



**Produção e extração de óleo intracelular por  
*Yarrowia lipolytica* utilizando a glicerina  
excedente da indústria de biocombustíveis como  
fonte de carbono**

Mariel Alkindar Soares

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca, D. Sc

Tamires Carvalho dos Santos, D. Sc

Maio de 2021

**PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE ÓLEO INTRACELULAR POR  
YARROWIA LIPOLYTICA UTILIZANDO A GLICERINA  
EXCEDENTE DA INDÚSTRIA DE BIOCOMBUSTÍVEIS COMO  
FONTE DE CARBONO**

*Mariel Alkindar Soares*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado por:

---

Bernardo Dias Ribeiro, D. Sc

---

Anita Ferreira do Valle, D. Sc

---

Tatiana Félix Ferreira, D. Sc

Orientado por:

---

Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca, D. Sc

---

Tamires Carvalho dos Santos, D. Sc

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Maio de 2021

Soares, Mariel Alkindar

Produção e extração de óleo intracelular por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerina excedente da indústria de biocombustíveis como fonte de carbono / Mariel Alkindar Soares. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2021  
XI, 60 p.; il.

(Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2021.

Orientadores: Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca e Tamires dos Santos

1. *Yarrowia lipolytica*. 2. Biocombustíveis. 3. Óleo intracelular. 4. Lise celular 5. Projeto Final de Curso. (Graduação – UFRJ/EQ). 6. Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca 7. Tamires dos Santos I. Produção de óleo intracelular por *Yarrowia lipolytica* utilizando a glicerina excedente da indústria de biocombustíveis como fonte de carbono

À minha fiel escudeira Oca e aos meus amados pais Marcos e Christiane.

“Na natureza nada se cria, nada se perde,  
tudo se transforma.”

Lavoisier, Antoine Laurent

“O ontem é uma história, o amanhã é um mistério,  
mas hoje é uma dádiva. É por isso que se chama presente.”

Kung Fu Panda

“In the long history of humankind (and animal kind, too)  
those who learned to collaborate and improvise  
most effectively have prevailed.”

Charles Darwin

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais Christiane e Marcos por acreditarem e torcerem por mim em todos os estágios do meu desenvolvimento. Em todos os momentos de fraqueza, eles me apoiaram, nunca deixando que eu duvidasse de mim.

Às minhas amigas do Cruzeiro Giovanna, Maria Eduarda, Larissa e Nathália por todo o apoio e carinho que me deram durante essa jornada. Obrigada por muitas vezes me acalmarem e me fazerem rir, em meio ao desespero, em todos os nossos encontros de uma amizade de mais de 15 anos.

À Érica Xavier, que levo da UFRJ para minha vida, muito obrigada por estar do meu lado, por me dar bronca quando eu precisava escutar, mas sempre me apoiando nas minhas decisões. Meus amigos de Bioprocessos: Pedro Henrique, Norman e Rafael por estarem do meu lado enfrentando todos os obstáculos apresentados durante nossa formação.

A todos os meus amigos da graduação, como Daniel, Mariana, Rafael, Nathalia e Pedro pela ajuda com materiais, pelos papos do corredor, pelas trocas de ideias, pelas risadas, pelas palavras de incentivo, enfim, por terem me proporcionado alegria em meio à uma rotina tão difícil. Nossos encontros no Diretório, seja para beber um café ou para uma partida de cartas, deixaram essa fase muito mais leve.

Às professoras orientadoras Priscilla Amaral e Tamires dos Santos e todo o pessoal do laboratório BIOSE por abrirem prontamente as portas do laboratório. Pela orientação, carinho, paciência e, principalmente, por sempre me apoiarem durante todo esse processo.

Ao professor Bernardo Ribeiro por me possibilitar a experiência de trabalhar em um laboratório no exterior e ter um contato com culturas, técnicas, matérias e áreas tão diferentes das que havia conhecido. Sem seu apoio, meu intercâmbio não teria sido tão especial.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE TECNOLOGIA

ESCOLA DE QUÍMICA



Resumo do Projeto Final apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de Engenharia de Bioprocessos.

## **PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE ÓLEO INTRACELULAR POR *YARROWIA LIPOLYTICA* UTILIZANDO A GLICERINA EXCEDENTES DA INDÚSTRIA DE BIOCOMBUSTÍVEIS COMO FONTE DE CARBONO**

Mariel Alkindar Soares (mariel.alkindar@gmail.com)

Maio, 2021

Orientador Responsável: Prof. Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca, D. Sc

Outros Orientadores: Prof. Tamires Carvalho dos Santos, D. Sc

Biodiesel é um dos biocombustíveis mais pesquisados atualmente como alternativa limpa e renovável para substituir combustíveis fósseis, causadores de poluição. Entretanto, a produção desse combustível gera glicerina como subproduto, sendo necessário buscar alternativas para absorver esse excedente e “fechar o ciclo de vida” dessa cadeia produtiva. Uma rota estudada é a sua biotransformação por microrganismos, como *Yarrowia lipolytica*, em outros produtos com valor agregado. Ensaio já sinalizaram a glicerina como potencial fonte de carbono e indutora de acúmulo lipídico, o qual pode ser utilizado na produção de novos biocombustíveis. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de óleo intracelular de *Y. lipolytica* avaliando metodologias de extração e sua viabilidade de produção em biorreator. Quatro cepas de *Y. lipolytica* foram cultivadas em Erlenmeyer de 500mL, constatando diferentes capacidades de acúmulo lipídico entre elas, sendo a cepa original IMUFRJ 50682 a que apresentou maior potencial de produção. Para o estudo da extração, foram testadas as combinações dos métodos: (i) físico-químico (ii); físico-enzimático com *Zymolyase* – 20 T de *Arthrobacter luteus*; (iii) físico-enzimático com enzimas de lise de *T. harzianum* (Sigma-aldrich L1412). O melhor método de extração foi o físico-enzimático com a enzima *Zymolyase* em uma concentração de 50mg/g de célula seca por 2horas, obtendo-se um percentual lipídico correspondente a 14,18%. No bioprocessos conduzido em um biorreator de 4L com glicerina P.A. como fonte carbono, no qual a concentração de biomassa se manteve constante em torno de 8,94g/L, a levedura chegou a acumular 33,67% de lipídeos.

# Índice

|   |    |
|---|----|
| Capítulo I – Introdução.....  | 1  |
| Capítulo II – Revisão Bibliográfica.....  | 3  |
| <b>II.1</b> – Economia Circular.....  | 3  |
| <b>II.2</b> – Biocombustíveis .....   | 5  |
| <b>II.2.1</b> – Produção de Biodiesel.....  | 6  |
| <b>II.2.2</b> – Gargalos do processo de produção de biodiesel.....                              | 9  |
| <b>II.3</b> – Subproduto da Indústria de Biocombustíveis.....                                   | 11 |
| <b>II.3.1</b> – Glicerina.....  | 11 |
| <b>II.3.2</b> – Bioconversão por microrganismos oleaginosos .....                               | 13 |
| <b>II.4</b> – Tecnologias para desenvolvimento de biodiesel a partir de fontes microbianas..... | 14 |
| <b>II.4.1</b> – Micro-organismos oleaginosos.....   | 15 |
| <b>II.4.2</b> – Óleo intracelular .....   | 16 |
| <b>II.5</b> – <i>Yarrowia lipolytica</i> .....  | 19 |
| Capítulo III – Objetivo .....   | 22 |
| <b>III.1</b> – Objetivo geral.....  | 22 |
| <b>III.2</b> - Objetivos específicos.....   | 22 |
| Capítulo IV – Materiais e Métodos .....   | 23 |
| <b>IV.1</b> – Materiais .....   | 23 |
| <b>IV.1.1</b> – Equipamentos .....  | 23 |
| <b>IV.1.2</b> – Reagentes.....  | 23 |
| <b>IV.2</b> – Métodos .....   | 24 |
| <b>IV.2.1</b> – Esterilização .....   | 24 |
| <b>IV.2.2</b> – Microrganismo .....   | 24 |
| <b>IV.2.3</b> – Produção de óleo intracelular.....  | 25 |



|   |    |
|---|----|
| IV.2.3.1 – Avaliação da produção de lipídeo intracelular em incubador rotatório.....                  | 25 |
| IV.2.4 –Extração de óleo intracelular.....  | 30 |
| IV.2.4.1 – Extração Físico-Enzimática.....  | 30 |
| IV.2.4.2 –Extração Físico-Química.....  | 34 |
| IV.2.5 – Métodos Analíticos .....   | 35 |
| IV.2.5.2– Determinação do pH.....   | 36 |
| Capítulo V – Resultados e Discussão.....  | 37 |
| V.1 – Avaliação da produção óleo intracelular por diferentes cepas de <i>Yarrowia lipolytica</i> .... | 37 |
| V.2 – Seleção do método de extração de lipídeos intracelular .....                                    | 40 |
| V.3 – Análise de produção de óleo intracelular .....  | 43 |
| Capítulo VI – Conclusão .....   | 47 |
| Capítulo VII – Referências Bibliográficas.....  | 48 |

## Índice Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1- Economia Circular. Fonte: (adaptado de COMISSÃO EUROPEIA, 2014a) .....   | 4  |
| Figura 2- Funcionamento da cadeia da economia circular. Fonte: (adaptado de “Financing the circular economy Capturing the opportunity,” 2015).....   | 5  |
| Figura 3- Reação global de Transesterificação de triglicerídeos. Fonte: (LOPES et al., 2014) .....   | 7  |
| Figura 4- Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e intesterificação catalisadas por lipases. Fonte: (CARVALHO et al., 2003) .....   | 8  |
| Figura 5- Produção de biodiesel no Brasil. Fonte: (“Anuário Estatístico 2020,” 2020). .....  | 10 |
| Figura 6 - Estrutura do Glicerol. Fonte: (LOPES et al., 2014).....   | 11 |
| Figura 7- Estrutura do (1) ácido oleico e (2) ácido linoleico. Fonte: (Adaptado de ZANOTTO et al., 2009).....  | 15 |
| Figura 8- Biossíntese lipídica com limitação de Nitrogênio. Fonte: (adaptado de RATLEDGE et al., 2004).....  | 17 |
| Figura 9- Microscopia ótica de cepa de <i>Yarrowia lipolytica</i> . Fonte: (DUTRA, 2010).....  | 19 |
| Figura 10 - Corpúsculo lipídico em <i>Yarrowia lipolytica</i> Fonte: (FICKERS., et al., 2005).....   | 21 |
| Figura 11- Microscopia da levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 (aumento de 1000x). Fonte: (FONTES 2018).....   | 25 |
| Figura 12 - Erlenmeyer de 500 mL utilizado no experimento contendo meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A. e a levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682. Fonte: (O autor 2018).....  | 27 |
| Figura 13 - Reator utilizado no experimento contendo meio YPG (extrato de lêvedo 1%, peptona 2% e glicerina PA 2%) desligado e as células da levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 decantadas. Fonte: (O autor 2018).....   | 28 |
| Figura 14 – Biorreator de 4L utilizado no experimento contendo em meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A. e a levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682. Fonte: (O autor 2018).....   | 29 |
| Figura 15- Amostrada levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 cultivada em biorreator de 4L utilizando meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A. (a) e amostra centrifugada, preparada para o armazenamento (b). Fonte: (O autor 2018) ..... | 30 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 16 – Sistema de Extração Físico-Enzimática. Fonte: (O autor 2021) .....   | 32 |
| Figura 17 – Balão de separação após 2 minutos de repouso apresentando a separação entre a fase orgânica, na parte superior que possui o lipídeo intracelular e o solvente Hexano, e aquosa, parte inferior contendo o restante da amostra. Fonte: (O autor 2018).....  | 33 |
| Figura 18 - Sistema de Extração Físico-Química. Fonte: (O autor 2021) .....  | 34 |
| Figura 19 - Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular através de medidas de absorvância em espectrofotômetro .....  | 35 |
| Figura 20- Morfologia microscópica da levedura <i>Y. lipolytica</i> das respectivas cepas: (a) IMUFRJ 50682; (b) 50682-1; (c) 50682-2; (d) 50682-3 (aumento de 1000x Fonte: O autor 2018).....   | 37 |
| Figura 21 - Cinética de crescimento celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> em escala logarítmica com as cepas obtidas utilizando a técnica de repique para conservação de microrganismo, em frascos de Erlenmeyer em meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A.. As concentrações iniciais de cada cepa foram: (8,1 g/L) IMUFRJ 50682, (8,2 g/L) 50682-1, (9,4 g/L) 50682-2 e (7,7 g/L) 50682-3. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. .... | 38 |
| Figura 22- Óleo microbiano extraído no experimento em meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A. e a levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682 em Biorreator de 4L após 168 horas de produção. Fonte: (O autor 2018) .....   | 44 |
| Figura 23 - Perfil de variação de pH durante o cultivo de <i>Yarrowia lipolytica</i> em Biorreator contendo meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A. (PAPANIKOLAU et al, 2002).....   | 44 |
| Figura 24- Curva de concentração celular da <i>Yarrowia lipolytica</i> durante o seu processo de produção de bio-óleo (▪) e a concentração do mesmo (•) durante cultivo em meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al., 2002 contendo glicerina P.A.. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.....  | 46 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1- Propriedades físico-químicas do glicerol a 20°C. Fonte: (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).....  | 12 |
| Tabela 2- Síntese de estudos de produção de metabólitos por <i>Yarrowia lipolytica</i> utilizando glicerol com fonte de carbono. Fonte: (RYWINSKA, 2013). .....   | 20 |
| Tabela 3 - Composição do meio mineral tamponado (PAPANIKOLAU et al., 2002).....   | 26 |
| Tabela 4 - Concentrações enzimáticas e tempos de ação enzimática utilizadas na extração de óleo intracelular de <i>Y. lipolytica</i> .....  | 31 |
| Tabela 5- Óleo intracelular acumulado durante o cultivo de <i>Yarrowia lipolytica</i> em incubadora com agitação (shaker) Tecnal TE-4200 extraído pelo método físico-enzimático utilizando a enzima <i>T. harzianum</i> (Sigma-aldrich L1412) por 2 horas a 50 mg por 1 g de célula seca.....   | 40 |
| Tabela 6- Análise comparativa de métodos de extração físico-enzimático e físico-químico de óleo intracelular acumulado durante o cultivo de <i>Yarrowia lipolytica</i> em incubadora com agitação (shaker Tecnal TE-4200), em meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A., após 120 horas de cultivo..... | 41 |

## Capítulo I – Introdução

Desde meados do século XX, com o choque do petróleo e a constatação dos impactos causados pela queima de combustíveis fósseis e seus derivados, alternativas que proporcionassem a sua substituição vêm sendo pesquisadas. O objetivo é diminuir a dependência em outros países para o fornecimento de petróleo, além de fontes mais limpas e renováveis (SANTOS, 2012). Uma forma encontrada para substituir os combustíveis de origem fóssil foram os biocombustíveis (CARDOSO, 2012). Diversas políticas já foram criadas com o objetivo de impulsionar estudos dessas tecnologias mais verdes, como o Tratado de Kyoto a nível mundial (GORECKI et al., 2010) e a Lei nº 11.097 a nível nacional, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira.

Esta indústria óleo-química, entretanto, gera uma grande quantidade de glicerina como subproduto. Sendo que, para cada tonelada de biodiesel obtido, são gerados 100 kg de glicerina excedente (BOWKER et al., 2008). Sua concentração no mercado vem aumentando simultaneamente com a demanda de biodiesel, no entanto não vem sendo totalmente absorvida pelo mercado (ALEXANDRE UMPIERRE; FABRICIO MACHADO, 2013). Neste contexto, tendo em vista como a economia atual funciona em Fluxo Linear – extrair, transformar e descartar – (ÁLVARO, 2018), teme-se que o excesso de subproduto seja descartado de maneira a prejudicar o meio ambiente (COSTA, 2008).

Com base na economia circular, que anula o termo resíduo (STAHEL, 1984), maneiras de reincorporar a glicerina ao ciclo de produção vêm sendo estudadas, sendo a biotransformação por via fermentativa uma alternativa bastante promissora para fechar o ciclo de vida dessa indústria de biodiesel (SILVA et al., 2009). Neste processo, o glicerol bruto pode ser utilizado como fonte de energia para produção de óleo microbiano por microrganismos oleaginosos (PAPANIKOLAOS et al., 2008).

Tais seres vivos, ditos como oleaginosos, são aqueles capazes de armazenar grandes quantidades de lipídeos em corpúsculos intracelulares na forma de triacilgliceróis. Como a estrutura e a composição desses óleos são semelhantes aos de óleos vegetais comuns, eles podem ser utilizados na transesterificação com álcoois de cadeia curta na presença de um catalisador para produzir mais biodiesel (RATLEDGE, 2002).

A espécie *Yarrowia lipolytica* é uma das leveduras “não convencionais” mais estudadas, pois possui uma enorme capacidade de gerar produtos de grande interesse industrial, como as lipases, o ácido cítrico e o lipídeo intracelular. Alguns ensaios também já retrataram a sua capacidade de utilizar glicerina bruta como fonte de carbono para o crescimento de biomassa e acúmulo de lipídeos (PAPANIKOLAOUS et al., 2002).

