



APROVEITAMENTO DE GLICEROL BRUTO  
PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM  
*YARROWIA LIPOLYTICA*

Raisa de Souza Santos

**Projeto de Final de Curso**

Orientadores

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Dezembro de 2014

# **APROVEITAMENTO DE GLICEROL BRUTO PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM *YARROWIA LIPOLYTICA***

*Raisa de Souza Santos*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico Industrial.

Aprovado por:

---

Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc.

---

Etel Kameda, D.Sc.

---

Érika de Araujo Valoni, M.Sc.

Orientado por:

---

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

---

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil  
Dezembro de 2014

Santos, Raisa de Souza.

Aproveitamento de glicerol bruto para produção de lipídeos em *Yarrowia lipolytica* /Raisa de Souza Santos. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014.  
xi, 61 f.; il.

(Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2014

Orientadores: Priscilla Filomena Fonseca Amaral e Maria Alice Zarur Coelho

1. *Yarrowia lipolytica*. 2. Glicerol bruto. 3. Lipídeo intracelular. 4. Projeto Final de Curso (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Priscilla Filomena Fonseca Amaral e Maria Alice Zarur. I. Título.

"Por isso não desanimamos. Embora exteriormente estejamos a desgastar-nos, interiormente estamos sendo renovados dia após dia, pois os nossos sofrimentos leves e momentâneos estão produzindo para nós uma glória eterna que pesa mais do que todos eles. Assim, fixamos os olhos não naquilo que se vê, mas naquilo que não se vê, pois o que se vê é transitório, mas o que não se vê é eterno."

*2 Coríntios 4:16-18*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela forma como tem me sustentado na vida, inclusive durante os anos da graduação. Eu quis desistir mas Ele tomou-me em Seus braços e deu-me força. Em tudo dai graças!

Aos meus pais Daniel e Ivany pelo esforço dedicado à minha criação. Ao amor infinito e incondicional. O motivo de seguir em frente é e será sempre por vocês.

À minha família, principalmente à minha prima Michelle Lima, que deu todo o apoio e carinho necessário.

À professora orientadora Priscilla Amaral pelo seu carinho, atenção e paciência! Obrigada pelas risadas, pelas conversas, pelos conselhos. Obrigada por me deixar livre no projeto de forma que eu pudesse tomar minhas próprias decisões. Você é um amor de pessoa! Você é o exemplo de uma excelente professora e orientadora! Adoro você!

!

À professora orientadora Maria Alice Coelho por abrir prontamente as portas de seu laboratório. Pela orientação e carinho! Desde o meu início na iniciação científica você sempre se mostrou solícita e gentil comigo. Muito obrigada! .

Aos meus bons e grandes amigos que Deus me deu. Da UFRJ :Bernardo Saldanha, Roberta Ribeiro, Aline Tavares, Jocarla Rogério, Gabrielle Viana, Felipe Rivera, Letícia Abreu. Vocês sabem bem o que é estudar na EQ, obrigado por muitas vezes me acalmarem e me fazerem rir em meio ao desespero. Do Elite: Juliana Guimarães, Sara Cruz, Camila Bottino, Aline Rosa, Thiago Araújo, Victor Quintanilha. Obrigada pelas risadas em todos os nossos encontros de uma amizade de quase 10 anos. Afinal, sem meus amigos o que seria de mim?

Ao pessoal do laboratório BIOSE pela alegria, companhia e carinho. Tatiana Félix, Fernarnda Martins, Roseli Lopes, Kelly Alencar Etel Kameda, Gizele Cardoso, Mariana Miguez, Bernardo Ribeiro, Luana Carvalho, Patrícia Botelho, Bernardo Ribeiro, Verônica Lopes Naíra Menezes, Uilly, Vanessa Furtado, Vanessa Saab.

Aos amigos da graduação, pela ajuda com materiais, pelos papos do corredor, pelas trocas de idéias, pelas risadas, pelas palavras de incentivo, enfim, por terem me proporcionado a alegria em meio à uma rotina tão difícil.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Químico Industrial.

## **APROVEITAMENTO DE GLICEROL BRUTO PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM *YARROWIA LIPOLYTICA***

Raisa de Souza Santos

Dezembro, 2014

Orientadores: Prof<sup>a</sup> Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Prof<sup>a</sup> Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

A alta demanda de energia no mundo industrializado e no setor doméstico, bem como os problemas de poluição causados devido ao vasto uso de combustíveis, têm resultado em uma crescente necessidade de desenvolver fontes de energias renováveis como exemplo o biodiesel. Porém, o grande aumento da produção de biodiesel nos últimos anos, têm gerado enormes quantidades de seu coproduto, o glicerol bruto. Sua aplicação seria diversa se não fossem necessárias etapas complexas de purificação que elevam consideravelmente o custo de obtenção e utilização deste composto. Devido a isso, têm sido um grande desafio para muitos pesquisadores desenvolverem estudos científicos de forma a encontrar destinos apropriados para que o glicerol bruto seja transformado em um produto de alto valor agregado. *Yarrowia lipolytica* é uma levedura com capacidade de acumular lipídeos a partir de diversas fontes de carbono. Diferentes condições de cultivo permitem produzir lipídios com composição específica para serem usados na produção de biocombustíveis. O objetivo deste trabalho é otimizar a composição do meio de cultura para o melhor acúmulo de lipídios, estudar uma metodologia de extração deste composto intracelular e propor um projeto de planta de produção para o mesmo. Os parâmetros estudados foram a concentração de glicerol, extrato de levedo, peptona e sulfato de amônio no meio de cultura. Pelo método da fluorimetria detectou-se que o maior valor de acúmulo obtido foi utilizando 50 g/l de glicerol puro; 0,1 g/l de levedo, 0 g/l de peptona, 0 g/l de sulfato de amônio com agitação de 250 rpm em meio mineral não tamponado. Com a substituição do glicerol puro pelo glicerol bruto, o acúmulo de lipídeo foi 67% maior. Para o estudo da extração, foram testados: (i) congelamento das células e liofilização, (ii) pasteurização seguida de congelamento e liofilização e (iii) secagem em estufa como pré-tratamento das células. O lipídeo foi extraído por rompimento da parede celular por atrito mecânico ocasionado por agitação das células com diferentes quantidades pérolas de vidro e solução salina em diferentes volumes do solvente (Clorofórmio/Metanol 2:1). O melhor pré-tratamento de amostras para a extração foi considerado o congelamento das células seguido de liofilização. Já o melhor processamento da extração foi considerado o uso de 20g de pérolas de vidro, 0mL de solução salina e 20mL de solvente onde obteve-se o maior percentual lipídico obtido correspondente a 14,48%.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIOVE	Associação Brasileira da Indústria de Óleos Vegetais
ABIQUIM	Associação Brasileira da Indústria Química
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
C/N	Relação carbono/nitrogênio
DO <sub>600nm</sub>	Densidade ótica à 600nm
EIA	<i>Energy Information Administration</i>
ICL	Índice de Corpúsculo Lipídico
KIT	<i>Karlsruhe Institute Technology</i>
MDIC	Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior
MDL	Mecanismo de desenvolvimento limpo
NCM	Nomenclatura Comum do Mercosul
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
Pró-Álcool	Programa Nacional do Álcool
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
SIDS	<i>Screening Information Data Set</i>
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Propriedades físicas do glicerol

**Tabela 2** Evolução do volume de biodiesel produzido no Brasil e de glicerol bruto estimado

**Tabela 3** Volumes e preços de importações e exportações de glicerol bruto

**Tabela 4** Estudos realizados de produção de metabólitos por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol com fonte de carbono

