. Brasília, DF, 2007.

MLICKOVA, K.; ROUX, E.; ATHENSTAEDT, K.; D'ANDREA, S.; DAUM, G.; CHARDOT, T.; NICAUD, J-M. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*. Washington. v. 70, n. 7, p. 3918–3924, 2004.

MOTHE, C. H e de AZEVEDO, A. D. *Análise Térmica Materiais***.** 1a Ed. SP: Artliber Editora. Sao Paulo, 2005.

MORGUNOV, I.; SOLODOVNIKOVA, N. Y.; SHARYCHEV, A. A.; KAMZOLOVA, S. V.; FINOGENOVA, T. Regulation of NAD+-dependent isocitrate dehydrogenase in the citrate producing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemstry*. Moscow. v. 69, n. 2, p. 1391–1398, 2004.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T. Microbial Conversion of Glycerol into Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids, by a basidiomycete Yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317*T. J Biosci Bioeng*. Osaka, v. 104, n. 1, p. 78–81, 2007.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Production of glycolipid biosurfactants, monnosylerythriol lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and their interfacial properties. *J Biosci Bioeng.* Osaka, v. 105, n. 5, p. 493-502, 2008.

MU, Y.; XIU, Z. L.; ZHANG, D. J. A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. Eng. J.* Oxford. v. 40, n. 3, p. 537–541, 2008.

MULLIGAN, C.N. Environmental aplications for biosurfactants. Disponível em: <http://www.nbb.org>. Acessado em 01 ago 2011.

Noha H. YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J.Microbiol Meth*, v. 56, p. 339– 347.2204.

Nacional Biodiesel Board. www.nbb.org. Acessado em fevereiro de 2013.

NELSON, D.L. COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5ª Ed., pg 805- 810, cap 2, 2011.

NITSCHKE, M.;PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Quím. Nova.* São Paulo. v. 25, n. 2, p. 772-776, 2002.

OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN YUNUS, W. M. Z. Glycerol residue – a rich source of glycerol and medium chain fatty acids. *J Oleo Sci.* Osaka, v. 53, n. 1, p. 29-33, 2004.

OZDEMIR, G.; PEKER,S.; HELVACI,S.S. Effect of pH on the surface and interfacial behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloid Surf A: Physicochem Eng Asp*. Amsterdam. v.26, n. 1-3, p.135-143, 2004.

PAPANIKOLAOU, S. AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single stage continuous culture. *Biores Technol.* Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 43-49, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT , I.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* Berlin. v. 58, n. 3, p. 308-312, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTUB, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenerg.* Oxford, v. 32, n. 1, p. 60-71, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHEZ, P.; PRESET, B., BLANCHARD F.; FICK, M. High production of 1,3-PDO from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *J Biotechnol*. Amsterdam, v. 77, n. 2-3, p. 191-208, 2000.

PARENTE, E. J. S. Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado. 1ª. ed, Tecbio: Fortaleza, 2003. 68p.

PERES. J. R. R.; FREITAS JUNIOR, E.; GAZZONI, D. L. Biocombustíveis: uma oportunidade para o agronegócio brasileiro. Disponível em: <http:://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 14 fev 2009.

POSADA, J. A.; CARDONA, C. A. Design and analysis of fuel ethanol production from raw glycerol. *Energy*. Amsterdam. v. 35, n. 12, p. 5286-5293, 2010.

PRIETO, L. M.; MICHELON, M.; BURKET, F.M.; KALIL, S.J.; BURKET, C. A. V. The production of ramnolipid by a Pseudomonas aeroginusa strain isolated from a southern coastal zone Brazil. *Chemosphere*. Oxford. v. 71, n.9, p. 1781-1785. 2008.

RAHMAT,N.; ABDULLAH, A. Z.; MOHAMED, A. Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: a critical review. *Ren Sust Energy Rev*, v. 14, n.3, p. 987-1000.2010

RAJENDRA, M.; JENA, P. C., RAHEMAN, H. Prediction of optimized pretreatment process parameters for biodiesel production using ANN and GA. *Fuel*. Amsterdam. v. 88, n. 5, p. 868–875, 2009.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Biores Technol.* Amsterdam, v. 99, n. 10, p. 3975–3981, 2008.

RATLEDGE, C. Single cell oils for the 21st century. In: COHEN, R. (Ed.).

raw glycerol waters*. Landbauforschung Völkenrode.* Berlin. v. 55, n. 4, p. 261–267, 2005.

RODRIGUES. L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R.Biosurfactants: potential applications in medicine**.** *J Antim Chem***.** v.9, 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos:uma estratégia seqüencial de planejamentos, 1ª ed., Campinas: Casa do Pão, 2005, 325p.

RUEGGER, M.J.S. Atividade enzimática e produção de ácido ɣ-linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-itatins- São Paulo. Tese (Instituto de biociências do campus do Rio Claro). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2001.

RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A.; ZAROWSKA, B. Biosynthesis of citric acid from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* A-101-1.31 in repeated-batch cultivations. *Eletronic J Polish Agric Univ.* Wrocław. v. 11, n. 1, 2008. Disponível em: <http://www.ejpau.media.pl/volume11/issue1/art-07.html>. Acesso em 09 set 2011.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIEN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; SANTOS, A. S.. PEREIRA Jr., N.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Braz J Chem Eng.* São Paulo, v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.