Tendo em vista estes grandes potenciais citados, o presente estudo buscou avaliar a produção e a extração de óleo intracelular de *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono. O foco deste trabalho foi na seleção de uma dentre quatro cepas de *Yarrowia lipolytica* com maior potencial de acúmulo de óleo microbiano, nos métodos de extração mais eficientes e na viabilidade dessa produção em escalas maiores.

## Capítulo II – Revisão Bibliográfica

### II.1 – Economia Circular

O planeta em que vivemos possui recursos finitos, limitados. O modo e a velocidade como utilizamos os seus recursos naturais, seu espaço e sua capacidade de assimilar a poluição gerada pelo ser humano não é sustentável (MEADOWS, MEADOWS, RANDERS & BEHRENS, 1972; CHEN, BOUDREAU & WATSON, 2008; SPANGENBERG, FUAD-LUKE & BLINCOE, 2010). Ao mantermos o atual estilo de vida do século XXI, estamos ultrapassando a biocapacidade da Terra em pelo menos 56%, ocasionando a maior aceleração das mudanças climáticas já existente (WORLD WIDE FUND FOR NATURE [WWF], 2020). Dessa forma, é essencial uma atualização no modelo de desenvolvimento econômico de Fluxo Linear – extrair, transformar e descartar – de recursos adotado pelos países e empresas, para um onde exista uma racionalidade entre a economia e o meio ambiente durante o processo de tomada de decisão (LEITÃO, 2015).

Essa problemática foi posta em evidência durante a Conferência Rio-92 e vem sendo recorrentemente colocada em pauta desde então. Novas abordagens vêm sendo estudadas, tendo em vista a limitação de recursos, de formas de produção, de utilização e de descarte de produtos (BRAUNGART & MCDONOUGH, 2002; HAWKEN ET AL., 2007). Porém, a ideia de um circuito econômico fechado teve sua origem aproximadamente 10 anos antes dessa conferência. Em 1982, o arquiteto Walter R. Stahel publicou o artigo *The Product-Life Factor*, no qual o autor já defendia a extensão da vida útil dos materiais, focando na reutilização, reparação, renovação e reciclagem (STAHEL, 1984).

Essa ideia do arquiteto junto com o enfoque global nesta problemática influenciaram a construção do modelo hoje conhecido como Economia Circular. Neste sistema, a estrutura do mundo moderno se basearia no funcionamento da própria natureza de “fechar o ciclo de vida” industrial, onde o termo resíduo não existe (STAHEL, 1984). Ele propõe uma nova relação entre as empresas, as quais passariam a ser ao mesmo tempo consumidoras e fornecedoras de matérias primas, reincorporando-as ao ciclo de produção (ELLEN MACARTHUR FOUNDATION, 2012, 2013, 2014).

Ao se observar a Figura 1, pode-se entender que o esquema da Economia Circular visa a otimização do fluxo de matérias, potencializando o rendimento dos recursos naturais e

minimizando a geração de resíduos. Assim, possibilita-se a maximização do valor econômico do produto. Com esta postura, o sistema traz consigo novas oportunidades de inovação e de design nos mais diversos níveis, além de estimular o crescimento da sociedade de forma mais inteligente, sustentável e integrada, se opondo à ideia de que o crescimento é prejudicial ao meio ambiente (LEITÃO, 2015).



Figura 1- Economia Circular. Fonte: (adaptado de COMISSÃO EUROPEIA, 2014a)

Este modelo regenerativo possui a divisão materiais em dois grupos: os técnicos e os biológicos (Figura 2). O primeiro é relativo à utilização de materiais sintéticos ou minerais continuamente, sendo agora considerado matéria prima para outro processo, sem perda da qualidade (BRAUNGART et al., 2007). O grupo ainda necessita de investimentos em inovação para ser recuperado e desmontado (LABOISSIÈRE DE AZEVEDO, 2015). O segundo grupo visa a reinserção do material na natureza, onde se tornam nutrientes biológicos ao serem absorvidos pelo meio ambiente, ou seja, são biodegradados (BRAUNGART & MCDONOUGH, 2002, 2013).



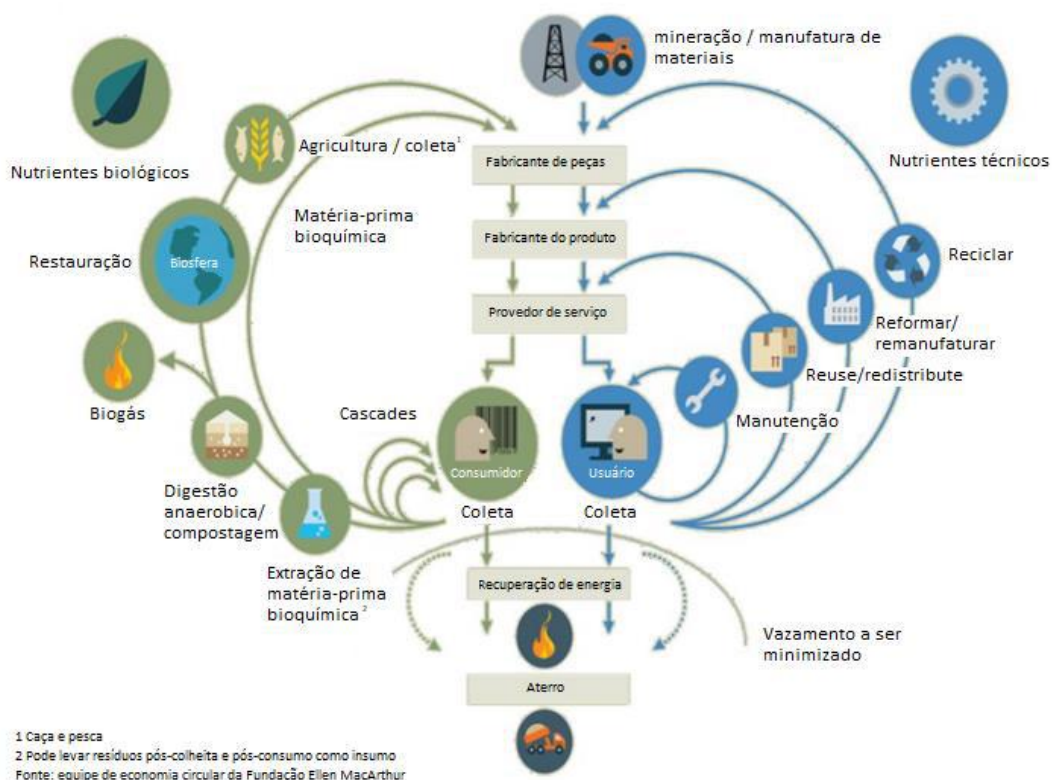


Figura 2- Funcionamento da cadeia da economia circular. Fonte: (adaptado de “Financing the circular economy Capturing the opportunity,” 2015)

Em suma, essa perspectiva de indústria regenerativa incentiva o crescimento de diversas linhas de pesquisas com bases sólidas e com futuro. Ela traz consigo vantagens competitivas em um mercado dinâmico, globalizado e com exigências ecológicas. Ela fomenta a mudança do estilo de vida destrutivo e predatório do ser humano contemporâneo.

## II.2 – Biocombustíveis

Quando se tem em mente o desenvolvimento da nossa economia, pode-se observar que a energia está intimamente entrelaçada com esse crescimento. Desde seus primórdios, com a descoberta do fogo, a humanidade transporece essa dependência. Porém, ao utilizar os recursos

naturais e fósseis de forma descontrolada, nunca se levou em consideração os impactos ambientais que sua produção gerava (CARDOSO, 2012). Com o crescente consumo de energia mundial desde o meio do século XX – grande parte proveniente da evolução das áreas tecnológica e econômica – houve um aumento na demanda de investimentos em novas fontes de energia e em novas aplicações das fontes existentes de forma a suprir a demanda energética mundial (GOLDEMBERG, 2000).

Dessa forma, a energia vem sendo um grande ponto focal de estudo da nossa sociedade. Entre outros fatores, o econômico e o ambiental contribuem com maior peso para a inevitabilidade do desenvolvimento de novas fontes energéticas, devido ao recorrente aumento do preço do barril do petróleo e à queima de combustíveis fósseis (CARDOSO, 2012).

Neste cenário, uma das energias de destaque são os biocombustíveis, os quais têm o potencial de substituir os combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão. Esta alternativa vem sendo testada desde o final do século XX e apresentando resultados satisfatórios no próprio motor a diesel (PINTO et al., 2005). Isso se deve ao fato de suas propriedades físico-químicas serem semelhantes aos combustíveis de origem fóssil, podendo assim ser utilizada diretamente em motores convencionais. Para isto, necessita de mínimas modificações para operar. Além disso, também pode ser usada pura ou não, uma vez que se mistura facilmente com o diesel de petróleo, tornando-se um aditivo, e não requer armazenamento especial (JANUÁRIO; MARINHO; OLIVEIRA et al., 2019).

O biodiesel pode ser produzido a partir de fontes de energia renováveis de forma a contribuir para a redução da emissão de gases nocivos ao ambiente (PRETO-MG, 2015). Esse combustível é biodegradável, atóxico e praticamente livre de enxofre e aromáticos, se destacando por causa da sua ampla disponibilidade e baixo custo – além de ser considerado um combustível ecológico pela legislação brasileira. De acordo com a Resolução nº 7 de 19 de março de 2008 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) contida no Regulamento Técnico ANP nº. 42/2004 (ANP, 2004), o biodiesel é definido como “um combustível composto de alquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleo vegetal ou gordura animal”.

### **II.2.1 – Produção de Biodiesel**

A principal tecnologia para obtenção de biodiesel é a transesterificação alcalina homogênea de óleos e gorduras (Figura 3). Neste processo ocorre a mistura entre óleos ou

gorduras, que são compostos formados basicamente de tri-ésteres de glicerol com ácidos graxos, metanol ou etanol – o qual é utilizado em excesso devido à reversibilidade da reação para direcionar o seu equilíbrio no sentido do produto – e um catalisador. Essa reação resulta em uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e glicerina (SUAREZ et al., 2009).

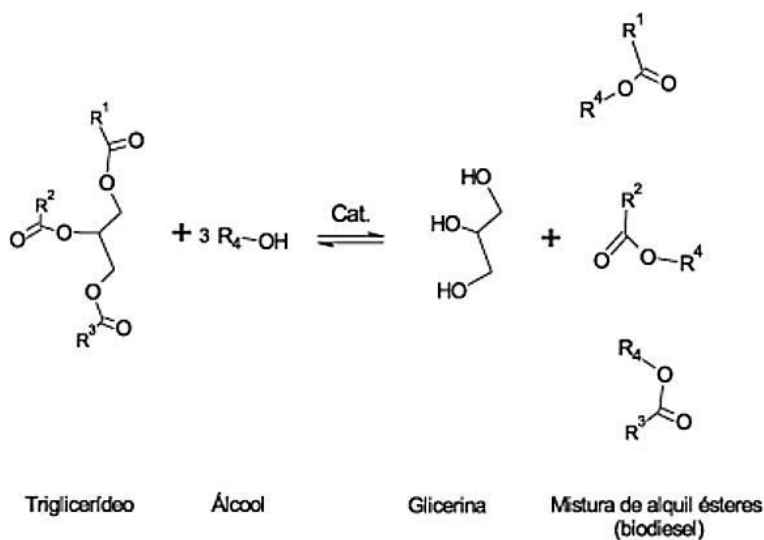


Figura 3- Reação global de Transesterificação de triglicerídeos. Fonte: (LOPES et al., 2014)

O álcool mais comumente empregado nesse processo de transesterificação de óleos e gorduras no Brasil é o etanol por ser significativamente menos tóxico e produz biodiesel com maior número de cetano e lubricidade (LOBO et al., 2009). Entretanto, tem como desvantagem uma maior dispersão de glicerol durante seu processo de síntese, com razão molar de produção entre 9:1 e 12:1 (LOBO et al., 2009). Existem diversas matérias primas que podem ser utilizadas na produção do etanol e, no Brasil, a cana-de-açúcar é a mais utilizada – enquanto, nos Estados Unidos, o milho cumpre este papel (DELMIRO, THALITA MARREIRO et al., 2020). Essa reação poder ser detalhadamente observada na Figura 4.

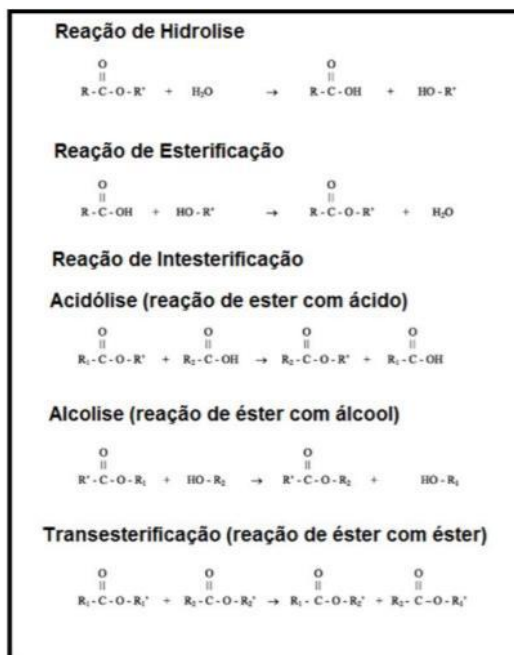


Figura 4- Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e intesterificação catalisadas por lipases. Fonte: (CARVALHO et al., 2003)

Ao fim dessas etapas, apresentam-se duas fases separáveis por decantação e/ou centrifugação. A fase mais densa é composta de glicerina bruta, impregnada dos excessos utilizados de álcool, água e de impurezas inerentes à matéria prima. A outra fase é constituída de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, conforme a natureza do álcool originalmente adotado (SUAREZ et al., 2009).

Assim, com o aumento da produção do biodiesel, uma crescente produção de glicerol o acompanha. Este fato gera grande preocupação com relação à assimilação desse excedente pelo mercado mundial: a viabilização comercial do biodiesel passa pelo consumo deste volume extra de glicerol que está sendo gerado. Diversas alternativas vêm sendo desenvolvidas para encontrar aplicações deste substrato em larga escala e geração de valor agregado à cadeia produtiva (ARRUDA, RODRIGUES e FELIPE, 2007).

## II.2.2 – Gargalos do processo de produção de biodiesel

Um dos principais obstáculos dessa alternativa energética, do ponto de vista econômico, são os altos preços da matéria prima, o óleo vegetal. Este pode contabilizar de 70 a 85% do custo de produção (KITCHA; CHEIRSILP, 2011), além do cultivo de plantas oleaginosas no mundo não estar acompanhando esse crescimento de demanda energética junto à demanda alimentícia (SITEPU et al., 2014). Por esses motivos, a sua utilização para produzir combustíveis pode se tornar impraticável no futuro, principalmente no continente europeu, onde as terras aráveis disponíveis são menores. Fatores como clima e questões geopolíticas também podem afetar o crescimento desse combustível (DONOT et al., 2014).

Enquanto busca-se um processo de produção do biodiesel otimizado para reduzir seu custo e atender às especificações brasileiras e internacionais (QUINTELLA et al., 2009), diversas legislações vêm sendo aplicadas de modo a incentivar a utilização do biocombustível enquanto ele ainda não é economicamente vantajoso quando comparado à sua versão mineral. Em 2005, a Lei nº 11.097 introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira e ampliou a competência administrativa da ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), que 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. Em 2015, foi assinada a Resolução do Conselho Interministerial do Açúcar e do Alcool (CIMA) de modo a ampliar o percentual obrigatório de adição de etanol anidro de 25% para 27% na gasolina comum (BRASIL, 2014). Adicionalmente, implementou a Lei nº 13.263/2016 (BRASIL, 2016), que altera a Lei nº 13.033/2014 (BRASIL, 2014), assim estabelecendo um cronograma de aumento do teor do biodiesel a partir de 2017. Neste último, o incremento até março de 2017 seria de 8%, até março de 2018, 9% e até março de 2019, 10% (BRASIL, 2016).

Devido à essas políticas internas, o Brasil se posiciona como o segundo maior produtor de biodiesel do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (TOMÉ, 2019). Segundo os últimos dados de produção acumulada relatados pelo Ministério de Minas e Energia (2019) e demonstrados na Figura 5, em 2018 a nossa produção contabilizou mais de  $5,0 \times 10^6$  m<sup>3</sup>. Até setembro de 2019, nossa produção acumulativa já era 10% superior à do mesmo período de 2018 (LOPES et al., 2020). Levando em consideração a postura econômica e política do país, se espera um aumento contínuo dessa produção.

Em 2019, o Brasil alcançou a marca de 11% de biodiesel adicionado ao óleo diesel de origem fóssil, conforme estipulado pela Lei nº 13.033/2014 citada acima, chegando à marca de 9,2 milhões de m<sup>3</sup> de biodiesel produzidos naquele ano. Essa geração acarretou a síntese de 494.6 mil m<sup>3</sup> de glicerina bruta como subproduto, cerca de 12.3% a mais que no ano anterior (“Anuário Estatístico 2020,” 2020).