**Tabela 5** Composição do meio de cultivo YPD

**Tabela 6** Composição do meio mineral do meio de produção

**Tabela 7** Fatores e níveis do planejamento experimental  $2^{k-1}$

**Tabela 8** Experimentos gerados pelo software *Statistica 7.0*

**Tabela 8** Resultados dos ICLs máximos obtidos a partir do planejamento experimental

**Tabela 10** Percentuais lipídicos obtidos para cada diferente pré-tratamento das células

**Tabela 11** Percentuais lipídicos obtidos da variação de parâmetros no processo de extração



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel no Brasil
- Figura 2** Fluxograma do processo produtivo do biodiesel
- Figura 3** (a) Reação global. (b) Reação de transesterificação envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos esteres
- Figura 4** Produção mundial de biodiesel, 2004-2009
- Figura 5** Produção nacional de biodiesel 2005-2013
- Figura 6** Estrutura molecular do glicerol
- Figura 7** Evolução da produção mundial de biodiesel (em barras) e glicerol bruto (linha) (2000-2011)
- Figura 8** Mercados de aplicação da glicerina
- Figura 9** Acúmulo de lipídeo intracelular pela levedura *Cryptococcus curvatus*
- Figura 10** Fluorescência do acúmulo de lipídeo intracelular em *Yarrowia lipolytica*
- Figura 11** Morforlogia microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682
- Figura 12** Representação da recuperação de fluorescência. A fluorescência do *BODIPY* é inibida em solução pelo KI e recuperada quando as células são adicionadas. O *BODIPY* se junta ao corpúsculo lipídico no interior da célula, no qual o inibidor é excluído
- Figura 13** Exemplificação de obtenção do ICL a partir do coeficiente angular da curva de fluorescência versus absorvância
- Figura 14** Representação esquemática do processo de extração de lipídeos
- Figura 15** - Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro.
- Figura 16** Diagrama de Pareto gerado pelo software *Statistica 7.0* para analisar as variáveis que influenciam na produção de lipídeo intracelular
- Figura 17** Cinética do índice de corpúsculo lipídico dos experimentos do planejamento experimental em meio tamponado e não tamponado.
- Figura 18** Cinética do índice de corpúsculo lipídico dos experimentos contendo glicerol puro e bruto
- Figura 19** Fluxograma representativo do processo de produção de lipídeo intracelular
- Figura 20** Fluxograma representativo do processo de extração de lipídeo intracelular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	13
2.1 O Biodiesel como fonte renovável de energia	13
2.1.1 Matérias primas para a produção de biodiesel	14
2.1.2 Rotas de obtenção	15
2.1.3 A produção de biodiesel no Brasil e no mundo	18
2.2 Glicerol	20
2.2.1 Características gerais e propriedades físicas	20
2.2.2 Mercado	21
2.2.3 Aplicações	23
2.3 Lipídeo Intracelular	26
2.4 Síntese de Lipídeos Intracelulares em Leveduras	27
2.5 <i>Yarrowia lipolytica</i>	28
<b>3 METODOLOGIA</b>	31
3.1 Materiais	31
3.2 Micro-organismo	31
3.3 Preservação	32
3.4 Pré-inóculo	32
3.5 Estudo das variáveis que influenciam no processo de produção de lipídeo intracelular	32
3.5.1 Planejamento Experimental	33
3.6 Análise do Índice de Corpúsculo Lipídico	34
3.6.1 Fixação das células	34
3.6.2 Determinação do Índice de Corpúsculo Lipídico (ICL)	35
3.7 Estudo da extração do lipídeo intracelular	36
3.7.1 Estudo do tratamento das células antes da extração	36
3.7.2 Extração dos lipídeos	36
3.7.3 Otimização da extração de lipídeos	37
3.8 Métodos Analíticos	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	39
4.1 Estudo das variáveis que influenciam no processo de produção de lipídeo intracelular	39
4.2 Estudo da extração do óleo intracelular	43

4.2.1 Estudo do Pré-Tratamento das Células	43
4.2.2 Avaliação de parâmetros da extração dos lipídeos	43
<b>5 PROJETO DE PLANTA</b>	44
5.1 Equações para a previsão da planta de produção	44
5.2 Cálculos para a planta de Lipídeo Intracelular	47
<b>6 CONCLUSÕES</b>	53
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	54

## 1. INTRODUÇÃO

A sociedade está vivenciando um momento de crescente preocupação com a preservação do meio ambiente. As legislações ambientais tendem a ficar mais rigorosas e as políticas públicas têm estimulado o uso de recursos naturais renováveis em substituição aos recursos fósseis. O Tratado de Quioto gerou desdobramentos, tais como: o mercado mundial de carbono e os mecanismos de desenvolvimento limpo (MDL), impulsionando o esforço científico para viabilizar a utilização de tecnologias mais verdes (GORECKI *et al.*, 2010).

Diversos são os fatores que podem determinar o interesse pela utilização de matérias-primas renováveis com perspectivas de ganho de importância na indústria no decorrer do século XXI. Podem ser citados como fatores de maior peso: (i) o potencial da biotecnologia industrial ou *white biotechnology*, (ii) as restrições ambientais ao uso de matérias-primas fósseis, (iii) a orientação das estratégias empresariais e a perspectiva da inovação tecnológica como saída de crises (BOMTEMPO, 2010).

Nesse contexto, a utilização de biocombustíveis vem contribuir para a redução do uso de recursos fósseis. O interesse por combustíveis de fontes renováveis teve como marco inicial a crise do petróleo dos anos 1970. A dificuldade de acesso ao petróleo em decorrência de questões políticas, da concentrada distribuição geográfica de suas reservas e do seu acentuado aumento de preço levaram ao desenvolvimento de combustíveis alternativos para uso no segmento de transporte (SANTOS, 2012). Para diminuir a dependência do petróleo, em 1975 no Brasil o decreto nº76.593 criou o Programa Nacional do Álcool (Pro-Álcool) introduzindo este biocombustível na matriz energética brasileira (BASTOS, 2009).

Em 2004, o Governo Federal instituiu o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), que prevê que este biocombustível seja adicionado ao diesel fóssil. Em 2008, o diesel comercializado em todo território nacional passou a conter, obrigatoriamente, 3% de biodiesel (B3) (MOTA *et al.*, 2009). Em 2010 aumentou-se este percentual para 5% (B5). Em julho deste ano, o governo determinou o aumento para 6% e a partir de 1º de novembro, o percentual foi elevado à 7% (BIODIESELBR).

Uma expansão significativa da indústria do biodiesel resultaria na geração de grandes quantidades de glicerina, sendo que para cada tonelada de biodiesel obtido, são gerados 100 Kg de glicerol bruto excedente este que pode provocar efeitos adversos à economia do biodiesel (BOWKER *et al.*, 2008). Neste contexto, teme-se que o excesso de glicerol produzido possa ser descartado de maneira errada no meio ambiente (COSTA, 2008). Sendo assim, têm-se buscado alternativas para a utilização do excedente de glicerol, sendo a bioconversão de glicerol

por via fermentativa uma alternativa que agrega valor à indústria de biodiesel (SILVA *et al.*, 2009). Uma forma alternativa de valorização do glicerol pode ser através da sua utilização como fonte de energia para produção de óleo microbiano por micro-organismos oleaginosos (PAPANIKOLAOUS *et al.*, 2008).

São descritos como micro-organismos oleaginosos aqueles que acumulam lipídeos em porcentagem superior a 20% em relação a sua biomassa. Poucos são os micro-organismos conhecidos como oleaginosos. As leveduras oleaginosas mais conhecidas são *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Trichosporon* e *Yarrowia*. Em média, estas leveduras acumulam lipídeos em torno de 40% em relação à biomassa. Entretanto, em condições de limitação de nutrientes, o acúmulo de lipídeos pode chegar a 70% em relação à biomassa (BEOPOULOS *et al.*, 2009).

*Yarrowia lipolytica* é uma das espécies de leveduras “não convencionais” mais estudadas devido a sua capacidade de gerar produtos de grande interesse industrial, e entre esses produtos destaca-se o lipídeo intracelular. Além disso, é possível a utilização de glicerol como fonte de carbono para o seu cultivo (PAPANIKOLAOUS *et al.*, 2002).

Visto o potencial da produção de biodiesel e conseqüentemente, do grande volume gerado de glicerina como subproduto, o presente estudo busca encontrar uma forma de aproveitamento de glicerol bruto utilizando-o como fonte de carbono no meio de cultivo de *Yarrowia lipolytica* de forma a estudar a produção e o acúmulo de lipídeo intracelular e sua extração. Assim como também, sugerir um projeto de planta de produção com base nos resultados obtidos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O biodiesel como fonte renovável de energia

As mudanças climáticas estão sendo colocadas como um dos principais desafios para a humanidade no século XXI, ao lado de outros temas já presentes na agenda pública, como é o caso do combate à pobreza e da geração de trabalho decente. A preocupação específica com relação ao clima diz respeito ao aquecimento global (um agravamento do efeito estufa), que é gerado pelo excesso de emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera. Grande parte deste excesso deriva do modelo energético global, cuja matriz tem como fonte principal de matéria-prima os recursos naturais não renováveis, como o petróleo. (MATTEI, 2010)

Os combustíveis fósseis, que são recursos energéticos não renováveis, tendem a se esgotar com o passar dos anos. Ressaltando que o uso de combustíveis fósseis associado aos sérios impactos ambientais acaba resultando em impactos diretos à saúde humana como problemas respiratórios, cardiovasculares e câncer devido à poluição do ar (GOLDEMBERG e LUCON, 2007).

Devido a isso, a ampla e larga utilização de combustíveis fósseis tem sido reconsiderada por preocupações ambientais. Uma forma de abordar essa preocupação seria incentivar o aumento do uso de combustíveis a partir de fonte renováveis. Com seu uso generalizado, é esperado que essas novas fontes de energia possam ajudar a melhorar a sustentabilidade de forma a reduzir impactos ambientais provocados pela atividade humana. Várias fontes de energia estão sendo desenvolvidas ao redor do mundo e uma dessas fontes alternativas é o biodiesel produzido a partir da transesterificação de óleo vegetal ou gordura animal (KAECHER *et al.*, 2013).

De acordo com a Resolução nº 7 de 19 de março de 2008 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel é definido como um combustível composto de alquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleo vegetal ou gordura animal conforme a especificação contida no Regulamento Técnico ANP nº. 1/2008, que integra a referida resolução (ANP, 2008). A Lei nº 11.097, publicada em 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira e ampliou a competência administrativa da ANP e esta 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.