SANTOS, F.P.B. Produção de biossurfatante por Pseudomonas aeruginosa EQ109 a partir de glicerol. Tese (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SEBRAE - SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. Biodiesel. Disponível em <http://www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha_Sebrae.pdf>. Acessado em 24 fev 2008.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel.* Amsterdam, v. 87, n. 12, p. 2355-2373, 2008.

SHARMA, Y.; PARNAS, R.; LI, B. Bioenergy production from glycerol in hydrogen producing bioreactors (HPBs) and microbial fuel cells (MFCs). *Int J Hydrogen Energ.* Oxford. v. 36, n. 6, p. 3853-3861, 2011.

DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv.* Oxford, v. 27, n. 1, p. 30–39, 2009.

SMITH, P. C.; NGOTHAI, Y.; NGUYEN, Q. D.; O'NEILL, B. K., 2010. Improving the low temperature properties of biodiesel: methods and consequences. *Renew Energy.* Amsterdam. v. 35, n. 6, p. 1145–1151, 2010.

SONG, H.; LEE, S.Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microbiol Technolol.* Amsterdam. v. 39, n. 3, p. 352-361, 2006.

TIMM, S.L.; PEREIRA-NETTO, A.D.; OLIVEIRA, M.M. Fatty acids of *Trypanossoma cruzi. Comp. Biochem. Physiol. Great Britain.* v. 71B, n. 3, p. 397 - 402, 1982.

TSUGAWA, R.; NAKASE, T.; KOYABASHI, T.; YAMASHITA, K.; OKUMURA, S. Fermentation of *n*-parafins by yeast. Part III. A-Ketoglutarate productivity of various yeasts. *Agr Bio. Chem.* Tokyo. v. 33, p. 929-938, 1969.

WALDROUP, P. Glycerine, a byproduct of biodiesel production, can be used as a dietery supplement for growing chickens. In: ANNUAL ASAIM SOUTHEAST ASIAN FEED TECHNOLOGY AND NUTRITION WORKSHOP, 15, Bali, Indonesia, 2007.

WANG, S.H.;FERNANDES, S.M.; CABRAL, L.C. Solubilidade de nitrogênio, dispersibilidade de proteína e propriedades emulsificantes dos extratos hidrossolúveis desidratados de arroz e soja. *Ciênc. Tecnol*. *Aliment*. Campinas. v. 20, n.1, p. 12-17, 2000.

WANG, Z-X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol Adv.* Oxford, v. 19, n. 3, p. 201-223, 2001.

WEN, Z., PYLE, D. J.; ATHALYE, S. K. 2009. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acids from biodiesel-derived crude glycerol by microalgal and fungal fermentation. In: AGGELIS, G. (Ed.), Microbial Conversions of Raw Glycerol. : New York: Nova Science Publishers Inc., 2009, p. 41–63.

WILSON, E. K. The biodiesel production is increasing every year and in 2002. *Chem Eng News.* Columbus. v. 80, n. 27, p. 46, 2002.

WU,J.; JU,L.K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane formation by *Pseudomonas aeruginosa. J.Biotech*. v.59, p. 193-202.

WU,J-Y.; YEH, K-L.; LU, W-B.; LIN, C-L.; CHANG, J-S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresour Technol.* Barking. v. 99, n. 5, p. 1157-1164, 2008.

XIU, Z-L.; CHEN, X.; SUN, Y-Q.; ZHANG, D-J. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol-glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Biochem Eng J.* Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 42-52, 2007.

YANG, Q.; CHEN, B.; JI, X.; HE, Y. F.; CHEN, Q. G. Exergetic evaluation of corn-ethanol production in China. *Comm Nonlinear Sci Num Simulat.* Amsterdam, v. 14, n. 5, p. 2450-2461, 2009.

ZHAO, J; HUANG, Y.; XU, L.; CAI, X.; MA, Z.; ZHOU, L. Composition analysis of the volatile oil from endophytic fungus *Pichia guilliermondii* from *Paris polyphylla* var.*Yunnanensis* and its antibacterial activity. *J Biotechnol.* Weinheim, v. 5, p. 575-598, 2008.Amsterdam, v. 131, n. 2, suplemento 1, p. S-149-S150, 2007.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol*. Berlin. v. 42, n. 1, p. 67-73, 2002.

ZWEYTICK, D.; ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta*. Amsterdam. v. 1469, n. 2, p. 101–120, 2000.

Anexos

Anexo 1

Artigo

LIMA, J. R. C., CALIXTO, R., ALMEIDA, L. M. L., França, F.P. Utilization of crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 in bioproduct production. Journal of Chemistry and Chemical Engineering. , 2013.

J. Chem. Chem. Eng. 7 (2013) 1087-1093

Anexo 2

Congressos

Lima, J. R. C.; França, F.P. Synthesis of biosurfactant and lipids from glycerol by *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678. In: 35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.

LIMA, J. R. C., Felippe, C.E.C., França, F.P. *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678: Produção de biossurfatante a partir de glicerol bruto proveniente da produção de Biodiesel In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012, Búzios. XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Rio de Janeiro: Editora cubo, 2012. p.235 – 235.

LIMA, J. R. C., Felippe, C.E.C., França, F.P.Síntese de Biossurfatante e Co-produtos por *Yarrowia lipolytica* 50678 In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Aldatech Soluções, 2011.