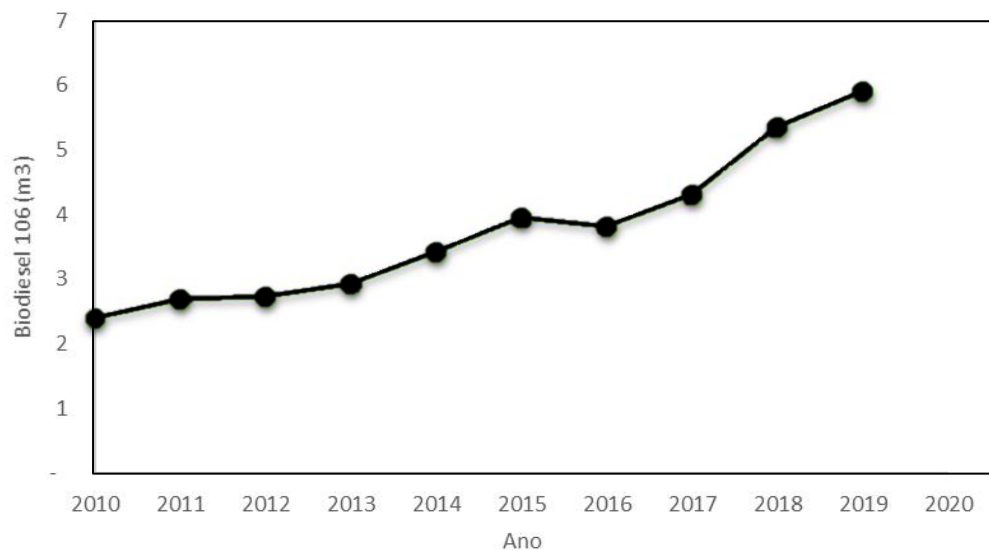


Figura 5- Produção de biodiesel no Brasil. Fonte: (“Anuário Estatístico 2020,” 2020).

De um ponto de vista mais global, diversas estratégias também vêm sendo desenhadas para incentivar a utilização de biodiesel, como exemplo o Protocolo de Kyoto. Este estabeleceu que os países considerados industrializados se comprometem a reduzir, entre 2008 e 2012, suas emissões de dióxido de carbono e outros cinco gases que causam efeito estufa. Foram 141 os países que ratificaram o acordo, sendo 38 países industrializados (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2019). Em 2011, os Estados Unidos e, logo depois, o Canadá se retiraram do acordo, dando sinais de que o Protocolo fracassaria. Porém, em 2012, as emissões dos países industrializados caíram 20% quando comparado a 1990, o que significa cinco vezes a meta estipulada em Kyoto (MARCO, 2020).

## II.3 – Subproduto da Indústria de Biocombustíveis

### II.3.1 – Glicerina

Do ponto de vista químico, o glicerol consiste em um tri-álcool com 3 carbonos (Figura 6), com o nome sistemático de (IUPAC) 1,2,3-propanotriol - termo aplicado somente ao componente químico puro. Já o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados, normalmente, contendo pelo menos 95% de glicerol. A substância pura é um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímica. A presença de três grupos hidroxila em sua estrutura é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica. É uma molécula altamente flexível formando ligações de hidrogênio tanto intra como intermoleculares (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).

Suas propriedades físicas observadas na Tabela 1 podem ser bem entendidas analisando sua estrutura molecular, a qual permite uma série de ligações de hidrogênio, podendo realizar até seis dessas ligações. Adicionalmente, a presença de um grupo hidroxila ligado a cada um dos três átomos de carbono faz dessa substância uma excelente candidata para diversas reações químicas (PAGLIARO e ROSSI, 2008).

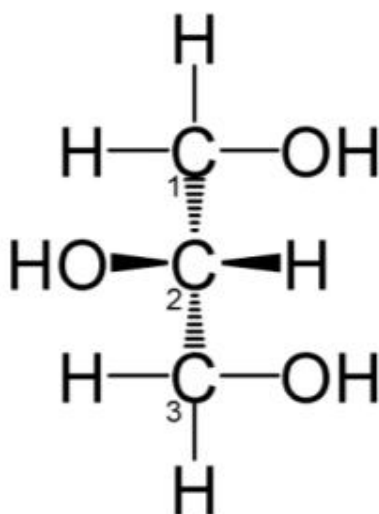


Figura 6 - Estrutura do Glicerol. Fonte: (LOPES et al., 2014)

Tabela 1- Propriedades físico-químicas do glicerol a 20 °C. Fonte: (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011)

| Fórmula química             | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> |
|-----------------------------|--|
| Massa molecular             | 92,09382 g mol <sup>-1</sup>                 |
| Densidade                   | 1,261 g cm <sup>-3</sup>                     |
| Viscosidade                 | 1,5 Pa s                                     |
| Ponto de fusão              | 18,2 °C                                      |
| Ponto de ebulição           | 290 °C                                       |
| Calorias                    | 4,32 kcal g <sup>-1</sup>                    |
| Ponto de fulgor             | 160 °C                                       |
| Tensão superficial          | 64,00 mN m <sup>-1</sup>                     |
| Coefficiente de temperatura | -0,0598 mN (mK) <sup>-1</sup>                |

Quando resultante da fabricação do biodiesel, a glicerina bruta vegetal apresenta cerca de 20% de impurezas (LOPES et al., 2014), podendo ser chamada também de glicerina loira. Neste processo, a fase glicerínica sofre um tratamento ácido para neutralização do catalisador e para remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo. Em geral, esta glicerina contém cerca de 80% de glicerol, além de água, metanol e sais dissolvidos (MOTA et al., 2009). Pode conter também outros contaminantes como: sabão, de compostos de fósforo, potássio, cálcio, silício, sódio e zinco em quantidades diferentes, ésteres, álcool e óleo residual (RYWINSKA et al., 2013). Essa variação de impurezas afeta diretamente seu preço de mercado, principalmente dependendo do tipo da oleaginosa e do tipo de catálise empregada na produção do biodiesel. Conseqüentemente, a glicerina bruta tem poucas aplicações diretas (PAGLIARO; ROSSI, 2008).

Sua purificação pode ser realizada de diversas maneiras, dependendo das impurezas e das características do produto final almejado, como cor, odor e impurezas. Por destilação sob pressão reduzida, por exemplo, resulta em um produto transparente. Outro método, mais econômico, para a purificação é a combinação entre eletro diálise (membranas) e nano filtros, fornecendo um líquido transparente com baixo teor de sais. Esta glicerina parcialmente purificada pode também passar por mais um processo de purificação através de resinas de troca iônica para se obter glicerina com mais de 99,5% de pureza (PAGLIARO E ROSSI, 2008).

Entretanto, essa necessidade de realizar diversas etapas de purificação agrega um custo que torna a utilização do glicerol menos viável do ponto de vista econômico. Principalmente,



levando-se em consideração que os custos de implantação de uma fábrica para purificação da glicerina bruta são maiores que os necessários para instalação da própria planta de produção do biodiesel (LOPES et al., 2014). Outro fato a se destacar é o faturamento obtido com esse produto purificado alcançar apenas 10 a 15% do volume de negócios do biodiesel. Dessa forma, fábricas com capacidade de produção menor que 50.000 a 70.000 T / ano de biodiesel não são capazes de cobrir os custos de produção, investimento e capital com a venda da glicerina refinada.

Apesar de existir uma demanda desse subproduto na economia moderna, baseada em cosméticos, produtos alimentícios e em revenda para consumo direto (PAGLIARO; ROSSI, 2008), as quantidades hoje produzidas não conseguem ser absorvidas. Há então um gargalo tecnológico na introdução de biodiesel ao diesel mineral, sendo necessário encontrar alternativas para convertê-lo em um produto de maior valor agregado (ALEXANDRE UMPIERRE; FABRICIO MACHADO, 2013).

Além disso, biodiesel com altas concentrações desse composto orgânico pode ter problemas de armazenamento, pois, quando misturado com o diesel de petróleo, observa-se a separação da glicerina nos tanques de estocagem; a formação de depósitos; o entupimento dos bicos injetores do motor e as emissões de aldeídos (LOBO et al., 2009). A sua forma livre residual pode ser facilmente eliminada através de lavagens e, embora seja praticamente insolúvel no biodiesel, a glicerina pode ser encontrada dispersa na forma de gotículas.

### **II.3.2 – Bioconversão por microrganismos oleaginosos**

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de buscar alternativas para converter a glicerina, advinda da produção de biodiesel por transesterificação alcalina homogênea de óleos e gorduras (SUAREZ et al., 2009), em um produto de maior valor agregado (ALEXANDRE UMPIERRE; FABRICIO MACHADO, 2013). Uma das linhas de estudo é utilizá-la como fonte de carbono para a sua bioconversão por bactérias, leveduras, fungos filamentosos e microalgas em produtos de interesse industrial (LOPES et al., 2014).

Essa investigação busca não apenas solucionar o gargalo relacionado ao excedente da indústria de biocombustíveis, mas também funcionaria como substituto para fontes de carbono tradicionais e mais onerosas. Desse modo, produziria-se um impacto economicamente positivo também para esses processos. Esta investigação é extremamente importante pois o maior gargalo desta alternativa é exatamente o elevado custo com as fontes de carbono para sua produção,

chegando a representar até 80% do custo total (QIN et al., 2017). Além disso, a glicerina já possui em sua composição elementos nutricionais como fósforo, magnésio, cálcio, enxofre, nitrogênio e sódio, que podem ser utilizados no crescimento desses seres vivos nos processos fermentativos (ITO et al., 2005). Entretanto, deve-se ressaltar a principal desvantagem de sua utilização nesses tipos de cultivo: a grande quantidade de sais de cloro presentes, advindas da síntese via catálise básica. Esse sal pode inibir o crescimento do microrganismo e diminuir a formação de produtos (ITO et al., 2005), porém estudos mostram que esse sal não afeta leveduras do mesmo modo que outros microrganismo, não levando a inibição do crescimento ou diminuindo a formação de produtos (VIEIRA et al., 2010).

A bioconversão da glicerina por microrganismos oleaginosos pode gerar produtos de interesse industrial, como o óleo intracelular (LOPES et al., 2014). Este bioproduto apresenta um enorme potencial econômico por possuir uma composição semelhante à de óleos de alto valor agregado (PAPANIKOLAOU E AGGELIS, 2011), como os óleos vegetais (RATLEDGE, 1986; VICENTE et al., 2009; ZHENG et al., 2012). Devido às suas características, poderia futuramente funcionar como substituto para os combustíveis de origem mineral e gerar biocombustíveis advindos desse óleo produzido pelos microrganismos oleaginosos (DOBROWOLSKI et al., 2016).

#### **II.4 – Tecnologias para desenvolvimento de biodiesel a partir de fontes microbianas**

Pesquisas relacionadas à utilização de lipídeos microbiológicos se originaram durante a Primeira e Segunda Guerras Mundiais, na Alemanha, devido à sua perda de acesso aos seus principais fornecedores de óleo vegetal (RATLEDGE e WYNN, 2002). Porém, essa linha de desenvolvimento diminuiu após o cessar da guerra em 1945, devido ao seu elevado custo ao se comparar com a produção e importação dos óleos convencionais (RATLEDGE e WYNN, 2002). Todavia, nos últimos anos essa linha de estudo voltou a crescer por prometer ser uma alternativa sustentável ao uso de combustíveis fósseis e não competir com o setor alimentício (ROSA et al., 2015).

#### II.4.1 – Micro-organismos oleaginosos

Diversos microrganismos são capazes de sintetizar lipídeos, pois eles são utilizados pelas células para funções essenciais e estruturas (DOWHAN E BOGDANOV, 2013). Algumas microalgas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras são capazes de acumular de 20 a 80% de lipídeos de sua biomassa seca durante o período de estresse metabólico (RATLEDGE E WYNN, 2002; MENG et al., 2009). Esse perfil quantitativo, além do qualitativo, depende do tipo de microrganismo e das suas condições de cultivo – como a fonte de carbono, o pH, a temperatura e a natureza do microrganismo, ou seja, espécies e estirpe específica (DONOT et al., 2014). Dessa forma, nem todos eles podem ser utilizados como matéria prima para a produção de biodiesel, necessitando uma seleção e estudo detalhados das espécies (KHOT et al., 2012; HUSSAIN et al., 2014).

As leveduras são particularmente mais atraentes para o desenvolvimento dessa tecnologia por não possuírem endotoxinas e por serem unicelulares, facilmente melhoráveis geneticamente e apropriadas para fermentação em grande escala (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN et al., 2011). É importante ressaltar que a maioria dos seus lipídeos possui um perfil bastante semelhante aos triacilgliceróis (TAG) de origem vegetal convencional (RATTRAY, 1989), tais como o oléico e linoléico (RATLEDG, 1986) (Figura 7), que são as principais matérias primas para a produção de biodiesel (POLI, 2014).

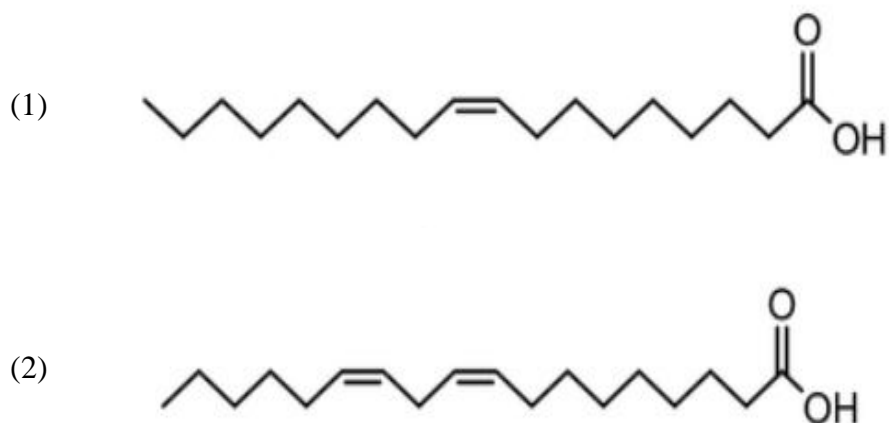


Figura 7- Estrutura do (1) ácido oleico e (2) ácido linoleico. Fonte: (Adaptado de ZANOTTO et al., 2009)

Ao serem comparados com os óleos vegetais, as diversas vantagens do lipídeo microbiano são que, em primeiro lugar, a produção não é afetada por mudanças climáticas. Em segundo, não há um grande consumo de água doce. Além disso, ele demanda menor tempo e espaço (ZHU; ZONG; WU et al., 2008). Por isso, este lipídeo vem se tornando uma enorme alternativa para ser uma fonte de matéria prima oleaginosa para a produção de biocombustíveis. Entretanto, a maior parte dos estudos relacionados à produção de óleo microbiano utiliza glicose de alta pureza como fonte de carbono, o que é impraticável em escala industrial devido ao seu valor, que pode chegar a 80% do custo total da produção, cerca de US\$ 500 / t (KOUTINAS et al., 2014). Assim, para tornar essa alternativa economicamente competitiva, se torna fundamental minimizar os custos relacionados à obtenção de substratos.

#### **II.4.2 – Óleo intracelular**

De um modo geral, lipídeos microbianos são acumulados como uma forma de armazenar energia, em condições específicas. Estudos mostram que, ao limitar o nitrogênio enquanto há carbono em excesso durante o crescimento celular, este acúmulo é favorecido (Figura 8) (PINZI e DORADO, 2012). Isso ocorre, pois, esta limitação de nutriente leva às taxas de crescimento celular ficarem mais brandas e tanto a síntese de proteína quanto de ácidos nucleicos cessa. Especificamente em espécies oleaginosas, o carbono em excesso é convertido em lipídeos, levando à formação de corpos lipídicos (GRANGER et al., 1993; RATLEDGE e WYNN, 2002).

A geração desse óleo se inicia durante o crescimento exponencial tardio e segue durante a fase estacionária (BEOPOULOS et al., 2011; CASTANHA et al., 2014), podendo ser acumulado por dois processos metabólicos diferentes: “de novo” e “ex novo”.