Após quase 30 anos da criação do Pro-Álcool, em dezembro de 2004 foi iniciado o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) e em janeiro do ano seguinte foi publicada a Lei 11.097 que estabeleceu os percentuais de mistura de biodiesel no diesel, sendo de 2005 a 2007, mistura de 2% de biodiesel no diesel em caráter não obrigatório resultando em cerca de 800 milhões de litros de biodiesel por ano; de 2008 a 2012, adição obrigatória de 2% de biodiesel correspondendo a aproximadamente 1 milhão de litros por ano e, finalmente, obrigatoriedade de 5% de biodiesel no diesel a partir de 2013 (MENDES *et al.*, 2009). O governo posteriormente reviu essas metas e antecipou para janeiro de 2010 a mistura obrigatória de 5% de biodiesel no diesel. Em julho deste ano, decretou-se por lei o aumento de 6% de biodiesel na mistura e a partir de novembro deste ano a porcentagem foi elevada à 7% em uma nova lei recentemente sancionada pelo governo. Estima-se que até 2021, o percentual possa chegar a 20%. (BIODIESELBR)

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

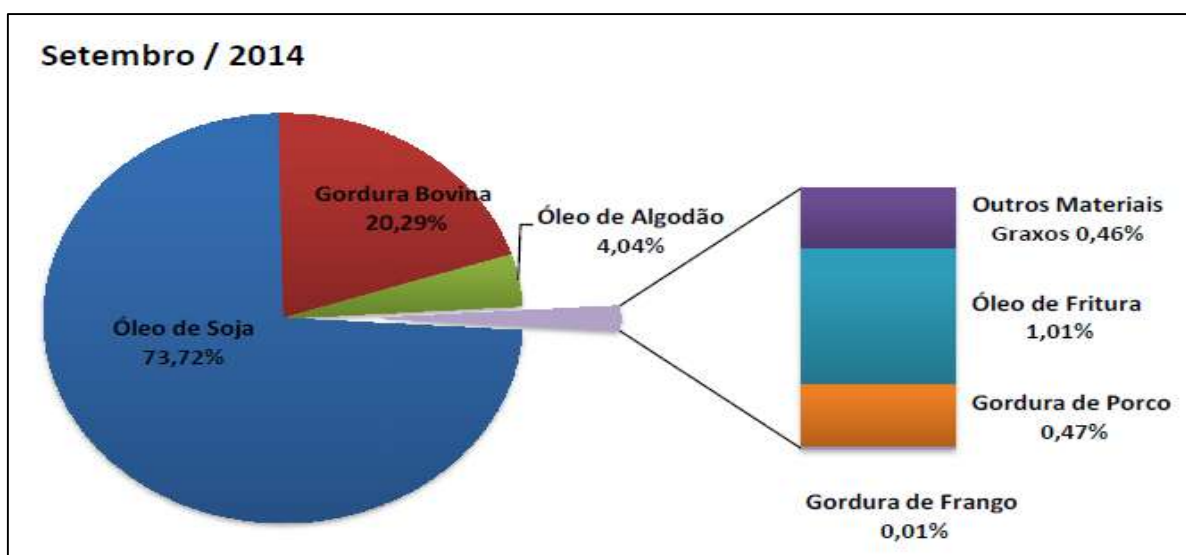
O biodiesel é um combustível limpo, do ponto de vista ambiental, uma vez que é renovável e menos poluente. Quando queimado no motor a diesel, libera 50% menos material particulado e 98% menos enxofre que o diesel de petróleo, o que não provoca a emissão de SO<sub>2</sub> e SO<sub>3</sub>, poluentes danosos à qualidade do ar e responsáveis pela chamada chuva ácida. Devido às propriedades físico-químicas semelhantes ao diesel de petróleo, pode ser usado diretamente em motores convencionais, necessitando de mínimas modificações para operar. Também pode ser usado puro ou em mistura, uma vez que se mistura facilmente com o diesel de petróleo, tornando-se um aditivo e não requer armazenamento especial (ARANDA *et al.*, 2003).

### 2.1.1 Matérias-primas para a produção de biodiesel

Segundo Cesar (2009), o Brasil possui vantagens competitivas importantes na produção geral de biodiesel e é considerado uma referência no uso de fontes renováveis de energia, apresentando disponibilidade de áreas agricultáveis que poderiam ser direcionadas para atividades de agroenergia. Este fato não ocorre na maioria dos países produtores de bionergia, especialmente os da Europa.

O processo tradicionalmente utilizado para a obtenção do biodiesel é a transesterificação, que consiste na reação de triacilgliceróis contidos em óleos e gorduras de origem animal ou

vegetal com álcool de cadeia carbônica curta na presença de um catalisador. Qualquer óleo ou gordura de origem animal ou vegetal que contenha triacilgliceróis formados por ácidos graxos de cadeia longa em sua composição pode ser transformado em biodiesel como, por exemplo, os óleos de soja, colza, palma, palmiste, girasol, milho, oliva, linhaça, gergelim, coco, amendoim, caroço de algodão, babaçu, buriti, mamona, pinhão-manso e o sebo bovino (PARENTE, 2003). No Brasil, há diferentes espécies de oleaginosas como fontes de óleos vegetais das quais é possível produzir biodiesel, entre elas mamona, dendê, girasol, babaçu, soja e algodão (MNE, 2007). A Figura 1 mostra o atual perfil de utilização de matérias-primas com a finalidade de produção de biodiesel.



**Figura 1: Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel no Brasil. (Fonte: ANP, 2014)**

### 2.1.2 Rotas de obtenção

A produção de biodiesel pode ser realizada por 3 processos: emulsificação, pirólise e transesterificação, onde a transesterificação alcalina é tradicionalmente, o processo mais utilizado. Nessa reação, óleos ou gorduras, que são compostos basicamente de tri-ésteres da glicerina com ácidos graxos, são misturados ao metanol ou etanol e na presença de um catalisador, fornecem uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e glicerina (HAN, 2009 e SUAREZ *et al.*, 2009). As Figuras 2 e 3 representam o processo produtivo por transesterificação e as reações envolvidas, respectivamente.



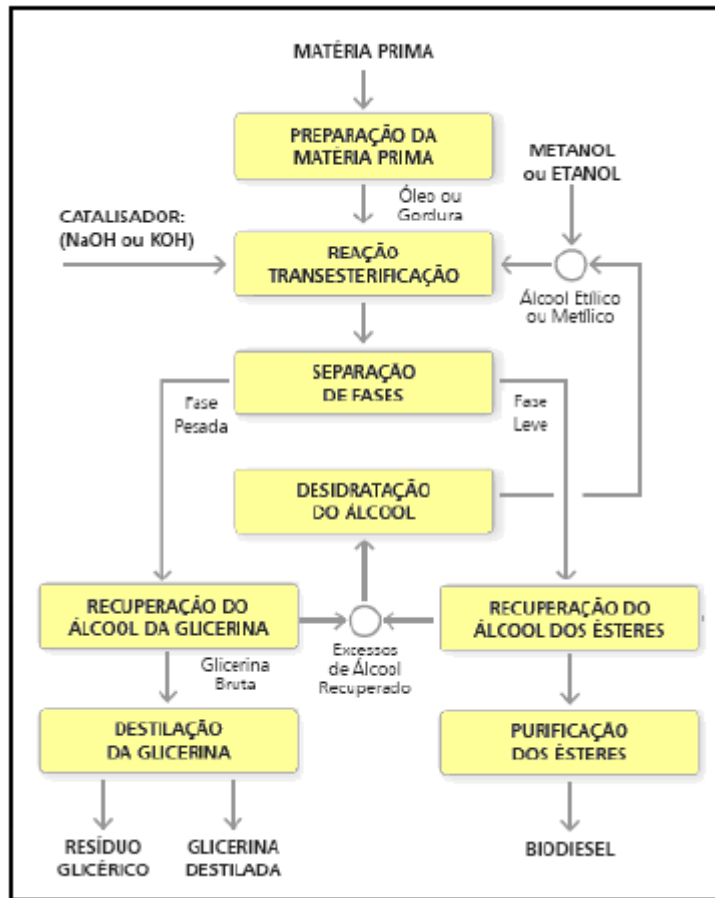
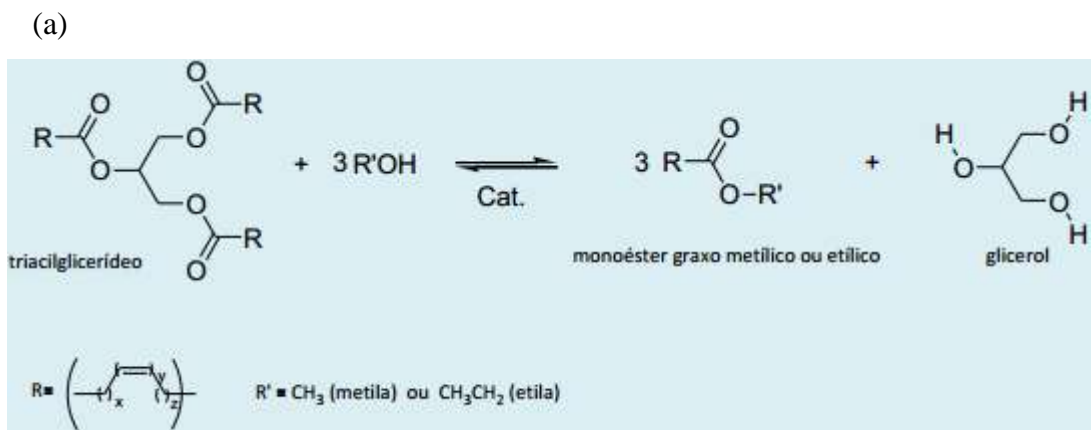


Figura 2: Fluxograma do processo produtivo do biodiesel (Fonte: PARENTE, 2003).



b)

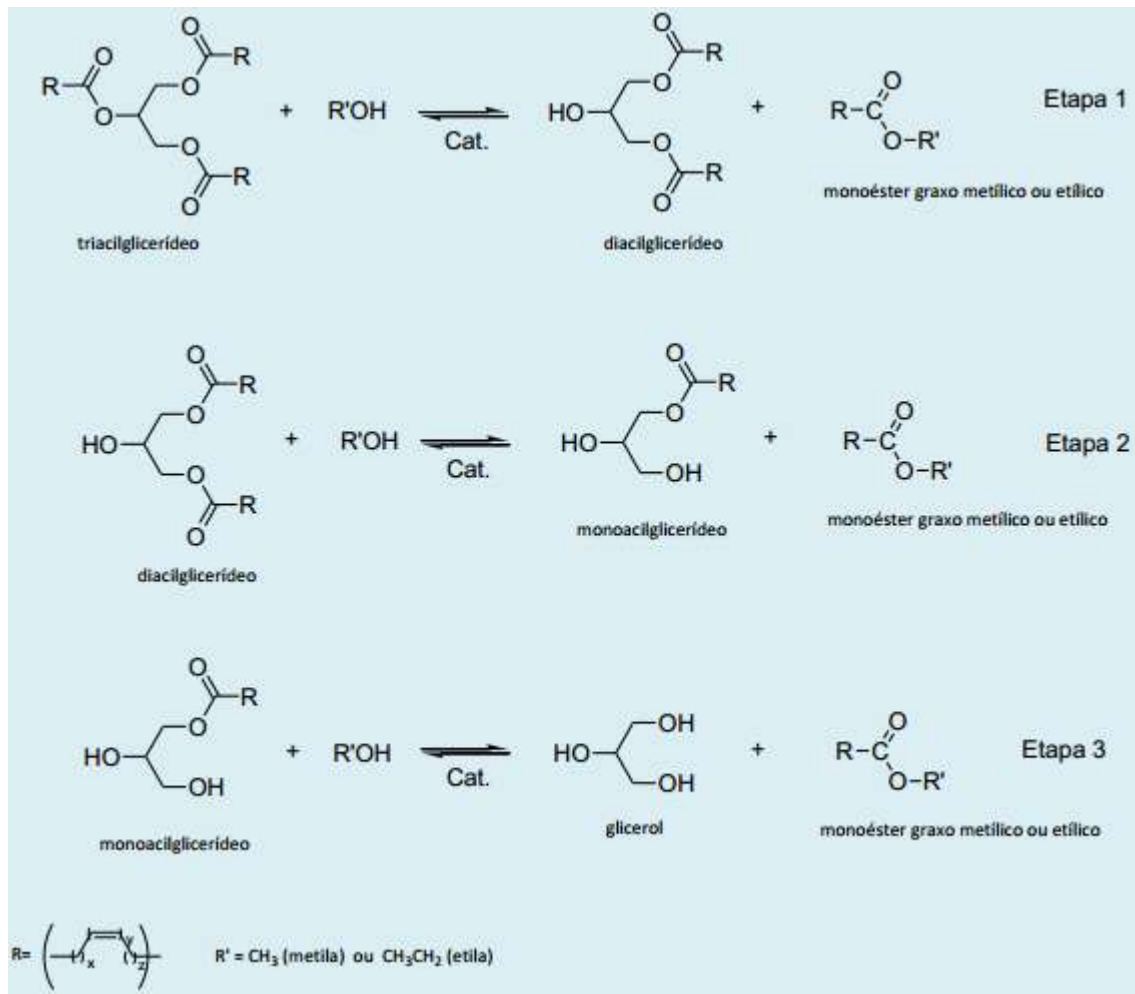


Figura 3: (a) Reação global de obtenção de biodiesel por transesterificação (b) Reação de transesterificação envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos ésteres. (Fonte: QNINT/SBQ)

A reação de transesterificação ocorre em reatores contínuos que funcionam em temperaturas entre 60 e 250°C, sob pressão de 0,1 a 10 MPa, de modo a garantir uma razão de álcool para éster produzido de 5:15 (ELLIS *et al.*, 2008). Os catalisadores alcalinos, como metilatos de sódio ou de potássio são os mais utilizados no Brasil. As principais vantagens deste tipo de catalisadores são justificadas pela alta reatividade destes compostos, bem como a pressão requerida ser menor quando comparados com outros (CHEN, JU e MOU, 2007).

A reação de transesterificação ocorre em três etapas distintas: na primeira, as moléculas dos triglicerídeos são atacadas por ânions do álcool, formando compostos comumente conhecidos como FAME (*fatty acids methyl ester*), sigla inglesa para ésteres metilados de ácidos graxos, bem como moléculas de diglicerídeos. Na segunda fase da transesterificação ocorre ataque do ânion nas moléculas de diglicerídeos produzindo FAME e monoglicerídeos.

Na terceira e última etapa do processo, as moléculas de monoglicerídeos são atacadas pelo ânion proveniente do álcool e novamente forma-se FAME e glicerol. Posteriormente ocorre a separação das fases leve e pesada por decantação, já que a mistura entre o glicerol e o biodiesel é heterogênea e as fases são imiscíveis.

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

### 2.1.3 A produção de biodiesel no mundo e no Brasil

O mundo produz hoje muito menos biodiesel do que etanol, mas ao contrário do álcool, cuja produção está concentrada no Brasil e nos EUA, a produção de biodiesel está distribuída em diversos países pelo mundo, com legislação própria e estratégia comercial definida em cada um deles. Essa proliferação pelos continentes facilita a entrada do produto na lista de *commodities* mundiais, favorecendo o desenvolvimento de seu mercado em uma escala global (BIODIESELBR, 2012). A evolução da produção de biodiesel no mundo é representada pela Figura 4.

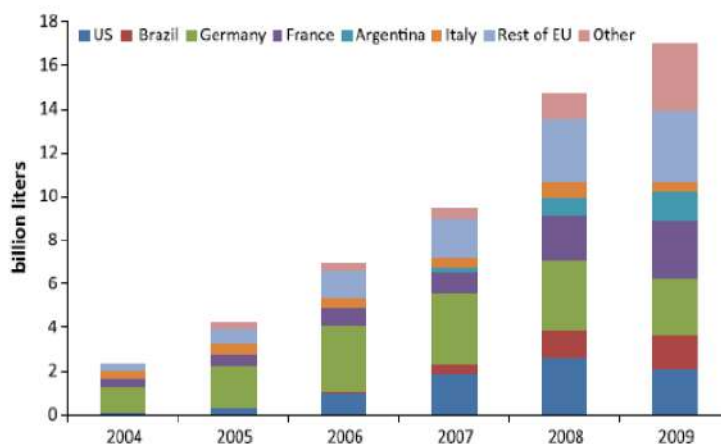
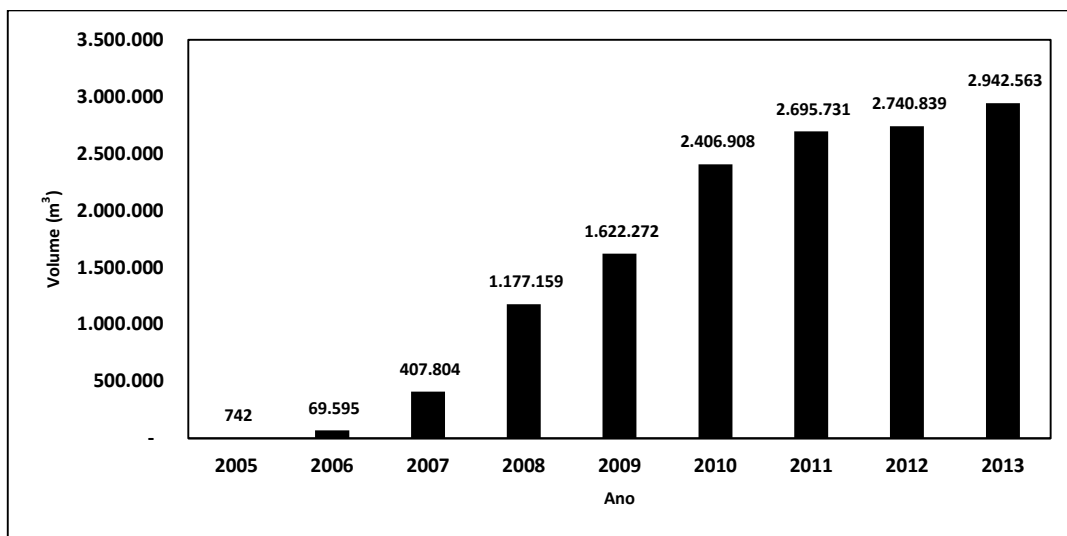


Figura 4: Produção mundial de biodiesel, 2004-2009 (Fonte: TIMILSINA *et al.*, 2011)

No Brasil, atualmente existem 58 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no país, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 21.046,79 m<sup>3</sup>/dia.

Há ainda 1 nova planta de biodiesel autorizada para construção, 1 planta autorizada para modificação e 3 plantas de biodiesel autorizadas para aumento da capacidade de produção. Com a finalização das obras e posterior autorização para operação, a capacidade total de produção de biodiesel autorizada poderá ser aumentada em 1.042,72 m<sup>3</sup>/dia, que representa um acréscimo de 5% na capacidade atual (ANP, 2014). A Figura 5 mostra a evolução da produção de biodiesel no Brasil.



**Figura 5: Produção nacional de biodiesel 2005-2013**  
Fonte: elaboração própria do autor com dados da ANP

Uma das consequências deste aumento da produção de biodiesel decorrente do PNPB foi o aumento da glicerina, um coproduto da produção de biodiesel. É possível calcular que, aproximadamente, 10% p/p de glicerol bruto com pureza entre 55-90%, seja produzido na reação de produção de biodiesel. O restante encontrado na glicerina consiste em triglicerídeos e metanol não reagidos, biodiesel, sabão e outros contaminantes, o que torna o glicerol bruto inadequado para aplicação farmacêutica ou cosmética sem prévio tratamento. Porém, o custo de purificação da glicerina é alto, o que torna o uso inviável (MOTA *et al.*, 2009).

Para o Brasil atender a demanda interna obrigatória da mistura de mais de 5% de biodiesel ao diesel comum, necessita-se uma produção superior a 2,6 milhões de toneladas do biocombustível por ano, gerando mais que 300 mil toneladas de glicerol. Ressalta-se que o excedente de glicerol vem sendo queimado em caldeiras ou despejado no ambiente sem tratamento prévio (JOHNSON, 2007).

Portanto, novas aplicações para a glicerina precisam ser desenvolvidas para o consumo do grande volume que está sendo gerado, sendo urgente encontrar novas formas de empregar este coproduto de reação.