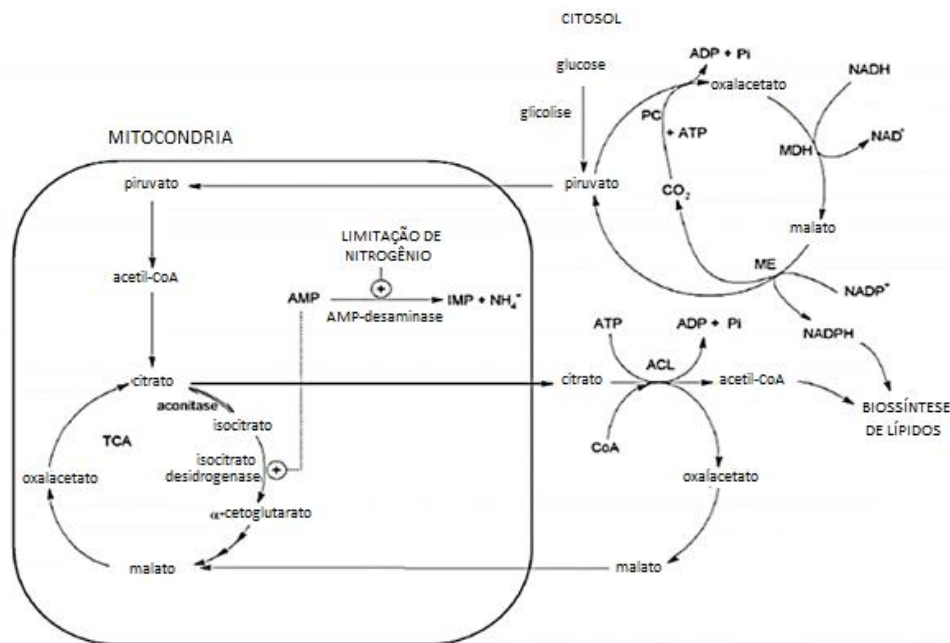


Figura 8- Biossíntese lipídica com limitação de Nitrogênio. Fonte: (adaptado de RATLEDGE et al., 2004)

Esse primeiro processo ocorre quando o meio de cultivo no qual o organismo está inserido é composto por substratos hidrofílicos – como a glicose, xilose, glicerol e ácido acético – junto com a limitação de algum nutriente, como nitrogênio e fósforo. Essa composição faz com que ocorra um aumento das razões Carbono /Nitrogênio (CALVEY et al., 2016) ou Carbono / Enxofre (WU et al., 2011) que é o maior foco em pesquisas com base na produção de lipídeos microbianos para subsequente produção de biocombustíveis.

O processo envolve a síntese de precursores de ácidos graxos, como acetil e malonil-CoA e seu alongamento subsequente a um nível intermediário (C14-C16), os quais se integram para formar triacilgliceróis (TAG) e ésteres de esteril (EE) na via de biossíntese de armazenamento de lipídeos. Esses são estocados dentro dos corpos lipídicos para armazenamento de energia. A síntese de ácidos graxos é realizada pelo complexo enzimático de ácidos graxos sintetase (AGS) no citosol e requer o fornecimento constante de acetil-CoA e malonil-CoA (BEOPOULOS et al., 2011).

De um modo geral, utiliza-se a limitação de nitrogênio nesses estudos de produção de lipídeos por ser uma condição fácil de ser controlada e por ser extremamente eficiente. Durante a

fase de crescimento, o carbono absorvido é utilizado na síntese de polissacarídeos, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas; já o nitrogênio é essencial para a síntese de proteína e de ácido nucleico, moléculas essenciais para o crescimento celular. Entretanto, em condições de carência dessa segunda substância, a taxa de crescimento celular diminui drasticamente, ao passo que a taxa de assimilação de carbono diminui de forma mais gradual, resultando na canalização preferencial do fluxo de carbono para a síntese de lipídeos (RYWINSKA et al., 2013).

Já a segunda via, a “ex novo”, ocorre quando o microrganismo é cultivado em um meio contendo substratos hidrofóbicos e envolve a quebra desses ácidos graxos, óleos e triglicerídeos para posteriormente incorporação e armazenamento no interior da célula (RATLEDGE E WYNN, 2002; BEOPOULOS et al., 2011). Este substrato incorporado é hidrolisado e transportado na forma de coenzima-A-tioester para via da lipogênese para formar lipídios neutros (PATEL; MATSAKAS, 2019).

Com o lipídeo concentrado no interior da célula, há a necessidade de expô-lo para então ser possível sua utilização. Em geral, existem variadas metodologias para realizar essa extração, como os métodos mecânicos, químicos ou até mesmo combinações entre eles. Porém, a literatura relata que não há um método que seja 100% eficiente na extração de lipídeos oriundos de microrganismos (JACOB 1992, AGEITOS et al., 2011). Esse processo possui diversas limitações, como a resistência da parede celular, a acessibilidade lipídica e a transferência de massa (ALEGRE, 2014).

Além dessas técnicas, diversas outras variáveis podem ser estudadas com o objetivo de otimizar este processo e obter um método mais viável economicamente. Existem diferentes tratamentos possíveis, prévios à realização da quebra celular, como a liofilização e a secagem das células, com o intuito de minimizar os custos relativos à demanda energética do processo (POLI et al., 2014). Algumas pesquisas apresentaram a extração utilizando microrganismos secos como mais vantajosa em relação à biomassa úmida, pois não há água para interferir na extração com solvente – o que eleva as chances de ocorrer formação de emulsão e diminuir a transferência de massa (DONG et al., 2016). Entretanto, tanto a secagem quanto a liofilização são extremamente custosas para serem aplicadas em larga escala (YELLAPU et al., 2016; DONG et al., 2016), além de alguns estudos mostrarem que essa diferença de rendimento não é tão expressiva (ALVES et al., 2018).

## II.5 – *Yarrowia lipolytica*

A *Yarrowia lipolytica* é um microrganismo pertencente ao reino Fungi, classe dos Ascomycetos, subclasse Hemiascomycetos, estritamente aeróbio, eucariótico e apresenta dimorfismo naturalmente, formando células de leveduras, pseudo-hifas e hifas septadas (BARTH e GAILLARDIN, 1997), como pode ser observado na Figura 9.

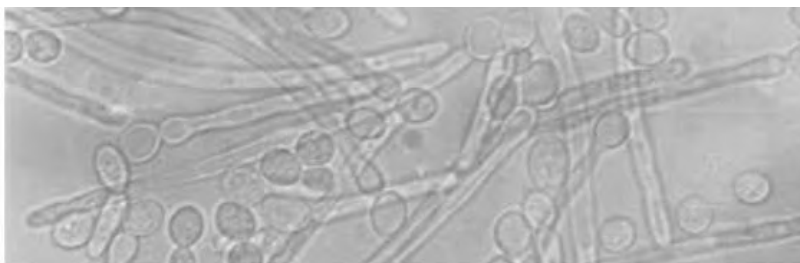


Figura 9- Microscopia ótica de cepa de *Yarrowia lipolytica*. Fonte: (DUTRA, 2010)

Uma outra característica relevante é a sua não-patogenia e seus status GRAS (*Generally Regarded As Safe*), sendo segura a sua utilização em medicamentos e alimentos, segundo a agência que regulamenta os alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (FDA - Food and Drug Administration) (COELHO et al., 2010). Entretanto, fisiológica, genética e molecularmente, essa levedura é bastante diferente dos modelos celulares mais estudados, como a *Saccharomyces cerevisiae*, que é considerada uma levedura “convencional”. Dessa forma, ela é classificada como “não-convencional”, sendo a espécie mais estudada deste grupo (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

Essa espécie ficou em evidência por ser capaz de produzir diversos metabólitos com elevado valor agregado. Ela possui aplicações em diversas indústrias como a alimentícia e a biomédica por ser capaz de sintetizar lipases, aromas, ácidos orgânicos, proteínas e óleos microbianos (PAPANIKOLAOU et al., 2002). Além disso, degrada uma grande variedade de compostos orgânicos, como hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (ALBUQUERQUE et al., 2006). Outros exemplos de metabólitos sintetizados por essa levedura utilizando glicerol como fonte de carbono podem ser observados na Tabela 2:

Tabela 2- Síntese de estudos de produção de metabólitos por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol com fonte de carbono. Fonte: (RYWINSKA, 2013).

| <b>Substrato</b>  | <b>Produto</b>             | <b>Referência</b>                  |
|-------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Glicerol Puro     | Ácido alfa-cetoglutárico   | YU <i>et al</i> (2012)             |
|                   | Ácido cítrico e invertase  | LAZAR <i>et al</i> (2011)          |
|                   | Ácido pirúvico             | MORGUNOV <i>et al.</i> (2004)      |
|                   | Ácido succínico            | YUZBASHEV <i>et al.</i> (2010)     |
|                   | A-Amilase                  | CHANG <i>et al.</i> (1997)         |
|                   | Lipase                     | LEE <i>et al.</i> (2007)           |
|                   | Biosurfactante             | FONTES <i>et al.</i> (2010)        |
| Glicerol residual | Ácido cítrico              | RYWINSKA <i>et al.</i> (2010)      |
|                   | Ácido cítrico e Eritritol  | RIMOWICS <i>et al.</i> (2009)      |
|                   | Eritritol                  | RIMOWICS <i>et al.</i> (2009)      |
|                   | Manitol                    | TOMASZEWSKA <i>et al.</i> (2012)   |
|                   | Manitol e Ácido acético    | CHATZIFRAGKOU <i>et al.</i> (2011) |
|                   | Ácido graxo poliinsaturado | SCOTT <i>et al</i> (2011)          |
|                   | Lipídeos                   | PAPANIKOLAU <i>et al</i> (2002)    |
|                   | Biomassa                   | TACCARI <i>et al</i> (2012)        |

Como é frequentemente encontrada em ambientes ricos em substratos hidrofóbicos, esta espécie desenvolveu mecanismos eficientes para utilizar esses meios como única fonte de carbono. Ela é capaz de acumular mais de 50% do seu peso seco em lipídeos (BARTH; GAILLARDIN, 1996; FICKERS *et al.*, 2005) e, assim, é considerada um micro-organismo oleaginoso, como pode ser observado na Figura 10, já que para ser classificado como tal, a levedura deve acumular de 20 a 80% de lipídeos de sua biomassa seca durante. Além disso, alguns estudos como o PAPANIKOLAOU *et al.*, (2002) provaram que a *Y. lipolytica* é capaz de acumular lipídeos utilizando glicerina residual como substrato.



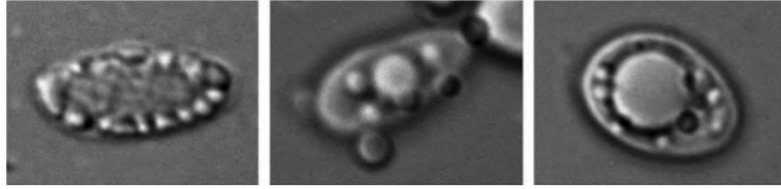


Figura 10 - Corpúsculo lipídico em *Yarrowia lipolytica* Fonte: (FICKERS., et al., 2005)

## Capítulo III – Objetivo

### III.1 – Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a produção de óleo intracelular pela levedura *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerina, um excedente da indústria de biocombustíveis, como fonte de carbono. Outro foco é investigar diferentes formas de extração de óleo microbiano, visando selecionar a metodologia que apresente melhor eficiência para futuro uso em escala industrial.

### III.2 - Objetivos específicos

- a) Selecionar a cepa de *Yarrowia lipolytica* com maior potencial de produção de óleo microbiano;
- b) Avaliar diferentes metodologias de lise celular da levedura, utilizando diferentes concentrações e tempos de reação das enzimas *Zymolyase* – 20 T de *Arthrobacter luteus* e enzimas de lise de *T. harzianum* (Sigma-aldrich) L1412, além do método físico-químico;
- c) Com a cepa selecionada, avaliar a viabilidade de produção do óleo microbiano em biorreator;

## Capítulo IV – Materiais e Métodos

### IV.1 – Materiais

#### IV.1.1 – Equipamentos

- Autoclave vertical Primatec modelo CS;
- Balança Shimadzu ATX224;
- BeadBeater BioSpecProducts Inc.;
- Biorreator de 4 L New Brunswick MF-114, Sci. Inc., EUA;
- Capela de exaustão de gases Quimis modelo Q216-11
- Capela de fluxo laminar BioFlux II 90°;
- Centrífuga Fanem modelo 2014-NR;
- Espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800;
- Estufa Nova Técnica;
- Incubadora com agitação (shaker) Tecnal TE-4200;
- Inline Filter Device HEPA-VENT L#8338622;
- Microscópio ótico Olympus, modelo BX51;
- Papel de filtro INLAB tipo 40 11,0cm;
- Pérola de vidro 425-600 microns Sigma-aldrich;
- pHmetro Digimed DM-22;
- Sonicador Ultrasonic Clearner Odontobrás.

#### IV.1.2 – Reagentes

- Agar bacteriológico Vetec;
- Antifoam 204, Sigma-Aldrich;
- Bicarbonato de sodio PA Synth;
- CaCl<sub>2</sub> Acros;
- Extrato de levedura Kasvi;
- FeCl<sub>3</sub> Merck;

- Glicerina P.A. NEON;
- Glicose VETEC;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Sigma-Aldrich;
- Enzimas de lise de *T. harzianum* Sigma-aldrich L1412;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  Sigma-Aldrich;
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  Reagen;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Sigma-Aldrich;
- Peptona Bacteriológica Kasvi;
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  Reagen;
- *Zymolyase* – 20 T de *Arthrobacter luteus*.

## **IV.2 – Métodos**

### **IV.2.1 – Esterilização**

Todos os meios de cultivos utilizados foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 20 minutos. Já as ponteiras, tubos Falcon, potes de centrifugação e outros instrumentos empregados no manuseio do meio de cultivo passaram pelo mesmo processo a 1 atm.

### **IV.2.2 – Microrganismo**

Para o presente trabalho foram utilizados repiques originados da cepa de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 (Figura 11) isolada do estuário da baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil (HAEGLER e MENDONÇA-HAEGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciência da Universidade Federal do Rio de Janeiro (AMARAL, 2007). As células foram conservadas a 4°C em Placas Petri com meio YPD sólido (“Yeast Extract, Peptone, Dextrose”) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e Agar-agar 3%.

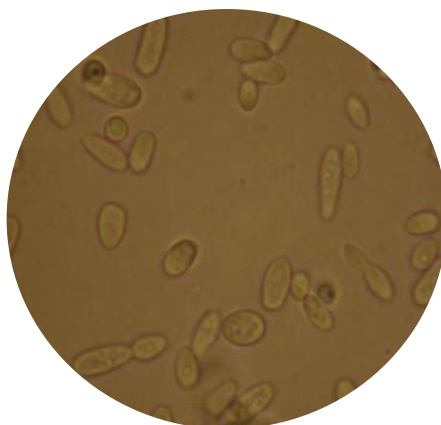


Figura 11- Microscopia da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 1000x). Fonte: (FONTES 2018)

#### **IV.2.3– Produção de óleo intracelular**

##### **IV.2.3.1 – Avaliação da produção de lipídeo intracelular em incubador rotatório**

Para realizar o crescimento celular inicial, o pré-inóculo foi executado retirando uma amostra por raspagem da placa petri contendo as células preservadas em YPD (“Yeast Extract, Peptone, Dextrose”) Agar para ser inoculada. De modo estéril, com o auxílio de um bico de Bunsen e alça de platina, as células foram transferidas para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultivo YPD previamente preparado, que é um meio composto por (em p/v) extrato de lêvedo 1%, peptona 2% e glicose 2%. Foi realizada a incubação em um agitador rotatório a 160 rpm e 30°C por 72 horas. Uma amostra, ao fim desse processo, foi retirada e sua absorvância (570 nm), medida para determinar a concentração celular.

De forma a aumentar a concentração celular no bioprocesso para produção de lipídeo intracelular, todas as células cultivadas nesse pré-inóculo de forma transferidas para um pote de centrifugação, previamente esterilizado na autoclave a 1 atm por 20 minutos, de forma estéril dentro do fluxo laminar e posteriormente centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e ressuspendidas, novamente dentro do fluxo laminar, de modo estéril em um novo inóculo. Este inóculo foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio de cultivo YPG (extrato de lêvedo 1%, peptona 2% e glicerina P.A. 2%) previamente preparado. Esta etapa foi conduzida em um agitador rotatório por 48 horas com a agitação de 400 rpm em temperatura

ambiente. Uma amostra, ao fim desse processo, era retirada e sua absorvância (570 nm), medida para determinar a concentração celular.

A biomassa obtida no inóculo foi centrifugada (3000 rpm por 10 minutos) e ressuspendida para iniciar a produção de lipídeo intracelular. Esse acúmulo lipídico foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultivo mineral (Figura 12) previamente preparado segundo a composição da Tabela 3.

Tabela 3 - Composição do meio mineral tamponado (PAPANIKOLAU et al., 2002).

| Meio de Produção                                     | Composição (g/L) |
|--|------------------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 3,00             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1,00             |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O   | 0,16             |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 0,70             |
| NaCl   | 0,50             |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .5H <sub>2</sub> O | 0,40             |
| Cloridato de Tiamina                                 | 0,00030          |
| Solução de Tiamina                                   | 0,12             |
| Glicerina P.A.                                       | 121,9697         |

Amostras foram retiradas diariamente por 3 dias consecutivos. Durante esse período, a concentração celular foi analisada por espectrofotometria e o percentual lipídico por gravimetria, utilizando apenas o método físico-enzimático com as enzimas de lise de *T. Harzianum* em concentração de 50 mg de enzima por grama de célula seca durante 2 horas para a lise celular.

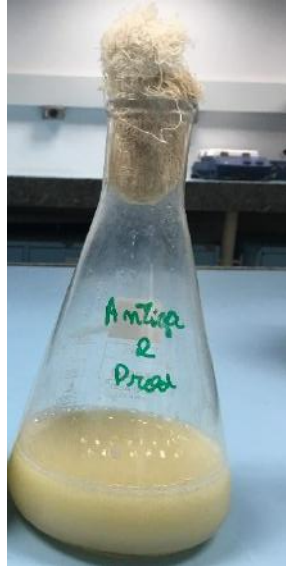


Figura 12 - Erlenmeyer de 500 mL utilizado no experimento contendo meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A. e a levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Fonte: (O autor 2018)

#### IV.2.3.2–Produção de lipídeo intracelular em biorreator

O crescimento inicial de biomassa, ou pré-inóculo, foi realizado do mesmo modo do descrito em IV.2.3.1. Nesta etapa dois Erlenmeyers de 500mL com 200mL de YPD foram preparados. As células foram transferidas com auxílio de um funil dentro do fluxo laminar para um biorreator de bancada de 4 L (New Brunswick MF-114, Sci. Inc., EUA) - com volume efetivo para de 3 litros uma relação altura / diâmetro de 30 x 20 cm e aeração por anel multiorifícios, abaixo da palheta de agitação - e ressuspendidas de modo estéril. Dentro desse recipiente havia 3L de meio YPG previamente preparado, sendo este composto por (p/v) extrato de lêvedo 1%, peptona 2% e glicerina PA 2%. Para evitar a formação de espuma foi adicionado  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de antiespumante (Antifoam 204, Sigma-Aldrich).

Essa etapa, que se destinava a aumentar a concentração de células, durava 48 horas com a agitação de 400 rpm em temperatura ambiente com aeração a 1vvm. Uma amostra, ao fim desse processo, era retirada e sua absorvância era medida para determinar a concentração celular. O biorreator então era desligado e as células, decantadas (Figura 13). O sobrenadante era retirado com a ajuda de uma mangueira sob pressão.

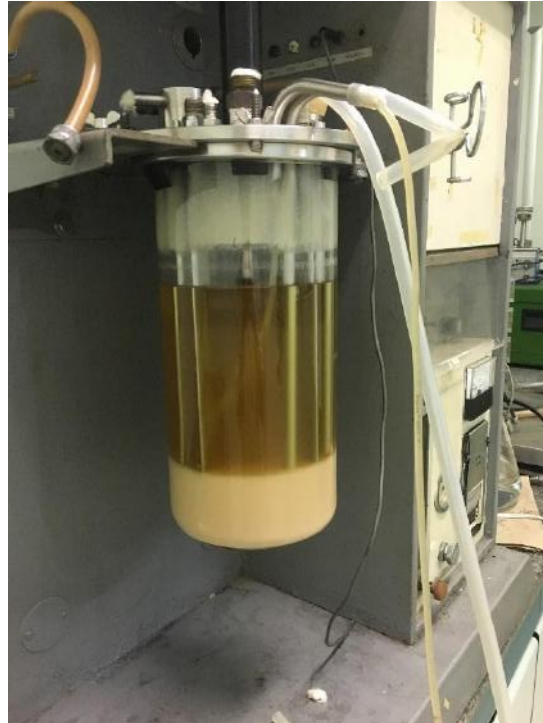


Figura 13 - Reator utilizado no experimento contendo meio YPG (extrato de lêvedo 1%, peptona 2% e glicerina PA 2%) desligado e as células da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 decantadas. Fonte: (O autor 2018)

A produ o de lipídeo intracelular iniciava com a adi o de 3 L de meio mineral – de modo estéril, com o auxílio de um bico de Bunsen e um funil –preparado com concentra o para 3,5 L, como mostra a Tabela 4, ao biorreator contendo apenas as células decantadas, como mostra a Figura 14. O bioprocesso era realizado durante 9 dias sob temperatura ambiente, agita o de 450 rpm e vazão de ar de 1 vvm.





Figura 14 – Biorreator de 4L utilizado no experimento contendo em meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A. e a levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Fonte: (O autor 2018)

Amostras foram retiradas diariamente durante os 9 dias para análise da concentração celular e percentual lipídico por gravimetria. Por fim, o reator foi desmontado, tendo seu conteúdo total centrifugado, seu sobrenadante descartado e sua biomassa armazenada no congelador para posterior extração do óleo como ilustrado na Figura 15.

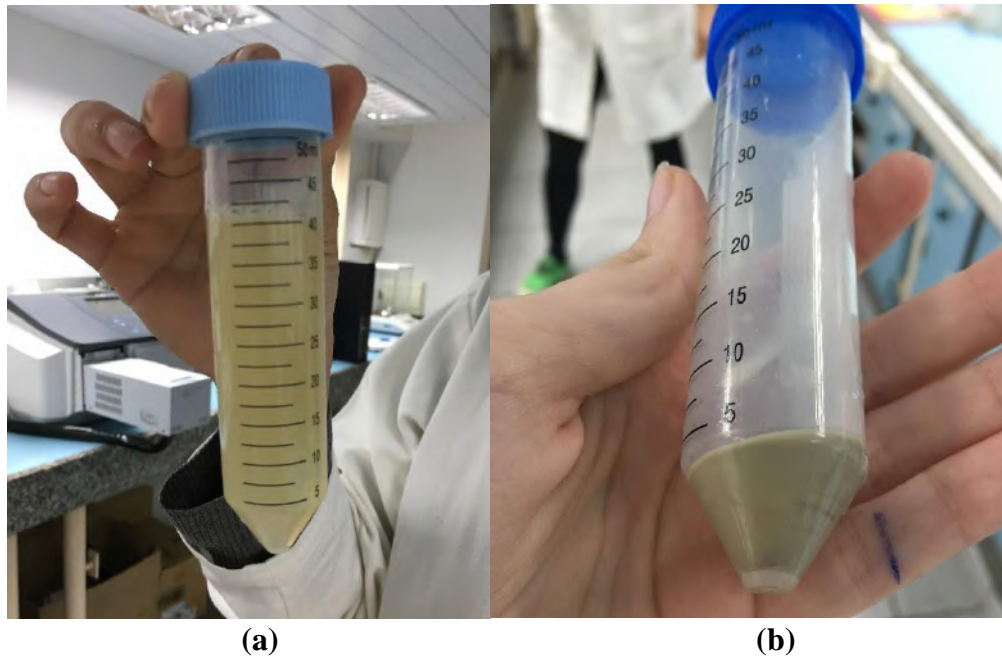


Figura 15- Amostrada levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em biorreator de 4L utilizando meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A. (a) e amostra centrifugada, preparada para o armazenamento (b). Fonte: (O autor 2018)

#### IV.2.4 –Extração de óleo intracelular

O processo de extração de óleo intracelular das células de *Y. lipolytica* foi realizado utilizando técnicas físico-enzimáticas ou físico-químicas para a ruptura da parede celular da levedura a fim de liberar a substância de interesse para o meio externo.

##### IV.2.4.1 – Extração Físico-Enzimática

A extração físico-enzimática iniciou-se com a utilização do ultrassom (SIVARAMAKRISHNAN & INCHAROENSAKDI, 2018) para a etapa física, seguida pelo processo enzimático baseado no método de VENTOM E ASENJO (1991) modificado. Em um tubo Falcon contendo 1g de células secas de *Yarrowia lipolytica* foram adicionadas 30 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,5. Essa amostra foi sonicada por 16 minutos a 80% de potência e,

em seguida, foi adicionada enzima em quantidade pré-estabelecida (Tabela 4). Essa suspensão foi incubada em *shaker* a 150 rpm e 30°C pelo tempo definido.

Empregando-se o método de VENTOM E ASENJO (1991) modificado, utilizou-se as enzimas *Zymolyase – 20 T* de *Arthrobacter luteus* e enzimas de lise de *T. harzianum* (Sigma-aldrich L1412) no processo de extração enzimática. Para selecionar a melhor enzima e o tempo de ação enzimática a serem utilizados no processo de extração de óleo intracelular produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica*, cinco procedimentos foram analisados utilizando diferentes concentrações enzimáticas e tempos de incubação (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentrações enzimáticas e tempos de ação enzimática utilizadas na extração de óleo intracelular de *Y. lipolytica*

| <b>Enzima</b>  | <b>tempo (h)</b> | <b>massa de enzima (mg)</b> |
|--|------------------|-----------------------------|
| <i>Zymolyase – 20 T</i> de <i>Arthrobacter luteus</i>    | 2                | 50                          |
| Enzima de lise <i>T. harzianum</i> (Sigma-aldrich L1412) | 2                | 50                          |
| Enzima de lise <i>T. harzianum</i> (Sigma-aldrich L1412) | 2                | 100                         |
| Enzima de lise <i>T. harzianum</i> (Sigma-aldrich L1412) | 2                | 200                         |
| Enzima de lise <i>T. harzianum</i> (Sigma-aldrich L1412) | 24               | 100                         |

Após o período de incubação, cada amostra passou por um tratamento físico utilizando um equipamento de agitação e trituração intensas, o *BeadBeater* (BioSpecProducts Inc) por 3 ciclos de 5 minutos com 10 g de pérolas de vidro (425-600 microns Sigma-aldrich) com gelo na camisa externa. Após o último ciclo, as pérolas de vidro foram decantadas por 10 minutos e o sobrenadante adicionado a um tubo Falcon. A solução foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos e 25°C, filtrada a vácuo em papel de filtro Whatman em funil de Buchner para remoção de resíduos celulares e posteriormente armazenada em Becker de 50 mL (Figura 16).

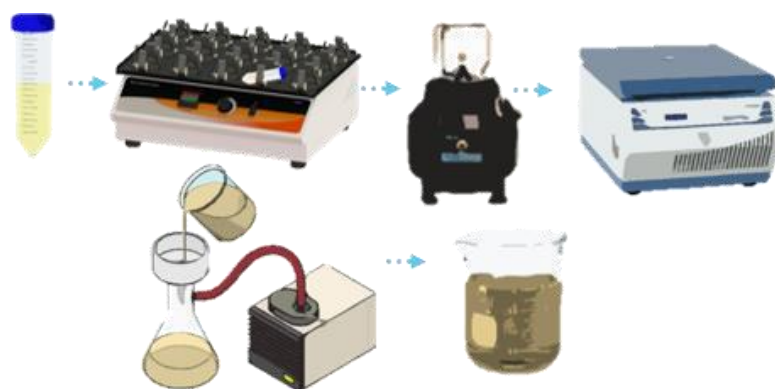


Figura 16 – Sistema de Extração Físico-Enzimática. Fonte: (O autor 2021)

Em seguida, realizou-se uma extração líquido-líquido utilizando o líquido filtrado e um solvente, hexano (THEURILLAT; THORMANN, 1998). Baseado no método de extração por solvente, um balão de separação foi utilizado para misturar o líquido filtrado com hexano em proporções iguais e homogeneizado por 2 minutos. Em seguida, a amostra foi deixada em repouso por 2 minutos para que ocorresse a separação entre as fases. A fase orgânica foi então depositada em um Becker previamente pesado e a fase aquosa retornou para o balão onde uma nova extração com hexano foi realizada. Esse processo foi realizado três vezes, sendo toda vez a fase orgânica depositada no bécher que havia sido previamente pesado, como pode ser visto na Figura 17.



Figura 17 – Balão de separação após 2 minutos de repouso apresentando a separação entre a fase orgânica, na parte superior que possui o lipídeo intracelular e o solvente Hexano, e aquosa, parte inferior contendo o restante da amostra. Fonte: (O autor 2018)

Dessa forma, um Becker para cada amostra foi previamente pesado e deixado na capela de exaustão de gases. No final desse processo, as fases orgânicas foram deixadas na capela com a exaustão ligada por 48 horas para que o solvente evaporasse completamente. O óleo que ficava depositado era quantificado por gravimetria e o percentual lipídico era calculado conforme a seguinte equação:

$$PL (\%) = \frac{MI}{Mc} \times 100$$

onde: PL – percentual lipídico

MI= massa de lipídeos obtida na pesagem gravimétrica

Mc = massa de células utilizada na extração

#### IV.2.4.2 –Extração Físico-Química

Utilizando a metodologia descrita por SU & FENG (1999) modificada, em um Becker contendo 1 g de células secas de *Yarrowia lipolytica* adicionou-se 30 mL de tampão bicarbonato de sódio 0,125 M e incubou-se a 50°C por 3 horas com o auxílio de uma placa de aquecimento e bastão magnético. Ao fim desse período, transferiu-se a suspensão para um tubo Falcon de 50 mL, centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos a 25°C e lavou-se as células duas vezes com tampão acetato de sódio 0,2 M e pH 4,8. Este processo de lavagem consistiu em adicionar o tampão às células, suspender novamente a levedura e centrifugar, retirando, por fim, a parte suspensa. Baseando-se no método de ultrassom, ressuspendeu-se as células em 30mL de tampão acetato de sódio 75 mM e pH 4,8. Como sugerido por autores BENOVA; AL- IBRAHEEM, (2002) e FARKADE et al., (2006), associou-se esse método de ruptura celular ao ultrassom, submetendo-se os tubos a dois ciclos de 16 minutos a 80% de potência em ultrassom (Figura 18). Em seguida, realizou-se a extração física descrita em IV.2.4.1.

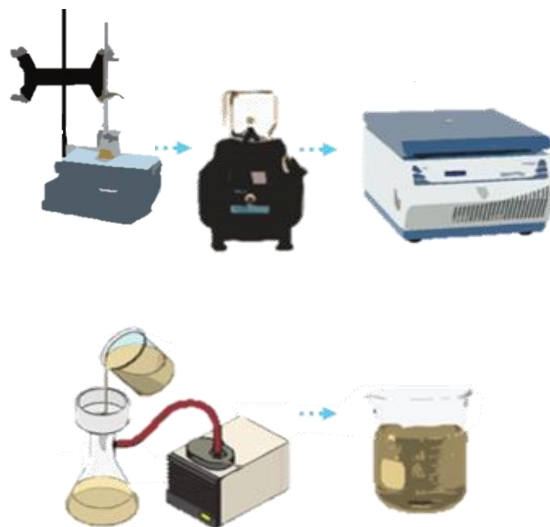


Figura 18 - Sistema de Extração Físico-Química. Fonte: (O autor 2021)

Em seguida, utilizou-se o sobrenadante obtido após a filtração à vácuo e armazenado no Becker de 50 mL para determinar a quantidade de óleo produzido a partir do método de gravimetria através da extração com solventes, como descrito no item IV.2.4.1.

## IV.2.5 – Métodos Analíticos

### IV.2.5.1 – Quantificação celular

Para determinar a concentração celular das amostras, a densidade ótica foi medida em espectrofotômetro Shimadzu a 570 nm. Esses valores foram convertidos para mg de massa seca de células / mL utilizando o fator de conversão, que foi determinado previamente através da realização da curva de peso seco. Uma curva de peso seco *versus* absorvância foi construída a partir de uma suspensão de células em solução 0,9% p/v de NaCl, retirando-se amostras de 2 mL dela, que é filtrada em membrana Milipore 0,45 µm previamente pesada. Em seguida, o papel junto com as células foi seco em luz de infravermelho por 30 minutos para depois ser pesado. Este processo seguiu até atingir peso constante. Diferentes diluições desta mesma amostra foram realizadas e suas absorvâncias, medidas para cada concentração em espectrofotômetro a 570 nm. Os valores de concentração celular (g/L) e seus valores correspondentes de absorvância foram plotados em um gráfico, sendo assim determinado o fator de conversão de 0,356 (Figura 19).

A partir desse resultado, foi possível calcular a concentração celular (X) de cada amostra utilizando a seguinte Fórmula:

$$X = D * Fc * Abs$$

onde:

D – Diluição

Fc - Fator de Conversão

Abs – Absorvância média

X – Concentração celular

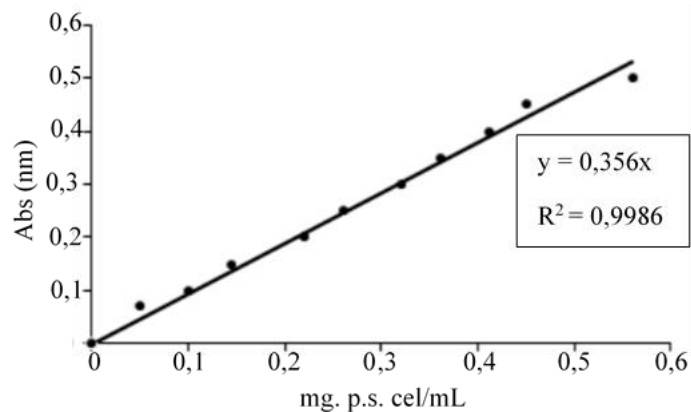


Figura 19 - Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular através de medidas de absorvância em espectrofotômetro

#### **IV.2.5.2– Determinação do pH**

O pH de cada amostra foi determinado com o auxílio do pHmetro Digimed DM-22 a temperatura ambiente (25°C).



## Capítulo V – Resultados e Discussão

### V.1 – Avaliação da produção óleo intracelular por diferentes cepas de *Yarrowia lipolytica*

A técnica de repique é comumente utilizada para a conservação de microrganismo. Este método é eficiente para o trabalho a curto prazo, entretanto pode acarretar algumas adversidades a longo prazo. Entre elas, está a possibilidade dos microrganismos repicados sofrerem mutação, podendo assim gerar alterações na capacidade de emprego em processos fermentativos, principalmente quando se visa um produto específico.