## 2.2 Glicerol

### 2.2.1 Características gerais e propriedades físicas

Glicerol é um dos álcoois mais simples, conhecido também como 1,2,3 propanotriol de acordo com a IUPAC. É também comercialmente conhecido como glicerina, trihidroxipropano, gliceritol ou álcool glicídico. O Glicerol é um líquido oleoso, viscoso, não possui odor e nem cor. Glicerol contém três grupos hidroxilas hidrofílicas responsáveis por tornar o composto higroscópico e solúvel em água (RAHMAT *et al.*, 2010; PERRY, 2007). A Figura 6 mostra sua estrutura.

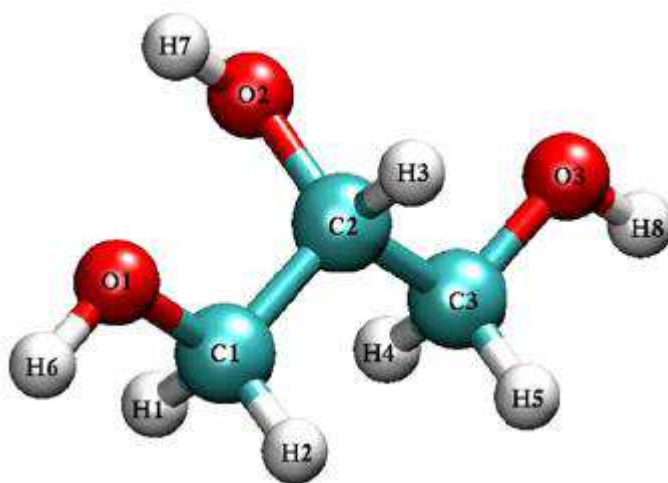


Figura 6: Estrutura molecular do glicerol (Fonte: BLIECK *et al.*, 2005)

Glicerina é completamente miscível em várias substâncias tais como: álcool (metil, etil, isopropil, n-butil, isobutil), etilenoglicol, propilenoglicol, fenol. Sua solubilidade em acetona é de 5% p/p e em acetato de etil corresponde a 9%. É levemente solúvel em dioxano e acetato e parcialmente insolúvel em álcoois superiores, ácidos graxos, hidrocarbonetos e solventes clorados, como exemplo hexano, benzeno e clorofórmio (CHUNG *et al.*, 2007). A Tabela 1 mostra as suas propriedades físicas.

**Tabela 1: Propriedades físicas do glicerol (FONTE: SIDS, 2002)**

<b>Propriedades</b>	<b>Valor</b>
Forma Física	Líquido
Pureza	95- 99%
Densidade (20°C)	1,26 hg/m <sup>3</sup>
Viscosidade (20°C)	1410 mPa
Ponto de fusão	18 °C
Ponto de ebulição (1013 hPa)	290 °C
Ponto de inflamação	160 °C
Calor específico (25°C)	2,435 J/mol
Calor de evaporação (55°C)	88,12 J/mol
Condutividade térmica	0,28W/ (m.K)
Calor de formação	667,8 KJ/mol
Tensão superficial (20°C)	63,4 mN/m
pH (solução)	Neutro

Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas. O termo glicerol aplica-se somente ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol. O termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados, normalmente, contendo pelo menos 95% de glicerol. Glicerol bruto é a fase glicerinosa obtida após o processo de produção de biodiesel. A chamada glicerina loira é normalmente utilizada para designar a glicerina oriunda dos processos de produção do biodiesel onde a fase glicerinosa sofreu um tratamento ácido para neutralização do catalisador e 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).

### 2.2.2 Mercado

O volume de glicerol disponível aumentou significativamente nos últimos anos, principalmente, a partir de 2006. A produção mundial atual é de cerca de 2 bilhões de quilos, equivalendo a 1 bilhão de dólares (AYOUB *et al.*, 2012). As principais regiões produtoras de biodiesel e conseqüentemente de glicerol bruto são a União Européia, os Estados Unidos e os países do sudeste asiático (TIMILSINA *et al.*, 2011).

O gráfico apresentado na Figura 7 mostra a evolução da produção mundial de biodiesel em conjunto com a produção de glicerol bruto.

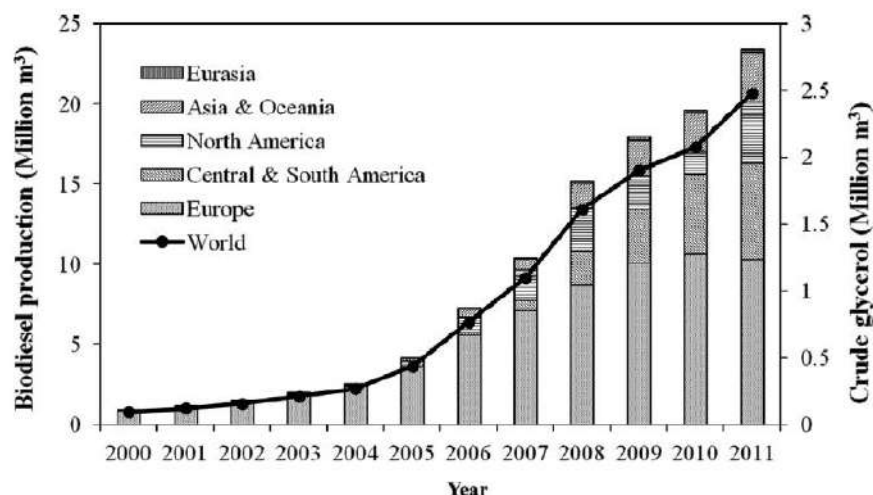


Figura 7: Evolução da produção mundial de biodiesel (em barras) e glicerol bruto (linha) (2000-2011)  
 FONTE: EIA, 2013

No Brasil, verifica-se uma situação similar. Com base nos dados da ANP (2014) é possível observar o potencial de produção anual de glicerina gerada pelas plantas de biodiesel. A Tabela 2 apresenta a evolução da produção de biodiesel no Brasil e conseqüentemente, o volume de glicerina estimado gerado no processo.

**Tabela 2: Evolução do volume de biodiesel produzido no Brasil e de glicerol bruto estimado**

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<b>Biodiesel produzido (m3)</b>	742	69.595	407.804	1.177.159	1.622.272	2.406.908	2.695.731	2.740.839	2.942.563
<b>Glicerol bruto gerado (t)</b>	74	6.960	40.780	117.716	162.227	240.691	269.573	274.084	294.256

Fonte: ANP 2014, estimativas feitas pelo próprio autor

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM), a demanda média de glicerina nos últimos anos tem sido de aproximadamente 40 mil toneladas/ano, sendo atendida por uma capacidade produtiva de 60 mil toneladas ano sem levar em consideração a produção gerada a partir do biodiesel. Para agravar este cenário, estima-se que no mundo cerca de 700 mil toneladas de glicerol por ano, já sejam considerados excedente de mercado (BIODIESELBR, 2008).

A falta de mercado interno para a glicerina resultante do processo de produção de biodiesel levou os produtores brasileiros a procurarem a exportação do produto. A Tabela 3 apresenta os dados de importação e exportação do glicerol bruto (NCM: 1520.00.10) nos anos de 2007 -2013. Os dados mostram que houve um grande aumento do volume exportado e uma queda nos preços na época da crise econômica global de 2009. O principal destino das exportações brasileiras do produto é a China. Em 2012, a China importou aproximadamente

152 mil toneladas de glicerol bruto, ou seja, 90% do total exportado pelo Brasil. Enquanto que em 2013 essa percentagem caiu para 83% do montante (MDIC, 2014).

**Tabela 3: Volumes e preços de importações e exportações de glicerol bruto**

	Importação			Exportação		
	US\$ FOB	Peso Líquido (t)	Preço médio/t.	US\$ FOB	Peso Líquido (t)	Preço médio/t.
<b>2007</b>	117.110	161	728,3	1.647.919	5.434	303,3
<b>2008</b>	159.903	113	1.411,3	11.873.424	33.863	350,6
<b>2009</b>	43.190	41	1.053,4	12.073.014	101.167	119,3
<b>2010</b>	10.303	1,5	7.008,8	22.811.547	141.484	161,2
<b>2011</b>	25.654	3	7.545,3	41.900.529	155.941	268,7
<b>2012</b>	19.927	2	10.487,9	46.181.448	168.712	273,7
<b>2013</b>	25936	3,4	7.628,2	63.450.126	177.942	356,6

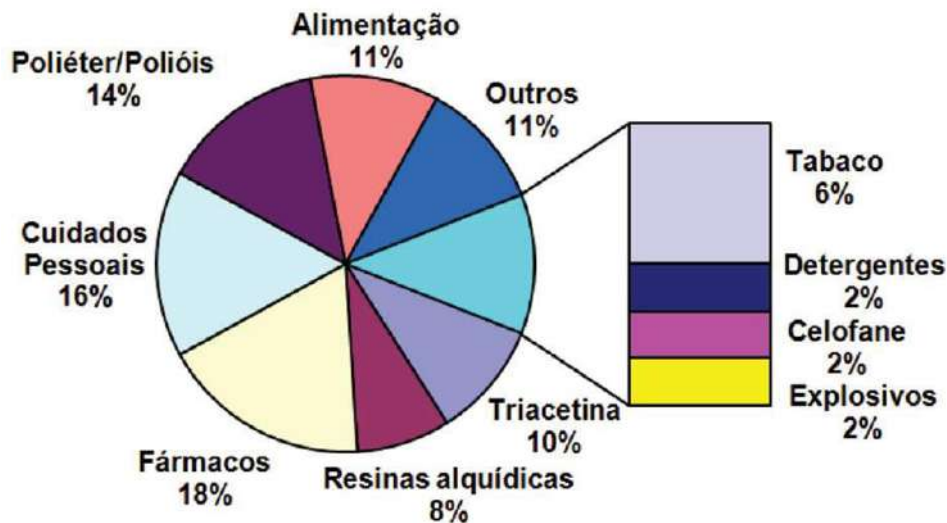
**FONTE: ALICEWEB, 2014. Elaboração feita pelo próprio autor.**

### 2.2.3 Aplicações

O atual mercado está saturado com glicerol bruto devido ao crescimento exponencial da produção biodiesel. Por isso, novas aplicações ao composto estão sendo consideradas principalmente pelos próprios produtores de biodiesel. O custo de converter e purificar o glicerol bruto a ser aplicado em alimentos, cosméticos e fármacos tende a ser alto (TSOBANAKIS, 2007 e BRADY *et al.*, 2008).