Ao ficar conservado por repique nas placas de Petri em meio YPD com ágar, foi possível observar que, dentro do laboratório, a mesma cepa sofreu mutação pelo uso contínuo da técnica. A variação foi observada a partir do ponto em que placas de uma mesma cepa começaram a apresentar características macroscópicas e microscópicas diferentes, como pode ser observado na Figura 20.

Essa etapa consistiu em comprovar se a alteração morfológica e fisiológica em laboratório, ocasionada pela conservação a longo prazo pela técnica de repique, gerou alterações significativas nas cepas de *Y. lipolytica* a ponto de alterar a produção de óleo intracelular e em selecionar a mais promissora quanto ao acúmulo de lipídeos. O experimento comparou a cepa original *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e as três cepas cultivadas no laboratório identificadas como 50682-1, 50682-2 e 50682-3. As cepas foram cultivadas em meio contendo como fonte de carbono glicerina P.A. e composição descrita em IV.2.3.1, em frascos de Erlenmeyer. O experimento foi realizado em duplicata para cada cepa.

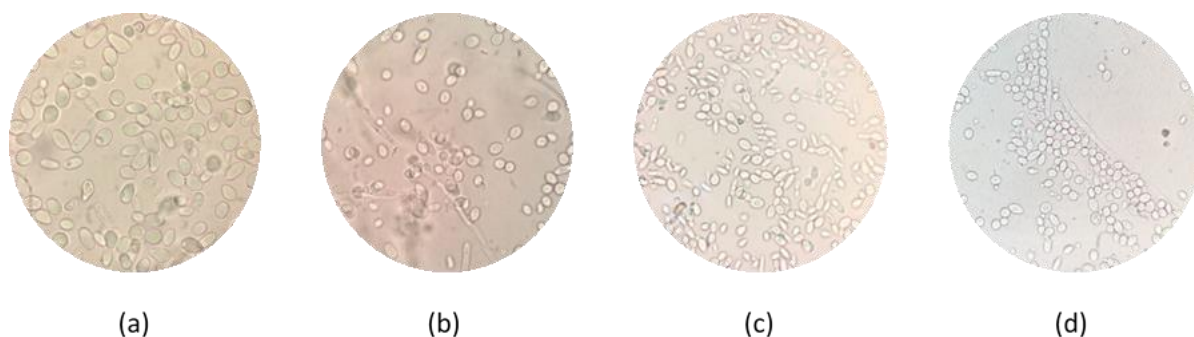


Figura 20- Morfologia microscópica da levedura *Y. lipolytica* das respectivas cepas: (a) IMUFRJ 50682; (b) 50682-1; (c) 50682-2; (d) 50682-3 (aumento de 1000x Fonte: O autor 2018)

Para cada cepa da levedura foi determinada a curva de crescimento celular, conforme mostra a Figura 21. Baseado em estudos previamente realizados com a cepa IMUFRJ 50682 por KAMEDA et al., (2014), independentemente da composição do meio, valores expressivos de acúmulo de óleo intracelular foram encontrados após longos períodos de cultivo. Além disso, resultados apresentados por LOPES (2020) mostraram que as concentrações de lipídeo intracelular mais expressivas dessa cepa foram encontradas após as 120 horas de cultivo. Ambos os estudos indicam que neste ponto do cultivo, após 120 horas, a *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 se encontrava na fase estacionária de crescimento. Dessa forma, o acompanhamento do cultivo das diferentes cepas foi realizado a partir das 120 horas do bioprocessamento.

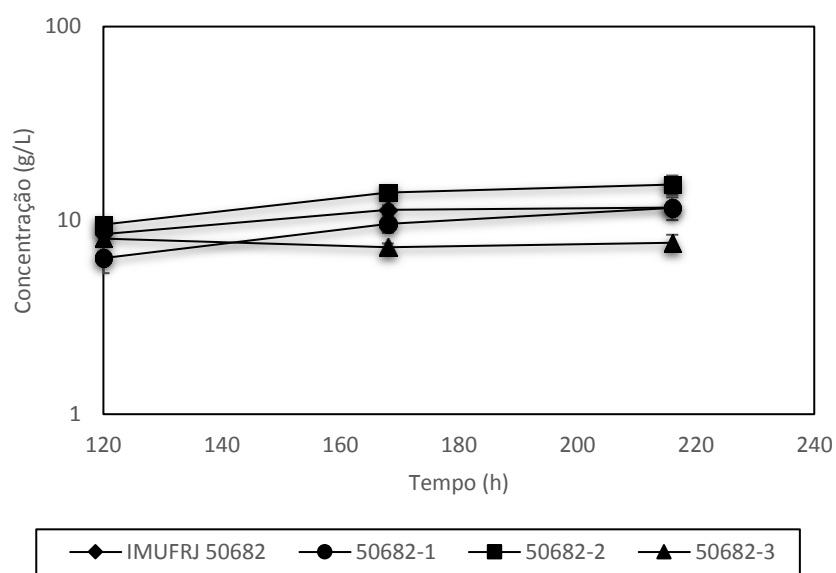


Figura 21 - Cinética de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* em escala logarítmica com as cepas obtidas utilizando a técnica de repique para conservação de microrganismo, em frascos de Erlenmeyer em meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A.. As concentrações iniciais de cada cepa foram: (8,1 g/L) IMUFRJ 50682, (8,2 g/L) 50682-1, (9,4 g/L) 50682-2 e (7,7 g/L) 50682-3. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Com o objetivo de obter grandes quantidades de óleo, iniciou-se o cultivo para produção de óleo intracelular com concentrações iniciais de célula de 8,1 g/L IMUFRJ 50682; 8,2 g/L 50682-1; 9,4 g/L 50682-2; e 7,7 g/L 50682-3. No resultado apresentado no gráfico da Figura 21, verifica-se um perfil de crescimento celular semelhante para as cepas IMUFRJ 50682, 50682-1 e 50682-2, podendo se destacar um crescimento mais acentuado para a cepa 50682-2. Esse perfil é similar ao descrito por KAMEDA et al. (2014). De forma contrastante, a 50682-3 não apresentou crescimento celular durante o período analisado.

O cultivo realizado com a cepa 50682-2, além de apresentar o perfil de crescimento mais acelerado, foi a que atingiu maior concentração de celular (15,3 g/L) quando comparada com as demais cepas (11,6 g/L, 11,6 g/L, 7,7 g/L para as cepas IMUFRJ 50682, 50682-1 e 50682-3 respectivamente). Outro ponto a se salientar são as características morfológicas de cada cepa, das quais apenas a cepa 50682-1 e 50682-3 apresentaram formação de pseudo-hifas, enquanto as outras duas cepas se destacaram pelo formato celular mais ovalado. Esse dimorfismo, ou seja, a habilidade de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas: células ovóides e hifas bastante alongadas da *Y. lipolytica* já havia sido mapeada e inclusive utilizada como modelo de diferenciação celular (SZABO, 1999). Essa dessemelhança pode ser justificada pela diferença entre as variações ocorridas em cada cepa no processo de repique para conservação da levedura, indicando que, provavelmente, a técnica de repique acarretou tanto em alterações morfológicas quanto fisiológicas nas células da *Y. lipolytica*.

Em seguida, realizou-se a análise da produção de óleo intracelular por cada cepa após 120, 144 e 168 horas de cultivo (Tabela 5). Para a extração dos lipídeos utilizou-se a metodologia físico-enzimática (IV.3.4), apenas com a enzima de lise de *T. harzianum* (Sigma-aldrich L1412) por 2 horas a 50 mg por 1 g de célula seca, pois neste momento, estudava-se unicamente a concentração de óleo intracelular. Esta etapa do bioprocessamento, o meio selecionado era destinado a induzir a produção de lipídeos intracelulares e o crescimento celular não era mais o objeto. Com isso, a composição de sais utilizada foi originalmente apresentada por PAPANIKOLAOU et al. (2002) sendo empregado para a produção de ácido cítrico, apresenta baixas concentrações de nutrientes como nitrogênio (N), fósforo (P), zinco (Zn), ferro (Fe) e magnésio (Mg) para que o acúmulo de lipídeos fosse propiciado (HASSAN et al., 1996). Além disso, não possuía extrato de lêvedo e o nitrogênio utilizado era de origem inorgânica (Sulfato de amônio), possuindo apenas um pouco de tiamina, vitamina essencial para a levedura se manter viva.

Tabela 5- Óleo intracelular acumulado durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em incubadora com agitação (shaker) Tecnal TE-4200 extraído pelo método físico-enzimático utilizando a enzima *T. harzianum* (Sigma-aldrich L1412) por 2 horas a 50 mg por 1 g de célula seca.

| <b>Tempo de produção</b><br>(horas) | <b>50682</b><br>% (g de óleo extraído /<br>100 g de célula seca) | <b>50682-1</b><br>% (g de óleo extraído<br>/ 100 g de célula seca) | <b>50682-2</b><br>% (g de óleo extraído<br>/ 100 g de célula seca) | <b>50682-3</b><br>% (g de óleo extraído<br>/ 100 g de célula seca) |
|-------------------------------------|--|--|--|--|
| 120                                 | 18,4±0,6   | 17,7±0,7   | 13,9±0,1   | 10,8±0,2   |
| 144                                 | 22,4±0,7   | 13,7±0,3   | 13,1±0,4   | 8,9±0,8  |
| 168                                 | 24,0±0,5   | 9,8±0,4  | 11,7±0,2   | 6,5±0,9  |

Observa-se na Tabela 5 um acúmulo lipídico decrescente em quase todo o tempo experimental, exceto para a cepa 50682, que apresentou acúmulo crescente. A linhagem com o melhor desempenho no que se diz respeito ao conteúdo lipídico foi a cepa 50682, que apresentou maior produção em 168 horas alcançando 24,0 g de óleo extraído / 100 gramas de células secas. Em seguida, vem a 50682-1, que atingiu 17,7 g de óleo extraído / 100 gramas de células secas em 120 horas. A 50682-3 foi a cepa com o pior desempenho e atingiu 10,87 g de óleo extraído / 100 gramas de células secas em 120 horas. Logo, por apresentar maior porcentagem de acúmulo e um dos maiores crescimentos celulares, a cepa 50682 foi a escolhida para ser utilizada nos experimentos subsequentes. Este resultado se alinha com o que foi descrito por LOPES (2020), pois os maiores resultados de concentração celular para a cepa original foram após as 96 horas de cultivo em meio de produção.

## V.2 – Seleção do método de extração de lipídeos intracelular

Com a cepa selecionada, foi realizada uma comparação entre o método que utiliza enzimas líticas com o que utiliza o bicarbonato de sódio para facilitar a extração do óleo intracelular – ambos com um tratamento físico aplicado, como descrito em IV.2.4.1. Utilizando as células úmidas da cepa 50682 de um mesmo cultivo na incubadora com agitação (shaker Tecnal TE-4200) com glicerina P.A. como fonte de carbono, após 120 horas de incubação, foram testados diferentes métodos de extração, como mostrado na Tabela 6. Este tempo de 120

horas de processo foi selecionado, pois o objetivo deste estudo era apenas analisar os métodos de extração.

Tabela 6- Análise comparativa de métodos de extração físico-enzimático e físico-químico de óleo intracelular acumulado durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em incubadora com agitação (shaker Tecnal TE-4200), em meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A., após 120 horas de cultivo.

| <b>Método de extração</b>  | <b>Massa enzimática</b><br>(mg / 1 g de célula seca) | <b>Tempo</b><br>(horas) | <b>% de óleo intracelular</b><br>(g de óleo extraído / 100 g de célula seca) |
|--|--|-------------------------|--|
| Físico-Enzimática ( <i>Zymolyase</i> – 20 T de <i>Arthrobacter luteus</i> )      | 50   | 2                       | 14,18 ± 1,29   |
| Físico-Enzimática (Enzimas de lise de <i>T. harzianum</i> (Sigma-aldrich L1412)) | 50   | 2                       | 8,67 ± 1,57  |
| Físico-Enzimática (Enzimas de lise de <i>T. harzianum</i> (Sigma-aldrich L1412)) | 100  | 2                       | 10,75 ± 0,71   |
| Físico-Enzimática (Enzimas de lise de <i>T. harzianum</i> (Sigma-aldrich L1412)) | 200  | 2                       | 9,76 ± 2,00  |
| Físico-Enzimática (Enzimas de lise de <i>T. harzianum</i> (Sigma-aldrich L1412)) | 100  | 24                      | 10,15 ± 3,25   |
| Físico-Químico   | -  | -                       | 5,59±0,51  |

Para a seleção das enzimas levou-se em consideração a composição da parede celular das leveduras, a qual majoritariamente apresenta polímeros  $\beta$ -1,3 glucana;  $\beta$ -1,6 glucana; mananaproteínas e pouca quantidade de quitina (FLEURI, 2006). Portanto, as enzimas deviam conter  $\beta$ -1,3 glucanases,  $\beta$ -1,6 glucanases, mananases, proteases e quitinases. Consequentemente, as enzimas empregadas neste procedimento foram a *Zymolyase* – 20 T de *Arthrobacter luteus* e enzimas de lise de *T. harzianum* (Sigma-aldrich L1412). A primeira enzima foi selecionada pois já havia sido comprovada sua eficiência na lise celular da levedura

*Y. Lipolitica* na literatura pela VIEIRA et al., 2010. Esta contém a laminaripentaohidrolase de beta-1,3-glucano como principal enzima para a atividade lítica, com alta atividade contra a membrana celular de leveduras vivas pois ela hidrolisa os polímeros de glicose lineares em ligação beta-1,3 e libera especificamente a laminaripentaose como a unidade de produto principal e mínima. Já, a enzima de *T. harzianum* (Sigma-aldrich L1412), também chamada de Glucanex, foi selecionada por ser financeiramente mais interessante e por ser composta por uma mistura de isoenzimas com atividade  $\beta$ -1,3 glucanase, que hidrolisa oligossacarídeos da parede celular de levedura em glucano para a preparação de protoplastos (WIEDERHOLD et al., 2009).

O método químico se baseia na permeabilização da parede a partir do rompimento das estruturas da membrana. A diminuição do conteúdo de fosfolipídeos que a compõem, o que possibilita a passagem de soluto de baixo peso molecular para dentro ou fora da célula (SISO et al., 1994). Neste experimento, utilizou-se o bicarbonato de sódio para ocasionar a lise celular da levedura e permitir a exposição dos lipídios presentes no interior da levedura. O sódio altera o potencial eletroquímico da membrana celular da levedura e aumenta a pressão osmótica, a qual, junto com a temperatura elevada, acelera o processo de ruptura da membrana (SU; FENG, 1999).

Em ambos os processos, houve um tratamento prévio com o ultrassom com o objetivo de auxiliar no rompimento das paredes celulares para facilitar a penetração tanto da enzima quanto do bicarbonato de sódio, pois aumenta a transferência de massa (LIU et al., 2007).

Com os resultados da Tabela 6, observa-se que a metodologia físico-enzimática utilizando *Zymolyase – 20 T* de *Arthrobacter luteus* por 2 horas com 50 mg de enzima por cada 1 g de célula seca foi mais eficiente para a extração do óleo intracelular de *Y. lipolytica*, com 0,14 g de lipídeos extraídos de 1g de célula seca. Este resultado é 153% superior ao encontrado utilizando o método físico-químico. Além desse fato, este último método possui mais etapas e conseqüentemente demanda mais tempo para alcançar tal resultado.

Adicionalmente, pode-se verificar que para a enzima de lise de *T. harzianum* (Sigma-aldrich L1412) a variação de concentração e o aumento do tempo de incubação não propiciaram melhorias significativa na extração do óleo intracelular, além de todos os valores encontrados serem inferiores aos obtidos com *Zymolyase – 20 T* de *Arthrobacter luteus*.

Com isso, uma avaliação preliminar pode ser realizada observando-se a aplicabilidade das enzimas em um ponto de vista de um processo analítico e de um processo em escala industrial. A quantidade de óleo extraído utilizando o processo físico enzimático com a enzima

*Zymolyase* – 20 T de *Arthrobacter luteus* por 2 horas de incubação com 50 mg de enzima por cada 1 g de célula seca custou R\$3,69 de enzima por grama de óleo obtido, já utilizando para a enzima de lise de *T. harzianum* (Sigma-aldrich L1412) nas mesmas condições - por 2 horas de incubação com 50 mg de enzima por cada 1 g de célula seca – custou R\$1,00 de enzima por grama de óleo obtido, um resultado 268% menos oneroso quando comparada com a primeira enzima.

Essa avaliação indica que o processo de extração físico-enzimático utilizando a enzima de lise de *T. harzianum* (Sigma-aldrich L1412) seria mais interessante para um processo em escala industrial, entretanto, o objetivo do presente trabalho era buscar um método analítico que permitisse a maior extração de óleo intracelular possível entre os métodos estudados. Por esta razão, esta foi selecionada para prosseguir o estudo de produção de lipídeo pela *Y. lipolytica* com a glicerina P.A. como fonte de carbono o método físico-enzimático com a *Zymolyase* – 20 T de *Arthrobacter luteus* por 2 horas de incubação com 50 mg de enzima por cada 1 g de célula seca.