A indústria oleoquímica é grande fonte de destino de glicerol. O uso generalizado de glicerol em cosméticos, sabões, alimentos, tabaco, fármacos é representado na Figura 8. Os mercados de higiene pessoal e fármacos somam 24%, poliéter/polióis 14%, seguido pelo uso em alimentos com 11%. O restante é usado na fabricação de lacas, vernizes, tintas, adesivos, plásticos sintéticos, celulose regenerada, explosivos e outros usos industriais. Além disso, o glicerol tem sido cada vez mais utilizado como substituto do propilenoglicol (HAJEK e SKOPAL, 2010). O glicerol tornou-se um popular tema de pesquisa, e os pesquisadores estão interessados em descobrir novas alternativas de aplicações em combustíveis e na produção de determinados produtos químicos (GARCIA *et al.*, 2010).





**Figura 8: Mercados de aplicação da glicerina**  
 Fonte: Química Nova (2011)

O glicerol possui uma vasta gama de aplicações, desde a barras alimentares energéticas até xaropes e até mesmo revestimento para embarcações. Segundo relatório da DAS, o glicerol possui mais de 1500 aplicações. O glicerol bruto pode ser utilizado para estas aplicações somente após vários processos de purificação. Assim, o desenvolvimento de novos mercados para o glicerol bruto é essencial para o presente e mercados futuros. Igualmente importante, é o desenvolvimento de novos processos de refino sustentáveis como também o de plantas mais econômicas (YOU *et al.*, 2010).

Uma das formas de valorização do glicerol é sua bioconversão a produtos de interesse industrial, aonde tem sido utilizado com sucesso como uma única fonte de carbono para a produção de alguns produtos de maior valor agregado por várias bactérias, leveduras, fungos filamentosos e microalgas, sob condições aeróbicas e anaeróbicas. A substituição de uma fonte de carbono tradicional, como a glicose, para fontes menos onerosas tem um impacto positivo na economia do bioprocessamento. A redução do custo dos meios de crescimento com o mínimo de efeitos indesejáveis é fundamental para uma potencial aplicação industrial. Neste cenário, o glicerol bruto como um subproduto industrial disponível em grandes quantidades parece ser uma utilização ideal (DA SILVA *et al.*, 2009).

O glicerol é uma versátil fonte de carbono e energia com diversas aplicações em processos fermentativos. O glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel diverge do glicerol puro, principalmente no teor de sais, tais como: cálcio, potássio, magnésio, fósforo, enxofre, sódio e outros contaminantes como o metanol, o etanol e sabões, podendo ter efeitos positivos ou negativos dependendo do processo aplicado e do micro-organismo utilizado. O metanol, por exemplo, tem efeito negativo, inibindo o crescimento celular e com isso, reduzindo a produção

de alguns compostos tais como ácidos graxos poli-insaturados. Por essa razão, precisa ser eliminado do processo. Contaminações de etanol no glicerol podem ser benéficas, uma vez que estimulam o crescimento dos micro-organismos que dedicam à produção do composto de interesse. Dependendo da matéria-prima utilizada, o biodiesel obtido a partir de óleos vegetais gera glicerol rico em ácidos palmítico, oleico e linoleico. Alguns micro-organismos podem usar estes ácidos como fonte de carbono (ABAD *et al.*, 2012).

Diferentes produtos químicos também podem ser obtidos por bioprocessos a partir de glicerol. O propilenoglicol pode ser produzido por rota bioquímica conforme relatado por Wendisch *et al.* (2011). A literatura aponta que vários micro-organismos são produtores naturais de propilenoglicol como a bactéria *Escherichia coli*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Bacteroides ruminicola*, *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae*, e também algumas leveduras. A fermentação do glicerol por *Klebsiella sp.* também produz ácido acético, succínico e etanol (JOHNSON *et al.*, 2007). Ácido lático também pode ser obtido a partir de glicerol pela fermentação com *Escherichia coli* (FAN *et al.*, 2010). O hidrogênio pode ser obtido a partir de glicerol pelo processo de fotofermentação usando a bactéria *Rhodospseudomonas palustres*, obtendo-se conversão teórica de 75% (LEONETI *et al.*, 2012). De acordo com Dobson *et al.* (2012), glicerol bruto pode ser convertido a etanol por fermentação utilizando a bactéria *E. coli*. Considerando que a reação de transesterificação para a produção de biodiesel pode se dar com a utilização de etanol, esse álcool produzido pode retornar ao processo, contribuindo assim para a redução de custo na produção do biodiesel (MILLI *et al.*, 2011).

Outros micro-organismos têm sido estudados para a conversão de glicerol bruto gerado na fabricação de biodiesel para a produção de etanol. É o caso de *Enterobacter aerogenes* que, segundo Nwachukwu *et al.* (2012), apresentou um rendimento superior ao obtido pela bactéria *Escherichia coli*. O glicerol pode ser convertido em ácido succínico pelo micro-organismo *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Koutinas *et al.* (2007) também reportaram resultados positivos na obtenção de ácido succínico utilizando *Escherichia coli*. Assim como também por Koutinas *et al.* (2007) foi relatado o uso da levedura *Yarrowia lipolytica* na bioconversão de obtenção de ácido cítrico.

Atualmente a principal técnica de valorização biotecnológica de glicerol residual é sua biotransformação a 1, 3-propanodiol, um composto de grande importância para a indústria têxtil e química. Além do propanodiol, o glicerol também tem sido utilizado como substrato para produção por micro-organismos de outros metabólitos de importância industrial, tais como óleos por micro-organismos oleaginosos (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2009).

### 2.3 Lipídeo Intracelular

Óleos microbianos, comumente nomeados de *single cell oils* (SCO), são lipídeos intracelulares produzidos por micro-organismos oleaginosos. Estes, têm sido de grande interesse em potencial para muitos pesquisadores nas últimas décadas devido às suas funções significativas e características específicas. Tradicionalmente, os micro-organismos que incluem as bactérias, leveduras, fungos filamentosos e microalgas, e que podem acumular lipídeos em mais de 20% do seu peso seco são considerados micro-organismos oleaginosos (HUANG *et al.*, 2013).

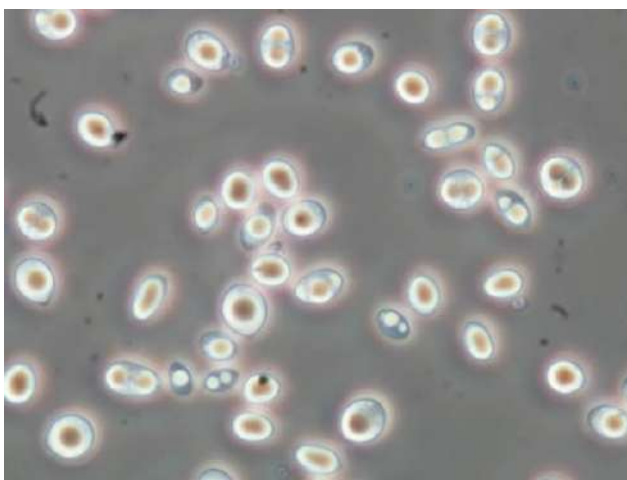
Em comparação com outros óleos vegetais, os óleos microbianos têm muitas vantagens, tais como um cultivo com ciclo de vida curto, menos trabalho requerido para sua obtenção, são menos afetados pelo local, clima, e seu micro-organismo produtor possui rápido crescimento. Com a rápida expansão do biodiesel, a produção de lipídeo intracelular pode se tornar uma das matérias-primas com potencial para produção de biodiesel no futuro, embora muitos estudos ainda precisem ser realizados (LI *et al.*, 2008).

A ocorrência de lipídeos, como compostos de reserva, é difundida entre vários organismos, como em fungos, plantas e animais, e bactérias. A capacidade de acúmulo de lipídeos é determinada pela constituição genética, sendo que os teores máximos de lipídeos atingíveis podem variar enormemente entre espécies e até entre cepas individuais. De acordo com diferentes micro-organismos e condições de cultura (tais como temperatura, pH, tempo de cultura, etc), o conteúdo e a composição do óleo são variáveis (ROSSI *et al.*, 2011).

Os lipídeos microbianos são compostos principalmente de triacilgliceróis (TAGs), mas também podem ser encontrados ácidos graxos livres, outros lipídeos neutros (tais como monoacilgliceróis, diacilgliceróis), esteróis e frações polares (por exemplo, fosfolipídeos, esfingolipídeos, glicolipídeos) (FAKAS *et al.*, 2009).

Uma alternativa para destino e valorização de coprodutos e resíduos industriais é a conversão desses substratos em lipídeo intracelular. Bialy, Gomaa e Azab (2011) utilizaram resíduo de óleo de fritura de produtos cárneos e vegetais para crescimento de leveduras e produção de ácidos graxos. Huang *et al.* (2009) utilizaram o hidrolisado da palha de arroz para a produção de lipídeos por *Trichosporon fermentans*. Angerbauer *et al.* (2008) pesquisaram o potencial da produção de lipídeo intracelular por *Lipomyces starkeyi* crescendo em lodo de esgoto em diferentes condições. Já Papanikolau e Anggelis (2002) estudaram o crescimento e a produção de material graxo por *Yarrowia lipolytica*.