### V.3 – Análise de produção de óleo intracelular

Para examinar os resultados de um bioprocesso em biorreator com a cepa IMUFRJ 50682 e metodologia de extração com a enzima *Zymolyase*– 20 T de *Arthrobacter luteus*, selecionados com base nos estudos, realizou-se um cultivo de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em um Biorreator de 4 L. O objetivo era obter maior concentração de biomassa para possível aumento de produção de lipídeos para extração.

Utilizando 50 mg da enzima *Zymolyase* – 20 T de *Arthrobacter luteus* por grama de célula seca, com o período de incubação de 2 horas, realizou-se a extração de óleo intracelular das amostras obtidas durante o bioprocesso realizado no Biorreator. Como resultado desse procedimento obteve-se o óleo apresentado na Figura 22.



Figura 22- Óleo microbiano extraído no experimento em meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A. e a levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em Biorreator de 4L após 168 horas de produção. Fonte: (O autor 2018)

Durante todo o bioprocesso, foi observada uma redução do pH do meio de cultivo (Figura 23). Essa variação no valor de pH pode ter sido causada pela produção de outros metabólitos, como ácidos orgânicos (RYWINSKA et al., 2013).

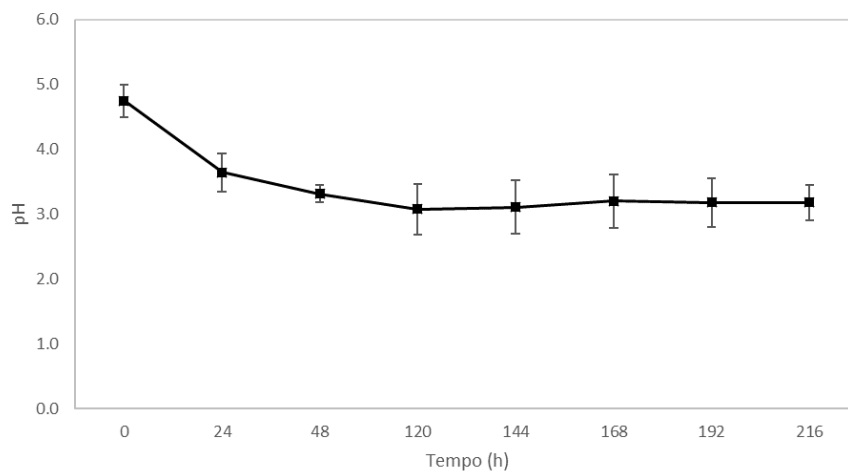


Figura 23 - Perfil de variação de pH durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em Biorreator contendo meio mineral tamponado de PAPANIKOLAU et al, 2002 contendo glicerina P.A. (PAPANIKOLAU et al, 2002).



A queda brusca que ocorre após 24 horas de cultivo, seguida por uma oscilação praticamente constante até o fim do cultivo, era esperada. Estudos previamente realizados com a cepa IMUFRJ 50682 em meio mineral semelhante por DAS et al., 2017 encontraram resultados semelhantes. Dentro dessas primeiras horas, era esperado um decréscimo do pH para menos de 3,5, muito semelhante ao 3,6 encontrado no presente estudo.

Alguns estudos, como o de BEOPOULOS et al., (2009) mostram que, ao realizar o cultivo com excesso de carbono juntamente com uma limitação de nutrientes, *Y. lipolytica* produz grandes quantidades de metabólitos secundários – tais como o ácido cítrico, isocítrico, ácido 2-cetoglútarico e ácido pirúvico. Além disso, também podem converter o carbono em triacilglicerol. Dependendo da proporção entre carbono / nitrogênio (C / N), diferentes caminhos metabólicos podem ocorrer, o que conseqüentemente leva a produtos diferentes. A maior produção de lipídeos ocorre quando o microrganismo está exposto a uma elevada relação C / N no meio, pois a escassez do nitrogênio acarreta na repressão de algumas vias metabólicas (ácido nucleico e a síntese de proteínas), ao passo que outras 44 vias são induzidas (ácidos graxos e síntese de triglicerídeos) (RATLEDGE, 2002). E, geralmente, uma quantidade considerável de lipídeos é acumulada na fase estacionária de crescimento – quando o nitrogênio já foi consumido para a multiplicação da biomassa. Em suma, com tais parâmetros encontrados, pode-se verificar que o acúmulo de lipídeos vem sempre acompanhado da produção de metabólitos secundários, como o ácido cítrico, sendo um aspecto já observado por PAPANIKOLAOU et al., (2003).

Observa-se na Figura 24 que a concentração celular decai depois das 24 horas de cultivo em meio destinado a produção do óleo intracelular, porém, depois dessa queda, a concentração se manteve mais ou menos constante em 8,94 g / L. Outro resultado a se ressaltar é em relação ao acúmulo lipídico. Este é crescente em praticamente todo o tempo de cultivo, tendo como seu ponto máximo 33,67% g de óleo / 100 g de célula seca após 168 horas. Logo após esse pico de acúmulo de óleo intracelular, ocorre uma queda na concentração desta concentração chegando a 23,79% g de óleo / 100 g de célula seca. Este evento pode ser explicado, provavelmente, pelo consumo da própria levedura dessa fonte própria de reserva de energia após a exaustão ou a diminuição da taxa de consumo da fonte de carbono contida no meio de cultivo.

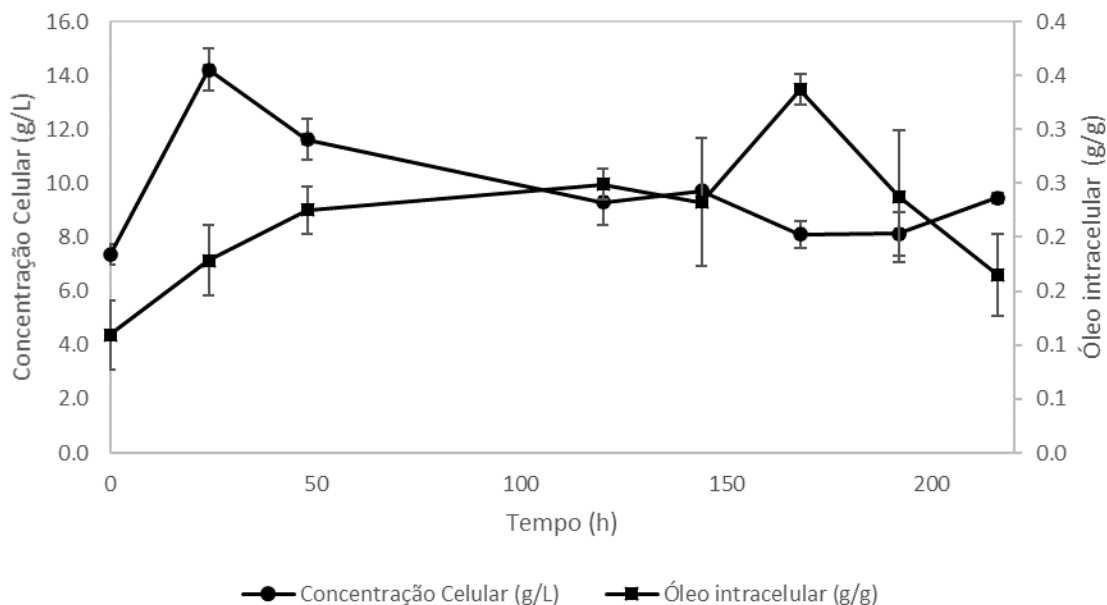


Figura 24- Curva de concentração celular da *Yarrowia lipolytica* durante o seu processo de produção de bio-óleo (●) e a concentração do mesmo (◻) durante cultivo em meio mineral tamponado de PAPANIKOLAOU et al., 2002 contendo glicerina P.A.. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

O pico de concentração lipídica encontrado foi de 33,67% g de óleo / 100 g de célula seca, caracterizando-a como uma linhagem oleaginosa (AGEITOS et al., 2011; KOUTB et al., 2011). Entretanto, estudos mostram que a *Yarrowia lipolytica* é capaz de acumular mais de 50% do seu peso seco em lipídeos (BARTH; GAILLARDIN, 1996; FICKERS et al., 2005). Diversos parâmetros podem ser citados como causas para tal discrepância, como meio de cultivo, linhagem do microrganismo e método de extração. Por esta razão, o presente trabalho ainda possui margens para melhoria.

Contudo, este resultado encontrado é bastante promissor por mostrar que, mesmo em maiores escalas, essa levedura foi capaz de acumular uma quantidade considerável de óleo intracelular utilizando a glicerina P.A. como fonte de carbono. Ele sustenta a possibilidade dessa alternativa de biotransformação do maior subproduto da indústria do biodiesel integrar o ciclo da cadeia produtiva deste combustível, já que, além de absorver esse excedente na forma de fonte de carbono, *Y. lipolytica* o converte em lipídeos, os quais, posteriormente, poderão ser empregados na geração de biodiesel através de transesterificação, fechando assim esse ciclo de produção.

## Capítulo VI – Conclusão

- A técnica de repique utilizada para a conservação da cepa original de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 isolada do estuário da baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil, por um longo prazo dentro do laboratório, ocasionou alterações morfológicas e fisiológicas significativas na levedura a ponto de alterar sua capacidade de acumular lipídeos de cepa para cepa.

- O melhor método analítico de extração dos lipídeos produzidos pela *Y. lipolytica*, entre os métodos estudados, foi o físico-enzimático, utilizando a enzima *Zymolyase* – 20 T de *Arthrobacter luteus* por 2 horas a uma concentração de 50 mg de enzima / g de célula seca, sendo justificada pelo maior rendimento de extração de lipídeos em proporção a massa de células utilizadas. Além disso, a concentração enzimática e o aumento do tempo de incubação não propiciaram melhoras significativa na extração do óleo intracelular.

- A levedura *Y. lipolytica* manteve sua concentração celular mais ou menos constante durante o cultivo contendo glicerina P.A. como fonte de carbono em Biorreator, atestando a glicerina P.A. como uma fonte de carbono alternativa viável. Além disso, a cepa IMUFRJ 50682 acumulou cerca de 33,67% g de óleo intracelular / 100 g de célula seca após 168 horas de cultivo em Biorreator, reafirmando esta levedura como microrganismo oleaginoso. Ambos os resultados evidenciam a escalabilidade deste bioprocessos.

- Os resultados obtidos no presente trabalho ilustram na prática a aplicabilidade da economia circular. Demonstram a possibilidade da extensão da vida útil de um subproduto da indústria de biodiesel, a glicerina, de forma a reincorporá-la no ciclo de produção através da biotransformação por via fermentativa para fechar o ciclo de vida dessa indústria. Assim, o próximo passo a ser estudado é a utilização da glicerina residual como fonte de carbono para a levedura *Y. lipolytica* produzir óleo intracelular.

## Capítulo VII – Referências Bibliográficas

AGEITOS, J.M at al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, p.1219-1227, 2011.

AGEITOS, J.M, VALLEJO, J.A., VEIGA-CRESPO, P., VILLA, T.G., 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1219-1227.

AKOH, C., et al. Enzymatic approach to biodieselproduction. *J Agric Food Chem.* v.55(22), 2007.

ALBUQUERQUE C. D. C., FILETTI A. M. F., CAMPOS-TAKAKI G. M. (2006). Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Canadian Journal of Microbiology.*52, (6), 575–583.

ALEXANDRE UMPIERRE; FABRICIO MACHADO. Gliceroquímica e Valorização do Glicerol. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 1, p. 106–116, 2013.

ÁLVARO DE MELO FARIA (11321ECO007) Economia circular: reinvenção das formas de negócio universidade federal de uberlândia instituto de economia e relações internacionais 2018. [s.l.], [s.d.]..Disponível em:<<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/23780/1/EconomiaCircularReinven%C3%A7%C3%A3o.pdf>>.

ALVES, C. et al. Universidade federal do rio grande do sul. Instituto de ciências básicas da saúde programa de pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente. Avaliação de métodos de lise celular das leveduras *Yarrowia lipolytica* QU21 e *Meyerozyma guilliermondii* BI281 para extração de óleo microbiano. [s.l.], 2018. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/206254/001112125.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acessado em 13/03/2021

AMARAL, P.F.F. Produção de Lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Tese de Doutorado submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

ANDRÉ, A., et al. Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences*, v.9, 2009

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução n.6, de 16 de setembro de 2009. Brasília: Diário Oficial da União, p.37-38, 2008

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução nº 7 de 19 de março de 2008, Disponível em : <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2004/novembro&item=ranp-42--2004> Acesso em: 12 Nov 2020. Acesso em: 12 Nov 2020.

Anuário Estatístico 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2020#Se%C3%A7%C3%A3o%204>>. Acesso em: 29 nov. 2020.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Rev Analytica*, n. 26, p.56-62, 2007.

BALAT, M., BALAT, H. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. *Energ Convers Manage*. v49, 2008.

BAN, K.; HAMA, S.; NISHIZUKA, K.; KAIEDAC, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 17, 2002.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, v.19, p.219-237, 1997.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. *Yarrowia lipolytica*. In: WOLF, K. (Ed.). *Nonconventional Yeasts in biotechnology*. Berlin; Heidelberg; New York: Springer Verlag, 1996. P. 313-388

BARTH, GEROLD; GAILLARDIN, CLAUDE. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS microbiology reviews*, v. 19, n. 4, p. 219-237, 1997.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. DE. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. *Química Nova*, v. 34, n. 2, p. 306–319, 2011.

BENOV, L.; AL- IBRAHEEM, J. Disrupting Escherichia coli: A Comparison of Methods. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v. 35, n. 4, p. 428-431, Jul (2002).

BEOPOULOS A, NICAUD JM, GAILLARDIN C. 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol 90:1193–1206

BEOPOULOS, A., CHARDOT, T., NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. Biochimie. v.91(6), 2009.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. Applied Microbiology Biotechnology, Berlin, v. 90, p. 374-387, 2009

BIODIESELBR.COM. Novos Produtos e Processos a Partir da Glicerina de Produção de Biodiesel. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/revista/011/direto-do-laboratorio-11>>. Acesso em: 15 nov. 2020.

BIODIESELBR.COM.BR. Biodiesel no mundo. Disponível em:<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/mundo/>

BOWKER, M., DAVIES, P.R., AL-MAZROAI, L.S. Photocatalytic reforming of glycerol over gold and palladium as an alternative fuel source. Journal Catalysis Letters, v.128, 2008.

BRAUNGART, M., & MCDONOUGH, W. (2002). Cradle-to-cradle: remaking the way we make things. New York: North Point Press

BRAUNGART, M., & MCDONOUGH, W. (2013). The upcycle: beyond sustainability designing for abundance. New York: North Point Press.

BRAUNGART, M., MCDONOUGH, W., & BOLLINGER, A. (2007). Cradle-to-cradle design: creating healthy emissions: a strategy for eco-effective product and system design. Journal of Cleaner Production, 15(13-14), 1337-1348.

CALVEY, C. H. et al. Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. Bioresource Technology, v. 200, p. 780–788, jan. 2016.

CARDOSO, B. Uso da Biomassa como Alternativa Energética. [s.l: 2012]. Disponível em: <<http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10005044.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2020.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D'A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CHEN, A. J. W., BOUDREAU, M. C., & WATSON, R. T. (2008). Information systems and ecological sustainability. *Journal of Systems and Information Technology*, 10(3), 186-201

Clima. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/climaazoniodesertificacao/mudancasclimaticas>>. Acesso em: 29 nov. 2020.

COELHO, M., AMARAL, P., BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. p.930–944, 2010.

Comissão Europeia (2014a). Rumo a uma economia circular. *Revista Ambiente para os Europeus*. Disponível em: [http://ec.europa.eu/environment/news/efe/articles/2014/08/article\\_20140806\\_01\\_pt.htm](http://ec.europa.eu/environment/news/efe/articles/2014/08/article_20140806_01_pt.htm)

Conferência Rio-92 sobre o meio ambiente do planeta: desenvolvimento sustentável dos países. Disponível em: <<https://www.senado.gov.br/noticias/Jornal/emdiscussao/rio20/a-rio20/conferencia-rio-92-sobre-o-meio-ambiente-do-planeta-desenvolvimento-sustentavel-dos-paises.aspx>>. Acesso em: 6 dez. 2020.

CRISTINA, M. Aproveitamento do glicerol residual no potencial biotecnológico de *Mortierella isabellina* na produção e acumulação de lipídeos. *Ufpe.br*, 2015.

DAS, S. et al. Development of nutrient media to increase the accumulation of lipids without genetic modification of a lipogenic microorganism. *RSC Advances*, v. 7, n. 61, p. 38149–38154, 2017.

DELMIRO, THALITA MARREIRO. Potencial da *Monoraphidium* sp. produzida em cultivos outdoor para obtenção de biocombustíveis de terceira geração. *Ufrn.br*, 2020.