Algumas linhagens de *Cryptococcus* já são reconhecidas como boas produtoras de lipídeos, destacando-se *C. curvatus* (Figura 9) que vem sendo amplamente estudada em fermentações utilizando diferentes substratos, como hidrolisado e bagaço de sorgo (LIANG *et al.*, 2012), hidrolisado de palha de trigo (YU *et al.*, 2011), glicose (ZHANG *et al.*, 2011), ácidos graxos voláteis derivados da produção de hidrogênio por bactérias (CHI *et al.*, 2011) e glicerol bruto (THIRU; SANKH; RANGASWAMY, 2011). *C. albidus* também foi avaliada quanto ao acúmulo de lipídeos utilizando ácidos graxos voláteis como fonte de carbono (FEI *et al.*, 2011)



**Figura 9: Acúmulo de lipídeo intracelular pela levedura *Cryptococcus curvatus***  
Fonte: Karlsruhe Institute of Technology (KIT)

Lipídeos intracelulares podem contribuir para suprir a demanda por óleos e gorduras, em geral, sua estrutura e composição são similares àsquelas de óleos vegetais comuns (PAPANIKOLAU e AGGELIS, 2002).

#### 2.4 Síntese de lipídeos intracelulares em leveduras

O acúmulo de lipídeos depende primeiramente da fisiologia do micro-organismo, limitação de nutrientes e condições ambientais, assim como temperatura e pH. Também pode ser afetada pela produção de metabólitos secundários, bem como citrato e etanol (BEOPOULOS *et al.*, 2009).

A formação de lipídeos começa durante a fase exponencial tardia e continua durante a fase estacionária (RASCHKE e KNORR, 2009). O mesmo se inicia quando um elemento do meio torna-se limitante e a fonte de carbono está presente em excesso. Muitos elementos podem induzir acúmulo de lipídeos. A limitação de nitrogênio é geralmente utilizada nos estudos de acumulação de lipídeos em micro-organismos, sendo a condição mais fácil de controlar e é

geralmente o tipo mais eficiente de limitação para induzir a acumulação de lipídeos em micro-organismos (RYWINSKA *et al.*, 2012).

Leveduras sob limitação de nutrientes passam por três fases de crescimento: a primeira é a fase de proliferação celular (fase exponencial de crescimento), então o crescimento é reduzido quando os nutrientes tornam-se limitantes e as células começam a produzir lipídeos, e, finalmente, células entram na fase estacionária onde o acúmulo de lipídeos continua (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Durante o processo de crescimento microbiano, o fenômeno dominante que define a composição do lipídeo intracelular é, em primeiro passo, o processo específico de incorporação do ácido graxo dentro das células microbianas e, em segundo, as mudanças endocelulares dos ácidos graxos, definida pela capacidade enzimática do micro-organismo. Os ácidos graxos também serão degradados por necessidade de crescimento ou como substrato dos processos de biosíntese, levando à mudança de concentração e produção de “novos” ácidos graxos, os quais não existiam previamente no substrato (AGGELIS *et al.*, 1995).

O acúmulo de lipídeos pode ocorrer em duas vias metabólicas diferentes: (1) síntese de lipídeos ‘de novo’ envolvendo a produção, em condições definidas, de ácidos graxos precursores, como acetil e malonil-CoA e sua integração dentro da via biossintética de estoque de lipídeos onde o graxo acil-CoA, que se reúnem para formar triacilgliceróis (TAGs) e esteril ésteres (EE). Os lipídeos neutros são armazenados dentro de corpúsculos lipídicos (CL) para servir como reserva de energia. (2) síntese de lipídeos ‘ex novo’ via metabólica envolvendo a quebra de ácidos graxos, óleos e triglicerídeos a partir de meio de cultura e seu acúmulo em uma formação alterada ou modificada dentro da célula. Esta via requer hidrólise de substrato hidrofóbico e incorporação/transporte de ácidos graxos na forma de tioésteres-CoA dentro da célula, os quais alimentam as vias de estoque de lipídeos dentro dos corpúsculos lipídicos (CL), para acumular lipídeos neutros (BEOPOULOS *et al.*, 2009; BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

## 2.5 *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* é um micro-organismo estritamente aeróbio, eucariótico, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos, anteriormente conhecida como *Candida lipolytica*. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica*. Esta levedura pode ser isolada de substratos ricos em proteínas e lipídeos, como produtos das

indústrias de laticínios, de shoyu, produtos de saladas que contêm carne ou camarão (BARTH E GAILLARDIN, 1997), queijos ou salsichas, lingüiças e chouriços (FICKERS *et al.*, 2005) e também em produtos avícolas crus (ISMAIL *et al.*, 2001). *Yarrowia lipolytica* é uma das espécies predominantes em queijos *Camembert* e *blue-veined*. Seu crescimento nestes substratos está relacionado com as suas atividades extracelulares proteolíticas e lipolíticas e com a sua capacidade de crescer nas temperaturas de 5-10°C. Algumas cepas também têm sido isoladas de solos, água de esgoto e outros ambientes poluídos (como a Baía de Guanabara (RJ)) (FICKERS *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2000).

Um grupo designado de leveduras “não-convencionais” foi adotado para diferenciar as leveduras pertencentes a este grupo das leveduras mais comumente utilizadas como, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, que são, portanto, consideradas leveduras “convencionais”. Estes dois grupos se diferenciam em relação à fisiologia, genética, biologia molecular e aplicação biotecnológica. A levedura *Yarrowia lipolytica* é a espécie mais estudada do grupo das leveduras “não-convencionais” principalmente por não apresentar patogenicidade e proporcionar diversos produtos de interesse industrial (BARTH E GAILLARDIN, 1997; FICKERS *et al.*, 2005). A Tabela 4 apresenta os produtos que a levedura é capaz de sintetizar na presença de glicerol como fonte de carbono:

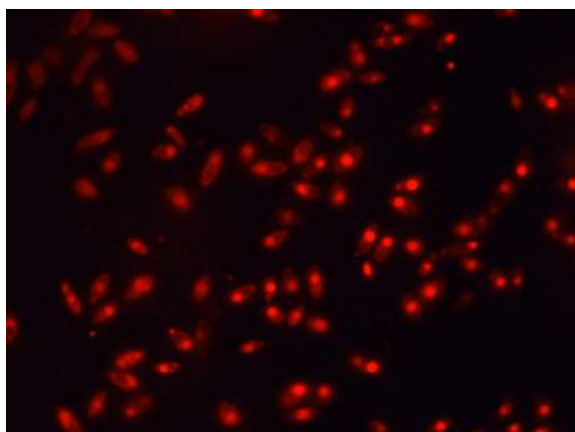
**Tabela 4: Estudos realizados de produção de metabólitos por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol com fonte de carbono. (FONTE: RYWINSKA, 2013)**

<b>Substrato</b>	<b>Produto</b>	<b>Referência</b>
Glicerol Puro	Ácido alfa-cetoglutarico	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)	

Em relação à produção de lipídeos pela levedura, em alguns casos, em vez de acumular lipídeos ou simultaneamente a isso, *Yarrowia lipolytica* também pode secretar ácido cítrico para

o meio de cultura. É interessante notar que muitas publicações confirmaram que o aumento da produção de ácido cítrico por cepas da levedura ocorre apenas em meios limitados em nitrogênio nos quais o pH é superior a 4,5 (RYWINSKA, 2013).

Linhagens de *Y. lipolytica* são consideradas como agentes promissores na produção de óleo intracelular. Papanikolau *et al.* (2002) investigaram a influência das condições de cultivo, sobre o crescimento e a produção de lipídeos pela levedura usando como substrato um derivado da gordura animal industrial, composto por ácidos graxos saturados livres. *Yarrowia lipolytica* exibiu expressivo crescimento e produção de reservas lipídicas, na presença de gorduras saturadas. A Figura 10 mostra o acúmulo de lipídeo intracelular pela levedura.



**Figura 10: Fluorescência do acúmulo de lipídeo intracelular em *Yarrowia lipolytica***  
Fonte: elaboração do próprio autor

Sob condições limitadas de nitrogênio em meio utilizando glicerol, os lipídeos da levedura *Yarrowia lipolytica* são representados principalmente por ácidos oléico, linoléico, palmítico e ácido palmitoléico (MAKRI *et al.*, 2010).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais

O meio de cultivo YPD, cuja composição é apresentada na Tabela 5, foi utilizado para preservação e proliferação celular.

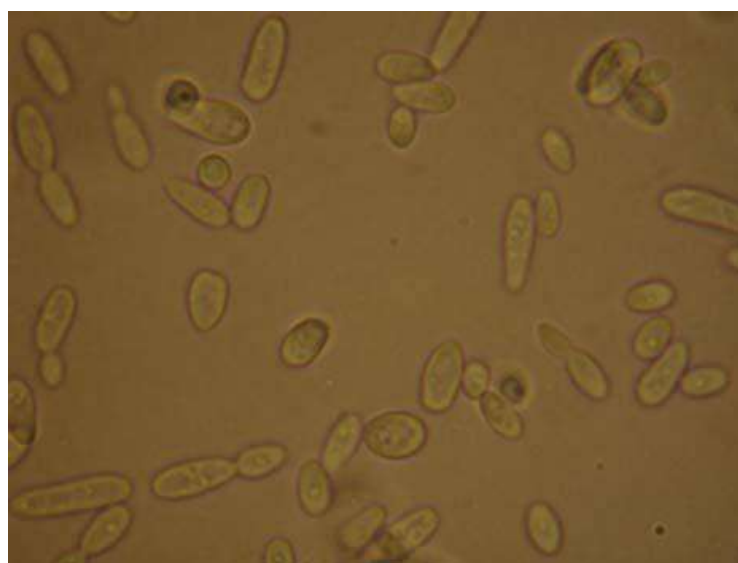
**Tabela 5 – Composição do meio de cultivo YPD**

Meio YPD*	Composição (g/L)
Extrato de lêvedo (Vetec)	10
Peptona (Merck)	20
Glicose (Isifar)	20

\*YPD: “*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*”

#### 3.2 Micro-organismo

A levedura utilizada neste trabalho foi uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 IMUFRJ 50682 (Figura 11) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAEGLER e MENDONÇA-HAEGLER,1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.