DOBROWOLSKI, ADAM et al. Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource technology*, v. 207, p. 237–243, maio 2016.

DONG T, KNOSHAUG EP, PIENKOS PT, LAURENS LML. 2016. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Appl. Energy*, 177, 879–895.

DONOT, F. et al. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and Bioenergy*, v. 68, p. 135–150, set. 2014.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; STRUB, C.; SCHORR-GALINDO, S. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and bioenergy*, 68, 135-150, 2014.

DOWHAN W, and BOGDANOV M. 2013. “Functional roles of lipids in membranes,” in *Encyclopedia of Biophysics*, ed G. C. K. Roberts (Berlin; Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 868–875.

DSC, O.; ALICE, M.; COELHO, Z. Potencial biotecnológico de *Yarrowia lipolytica* para a produção de lipase em fermentação no estado sólido utilizando frutos nativos da Amazônia Raíssa de Carvalho Pinto e Rocha Projeto de Final de Curso. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/12359/1/RCPRocha.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

DUTRA, KEILLA DOS REIS. Transição Dimórfica em *Yarrowia lipolytica*: ação da auxina e óxido nítrico, 2010

E ROOIJ, J.F.M.; HAKKAART, M.J.J. Yeast extract food flavor. Unilever PLC, Int. Cl. A23 1/28, 1985.

Ellen MacArthur Foundation. (2012). Towards the circular economy 1: economic and business rationale for an accelerated transition. Cowes, Isle of Wight: Ellen MacArthur Foundation.

Ellen MacArthur Foundation. (2013). Towards the circular economy 2: opportunities for the consumer goods sector. Cowes, Isle of Wight: Ellen MacArthur Foundation.

Ellen MacArthur Foundation. (2014). Towards the circular economy: accelerating the scale-up across global supply chains. Presented at World Economic Forum, Geneva, Switzerland, 2014.

FARKADE, V. D.; HARRISON, S. T. L.; PANDIT, A. B. Improved cavitation cell disruption following pH pretreatment for the extraction of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, v.31, p. 25–30, (2006).



FICKERS, P., et al. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Res., v.5, p.527-543, 2005.

FICKERS, P.; BENETTI, P.H.; WACHE, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M.S. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Research, Amsterdam, v. 5, p. 527-43, 2005

Financing the circular economy Capturing the opportunity. .[s.l: 2015]. Disponível em: <<https://www.ellenmacarthurfoundation.org/assets/downloads/Financing-the-circular-economy.pdf>>.

FLEURI, L. F.  $\beta$ -1,3 glucanases, proteases e quitinases: produção, purificação e aplicação. 213 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção de protoplastos e lise da parede celular de leveduras utilizando  $\beta$ -1,3 glucanase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 471–476, jun. 2010.

FOLCH, J., LESS, M. & STANLEY, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226: 497-509.

FONTES, C. G., Produção de biosurfactante por *Yarrowia lipolytica*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Escola de Química- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

GANESAN, D., RAJENDRAN, A., THANGAVELU, V. An overview on the recent advances in the transesterification of vegetable oils for biodiesel production using chemical and biocatalysts. Rev Environ Sci Biotechnol. v.8, p.367-394, 2009.

GOLDEMBERG, J. Pesquisa e desenvolvimento na área de energia. **São Paulo em Perspectiva**, v. 14, n. 3, p. 91–97, jul. 2000.

GRANGER, L.M., PERLOT, P., GOMA, G., PAREILLEUX, A. Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: Prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method. Journal of biochemical and microbiological technology and engineering. Vol. 42, No. 10, pp. 1151-1156, 1993

HAEGLER, A.N.& MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 41, n. 1, pp. 173-178, 1981.

HASSAN, M., et al. Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture, *Process Biochemistry*, v.31, p.355-361, 1996.

HAWKEN, P., LOVINS, A., & LOVINS, H. (2007). *Capitalismo natural: criando a próxima revolução industrial*. São Paulo: Pensamento-Cultrix.

HUSSAIN, J., RUAN, Z., NASCIMENTO, I. A., LIU, Y. LIAO, W. Lipid profiling and corresponding biodiesel quality of *Mortierella isabellina* using different drying and extraction methods. *Bioresource technology*, v. 169, p. 768–72, out. 2014.

JACOB, Z. 1992. Yeast lipids: Extraction, quality analysis and acceptability. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 12: 463-491.

JANUÁRIO, T. L. DA S.; MARINHO, J. L. A.; OLIVEIRA, J. F. A. Potencial de geração de energia elétrica a partir do aproveitamento de resíduos sólidos orgânicos no Brasil. *Brazilian Journal of Development*, v. 5, n. 12, p. 30092–30103, 2019.

KAMEDA, ETEL & MARTINS, F.F. & AMARAL, PRISCILLA & VALONI, E.A. & COELHO, MARIA ALICE. (2014). Flow Cytometry as a Tool to Verify Media Influence in Bio- Oil Accumulation by *Yarrowia lipolytica*. *Chemical Engineering Transactions*. 38. 529-534. 10.3303/CET1438089.

KHOT, M.; KAMAT, S.; ZINJARDE, S.; PANT, A.; CHOPADE, B.; RAVIKUMAR, A. Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. *Microbial Cell Factories*, 11:71, 2012

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *Energy Procedia*, v. 9, p. 274–282, 2011.

KOUTINAS, A. A. et al. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, v. 116, p. 566–577, jan. 2014.

LABOISSIÈRE DE AZEVEDO, J. A ECONOMIA CIRCULAR APLICADA NO BRASIL: UMA ANÁLISE A PARTIR DOS INSTRUMENTOS LEGAIS EXISTENTES PARA A LOGÍSTICA REVERSA. [s.l: 2015]. Disponível em: <[https://www.inovarse.org/sites/default/files/T\\_15\\_036M.pdf](https://www.inovarse.org/sites/default/files/T_15_036M.pdf)>.

Lei nº 11.097. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/lei/111097.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111097.htm)>. Acesso em: 13 nov. 2020.

LEITÃO, A. Economia circular: uma nova filosofia de gestão para o séc. XXI. Circular economy: a new management philosophy for the XXI st century. Portuguese Journal of Finance, Management and Accounting. v. 1, n. 2, 2015.

LIN, L., et al. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. Applied Energy. v.88, 2011.

LIU, C.; SUNA, R.; QIN, M.; ZHANG, A.; RENA, J.; XUB, F.; YE, J.; WU, S. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. Industrial Crops and Products, v.26, p. 212–219, 2007

LOBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: Quality parameters and analytical methods. Química Nova, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600044>

LOPES, HELBERTH JÚNNIOR SANTOS. "Estratégias de adaptação e de cultivo de" Rhodotorulaculoides" visando produção de óleo microbiano a partir de hidrolisados hemicelulósicos." (2020).ITO, T., et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. J BiosciBioeng. v.100(3), p.260-5, 2005.

LOPES, R. et al. PROGRAMA EQ-ANP Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural Seleção de cepas de *Yarrowia lipolytica* para a produção de bio-óleo Dissertação de Mestrado. [s.l: 2014]. Disponível em: <<http://186.202.79.107/download/selecao-de-cepas-de-yarrowia-lipolytica-para-a-producao-de-bio-oleo.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

MADZAK, CATHERINE; GAILLARDIN, CLAUDE; BECKERICH, JEAN-MARIE. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. Journal of Biotechnology, v. 109, n. 1-2, p. 63-81, 2004.

MARCO. Protocolo de Kyoto foi marco na proteção climática, mas insuficiente. Disponível em: <<https://g1.globo.com/mundo/noticia/2020/02/16/protocolo-de-kyoto-foi-marco-na-protacao-climatica-mas-insuficiente.ghtml>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

MARTINS, F.F, Estudo das condições de biodegradação de óleo cru por *Yarrowia lipolytica* – Projeto Final de Curso – Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011

MEADOWS, D. H., MEADOWS, D. L., RANDERS, J., & BEHRENS, W. W. (1972). Limits to growth. New York: New American Library.

OUR WORLD IN DATA. Global population growth. Disponível em: <

PAGLIARO, M.; ROSSI, M.; Future of Glycerol: New Usages for a Versatile Raw Material, 1a. ed., Royal Society of Chemistry: London, 2008

PAPANIKOLAOU S & AGGELIS G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. European Journal of Lipid Science and Technology, 113(8), 1052-1073.

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

PAPANIKOLAOU, S., et al. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3propanediol, citric acid and single cell oil. Biomass and Bioenergy, v.32(1), 2008.

PAPANIKOLAOU, S., et al. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. Applied Microbiology and Biotechnology. v.58(3), p.308–312, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, S.; CHEVALOT, L.; AGGELIS, I.; MARC, G. I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. Journal of Applied Microbiology, 2002, v. 92, p. 737–744. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01577.x.

PATEL, A.; MATSAKAS, L. A comparative study on de novo and ex novo lipid fermentation by oleaginous yeast using glucose and sonicated waste cooking oil. Ultrasonics Sonochemistry, v. 52, p. 364–374, abr. 2019.

- PINTO, A., et al. Biodiesel: an overview. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.16, p.1313-1330, 2005.
- PINZI, S., DORADO, M. P. Feedstocks for advanced biodiesel production. In: Luque R, Melero JA, editors. *Advances in biodiesel production: processes and technologies*. Cambridge, UK: Woodhead publishing. p. 69–90, 2012.
- POLI JS, LÜTZHØFT HCH, KARAKASHEV DB, VALENTE P, AND ANGELIDAKI I. 2014. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Bioresour. Technol.* 151, 388–391. doi: 10.1016/j.biortech.2013.09.128.
- POLI, J. S. Otimização da produção e caracterização do óleo microbiano produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica* QU21. 2014 105 f. Tese (Doutorado) Programa de pós graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. 2014
- PRETO-MG, O. Filipe da Silva Siqueira BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS CAPAZES DE UTILIZAR O GLICEROL BRUTO COMO FONTE DE CARBONO. [s.l.], 2015. Disponível em: <[https://repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/4736/1/DISSERTA%c3%87%c3%83O\\_Biopropec%c3%a7%c3%a3oLevedurasOleaginosas.pdf](https://repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/4736/1/DISSERTA%c3%87%c3%83O_Biopropec%c3%a7%c3%a3oLevedurasOleaginosas.pdf)>.
- QIN, L. et al. From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*, v. 245, p. 1507–1519, dez. 2017.
- QUINTELLA, C., et al. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Química Nova*, v.32(3), p.793- 808, 2009.
- RATLEDGE C, WYNN JP. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol.* 2002;51:1–51. doi: 10.1016/S0065-2164(02)51000-5.
- RATLEDGE, C, WYNN J. 1976. Microbial production of oils and fats. 2nd ed. in: *Food from waste*, (Ed.) K.J.P. G.G. Birch, J.T. Worgan, Applied Science Publishers. London, UK, pp. 98-113
- RATLEDGE, C, WYNN J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol.* v.51, 2002.

- RATLEDGE, C. In: *Microbial Lipids*, RATLEDGE, C. e WILKINSON, S. G., (eds), vol. I, 2ed., pp, 552-687, Academic Press, London, 1986.
- RATLEDGE, C. Microbial oils and fats: an assessment of their commercial potential. *Progress in Industrial Microbiology*, v. 16, p. 119–126, 1982.
- RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions*, v.30, p.1047–1050, 2002.
- RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, v. 86, n. 11, p. 807-815, 2004
- RATTRAY, J. B. M. Yeasts. In: RATLEDGE, C.; WILKINSON, S. G. (Ed.). *Microbial lipids*. London; New York: Academic Press, 1989. V. 1, p. 555-697.
- ROSA PD, MATTANNA P, VALENTE P. 2015. Avaliação da síntese de lipídeo pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33 em meio de cultura com glicose e sulfato de amônio.. *Revista Brasileira de Biociências (Impresso)*, v. 13, p. 79-83
- RYWINSKA, A., et al. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass Bioenergy*. v.66, p. 48:148–66, 2013
- SALVI, B., PANWAR, N. Biodiesel resources and production technologies – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.16(6), 2012.
- SANTOS, I. T., Adaptação Regulatória na Indústria de Biocombustíveis – Dissertação de Mestrado em Economia – Universidade Federal do Rio de Janeiro — 2012
- SILVA, P., MACK, M., CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. v.27, 2009.
- SISO, M.I.G.; DOVAL, S.S. *Kluyveromyces lactis* immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis. *Enzyme Microb. Technology*, v.16, p.303-310, 1994.
- SITEPU, Irnayuli R et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, v. 32, n. 7, p. 1336–1360, nov. 2014

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Bioresource Technology Microalgae as feedstock for biodiesel production under ultrasound treatment – A review. *Bioresource Technology*, v. 250, n. September 2017, p. 877–887, 2018.

SPANGENBERG, J. H., FUAD-LUKE, A., BLINCOE, K. (2010). Design for sustainability (DfS): the interface of sustainable production and consumption. *Journal of Cleaner Production*, 18(15), 1485-1493

STAHEL, W. R. (1984). The product-life factor. In S. G. Or (Ed.), *An inquiry into the nature of sustainable societies, the role of the private sector*. HARC Houston, TX: The Mitchell Prizes 1982

SU, Z. - G.; FENG, X.- L. Process integration of cell disruption and aqueous two phase extraction. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, n. 74, p. 284–288, (1999)

SUAREZ, P. et al. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, 32(3), 768-775, 2009.

SZABO, R. (1999). Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration, *Folia Microbiol.* v.44, n.1, pp.19-24.

TACCARI, M., et al. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresour Technol.* v.110, p.488-495, 2012.

THEURILLAT, R.; THORMANN, W. Monitoring of tricyclic antidepressants in human serum and plasma by HPLC: characterization of a simple, laboratory developed method via external quality assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 18, n. 4-5, p. 751–760, dez. 1998.

TOMÉ, M. Brasil é o segundo maior produtor de biodiesel do planeta. Disponível em: <<https://www.canalbioenergia.com.br/brasil-e-o-segundo-maior-produtor-de-biodiesel-do-planeta/>>. Acesso em: 27 maio. 2021.

TSUGAWA, RYUICHIRO et al. Fermentation of n-Paraffins by Yeast: Part III.  $\alpha$ -Ketoglutarate Productivity of Various Yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 33, n. 6, p. 929- 938, 1969.

Uma Discussão Sobre Os Impactos Ambientais Causados Pela Expansão da Agricultura: A Produção de Biocombustíveis no Brasil RAFAELLE GOMES FIRMINO (UFPB) 1 Dra. MÁRCIA BATISTA DA FONSECA (UFPB) 2. [s.l.: s.n., s.d.]. Disponível em: <<http://www.anppas.org.br/encontro4/cd/ARQUIVOS/GT4-795-675-20080510155652.pdf>>.

UMPIERRE, A. P.; MACHADO, F. Glycerochemistry and Glycerol Valorization. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 1, 2013.

VENTOM, A. M.; ASENJO, J. A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskoviaxanthineolytica* LL-G109. *Enzymes Microbial Technology*, v. 13, p. 71-75, 1991

VICENTE, G.; BAUTISTA, L.F., RODRÍGUEZA, R.; GUTIÉRREZA, F. J.; SÁDABA, I.; RUIZVÁZQUEZB, R.M.; ET. AL. biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical engineering journal*, 2009, v. 48, n. 1, p. 22-27. doi: 10.1016/j.bej.2009.07.014.

VIEIRA, L. et al. PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Yarrowia lipolytica* UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO Orientadores. 2010, [s.d.]. Disponível em: <<http://186.202.79.107/download/producao-de-acido-citrico-por-yarrowia-lipolytica-utilizando-glicerol.pdf>>.

WEBSIS. Protocolo de Quioto. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/clima/convencao-das-nacoes-unidas/protocolo-de-quioto.html>>. Acesso em: 13 nov. 2020.

WIEDERHOLD, E. et al. The Yeast Vacuolar Membrane Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 8, n. 2, p. 380–392, fev. 2009.

WU, S. et al. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 1803–1807, 2011.

WWF (2020) Living Planet Report 2020 - Bending the curve of biodiversity loss. Almond, R.E.A., Grooten M. and Petersen, T. (Eds). WWF, Gland, Switzerland. Disponível em: <<https://f.hubspotusercontent20.net/hubfs/4783129/LPR/PDFs/ENGLISH-FULL.pdf>>. Acesso em: 06 dez. 2020.

YELLAPU SK, BEZAWADA J, KAURR, TYAGI RD. 2016. Detergent assisted lipid extraction from wet yeast biomass for biodiesel: A response surface methodology approach. *Bioresour Technol.* 218:667-73. doi: 10.1016/j.biortech.2016.07.011.



ZANOTTO, S. P.; ROMANO, I. P.; LISBOA, L. U. S.; DUVOISIN JR., S.; MARTINS, M. K.; LIMA, F. A.; SILVA, S. F.; ALBUQUERQUE, P. M.; J. Braz. Chem. Soc. 2009, 20, 1046.

ZHENG, Y.; YU, X.; ZENG, J.; CHEN, S. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels* 5:50, 2012

ZHU, L Y; ZONG, Meihan; WU, Hong. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource technology*, v. 99, p. 7881–7885, 1 dez. 2008.