**Figura 11: Morfologia microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 1000x) Fonte: FONTES (2008)**



### 3.3 Preservação

As células foram conservadas a 4°C após 48 horas de crescimento em tubos de ensaio inclinados com meio YPD – agar (“*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*”) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e Agar-agar 3%

### 3.4 Pré-inóculo

Para proliferação das células, a partir dos tubos contendo as células preservadas em gelose inclinada, estas foram transferidas, de forma estéril, com uma alça de platina para Erlenmeyers de 500 mL. Os frascos continham 200 mL de meio de cultivo YPD (cuja composição descrita no item 3.1), e foram agitados a 160 rpm a 28° C por 72 horas em agitador rotatório (*shaker*). A absorvância (570 nm) de uma amostra deste cultivo era determinada e, em seguida as células eram centrifugadas de forma estéril a 3.000 g por 10 minutos. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente,  $1,0 \pm 0,1$  mg p.s. cel/mL a ser utilizada para inocular o meio de produção de óleo intracelular.

### 3.5 Estudo das varáveis que influenciam no processo de produção de lipídeo intracelular

A produção de lipídeo intracelular foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio de produção em *shaker* sob agitação de 250 rpm a 28° C por 54 horas.

Inicialmente, a produção de lipídeo intracelular foi realizada em meio mineral tamponado (PAPANIKOLAU et al, 2002), como mostra a Tabela 6.

**Tabela 6 - Composição do meio mineral do meio de produção**

<b>Meio Mineral</b>	<b>Composição (g/L)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,20
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,15
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,06
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02

As concentrações de extrato de lêvedo (fonte de nitrogênio e vitaminas), sulfato de amônia (fonte de nitrogênio), peptona (fonte de nitrogênio) e glicerol puro e bruto (fonte de carbono) utilizadas no meio de produção, foram avaliadas em um planejamento experimental.

O glicerol bruto (glicerina loira residual) utilizado, gentilmente fornecido pelo CENPES/PETROBRAS, é proveniente de uma planta piloto de produção de biodiesel a partir de uma transesterificação alcalina (KOH) de óleo de soja com metanol e apresenta pureza de 82%.

### 3.5.1 Planejamento experimental

Para selecionar a melhor composição do meio de cultivo para a produção de lipídeo intracelular foi aplicado o método do planejamento fatorial fracionado em dois níveis,  $2^{k-1}$ , com  $k$  (numero de fatores) = 4, utilizando o programa de computação de estatística, *Statística* versão 7.0 para análise dos resultados. Os fatores fixados e adotados como variáveis independentes foram a concentração de glicerol PA, a concentração de extrato de lêvedo, a concentração de peptona e a concentração de sulfato de amônio. A Tabela 7 apresenta os limites de cada parâmetro avaliado.

**Tabela 7 - Fatores e níveis do planejamento experimental  $2^{k-1}$**

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Glicerol PA (g/L)	50	100	150
Extrato de lêvedo (g/L)	0,1	1,3	2,5
Peptona (g/L)	0	1,0	2,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	0	0,5	1,0

Os experimentos foram realizados em erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de produção durante 54 horas à 28°C em incubador rotatório (*shaker*) sob agitação de 250 rpm. A concentração inicial de células foi 1,0 g/L. A Tabela 8 mostra os experimentos realizados no planejamento experimental. Em todos os experimentos realizados para produção de lipídeo intracelular foram realizadas duas amostragens por dia durante três dias de cultivo. O procedimento consistia em retirar duas amostras do meio de produção: uma para determinação da concentração celular, e outra para análise de índice lipídico por fluorimetria.

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de densidade óptica a 570 nm e esses valores foram convertidos para mg p.s. cél/ mL utilizando-se o fator de conversão obtido por curvas de peso seco.

**Tabela 8 - Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0**

Ensaio	Glicerol PA (g/L)	Extrato de levedo (g/L)	Peptona (g/L)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)
1	50	0,1	0	0
2	150	0,1	0	1,0
3	50	2,5	0	1,0
4	150	2,5	0	0
5	50	0,1	2,0	1,0
6	150	0,1	2,0	0
7	50	2,5	2,0	0
8	150	2,5	2,0	1,0
9	100	1,3	1,0	0,5
10	100	1,3	1,0	0,5
11	100	1,3	1,0	0,5

### 3.6 Análise do Índice de Corpúsculo Lipídico

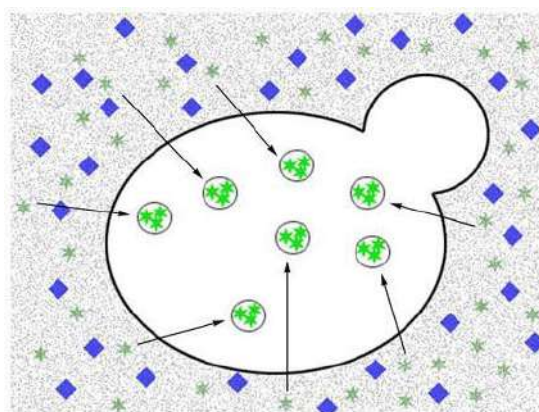
Para quantificar a intensidade de lipídeos intracelulares presente nas leveduras, estas foram fixadas utilizando formaldeído para posterior utilização do método fluorimétrico de MORAIS *et al.* (2010) empregando o corante lipofílico fluorescente BODIPY® (4,4-difluoro-3a,4a,-diaz-s-indaceno).

#### 3.6.1 Fixação das células

As amostras retiradas do cultivo foram fixadas adicionando 1/9 do volume de formaldeído e incubadas por 15 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, e então lavadas com água destilada com posterior centrifugação. As células foram novamente suspensas em água destilada e a densidade óptica a 600 nm (D.O.<sub>600 nm</sub>) ajustada para 5 D.O.<sub>600 nm</sub>/mL.

### 3.6.2 Determinação do Índice de Corpúsculo Lipídico (ICL)

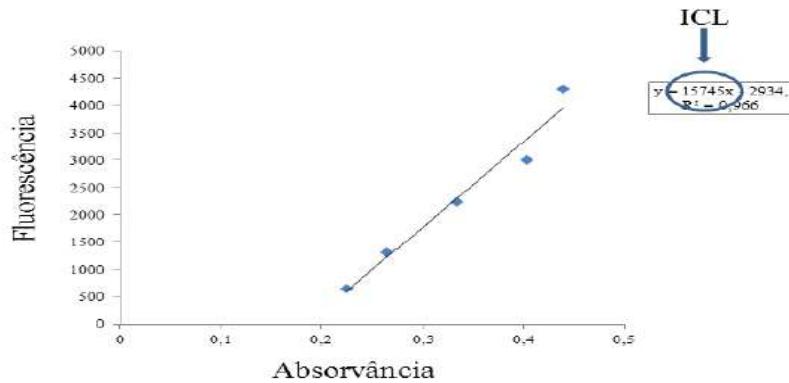
O teor do corpúsculo lipídico (CL) foi determinado pela recuperação da fluorescência neutralizada do BODIPY após a adição das células fixadas. A neutralização é realizada para preservar a fluorescência da sonda e permitir que a emissão detectada seja apenas das sondas que estejam ligadas aos corpúsculos lipídicos. Isso é feito utilizando um neutralizador hidrofílico que impede a emissão de fluorescência do BODIPY quando o mesmo está presente em solução, permitindo que a emissão ocorra apenas quando o fluoróforo está localizado no interior do corpúsculo lipídico (Figura 12). O neutralizador utilizado foi o iodeto de potássio (KI).



**Figura 12: Representação da recuperação de fluorescência. A fluorescência do BODIPY é inibida em solução pelo KI e recuperada quando as células são adicionadas. O BODIPY se junta ao corpúsculo lipídico no interior da célula, no qual o inibidor é excluído (MORAIS *et al.*, 2010).**

Em uma placa de poliestireno de 96 poços preta de fundo transparente (Costar) foram adicionados 200  $\mu$ l de uma solução contendo *Bodipy* 5  $\mu$ M e KI 500 mM. No fluorímetro configurações foram ajustadas para que o equipamento realizasse o procedimento em 480 nm de excitação, 510 nm de emissão e corte de filtro à 495 nm. À cada leitura de fluorescência realizou-se concomitantemente a determinação da concentração de células determinada pela D.O.<sub>600nm</sub>. Cada amostra foi lida quatro vezes à subsequente adição da alíquota de 5  $\mu$ L da suspensão de células fixadas em formaldeído. Leituras do branco foram realizadas antes da adição de células.

A qualidade dos dados foi analisada através da avaliação da linearidade das medições em comparação com a concentração de células. A partir desta curva, o coeficiente angular da curva de fluorescência por concentração de células foi determinado e denotado o índice de corpúsculo lipídico (ICL) exemplo demonstrado pela Figura 13. Se  $R^2 < 0,9$ , os dados eram descartados.



**Figura 13: Exemplificação de obtenção do ICL a partir do coeficiente angular da curva de fluorescência versus absorvância (FONTE: LOPES, 2014)**

### 3.7 Estudo da extração do lipídeo intracelular

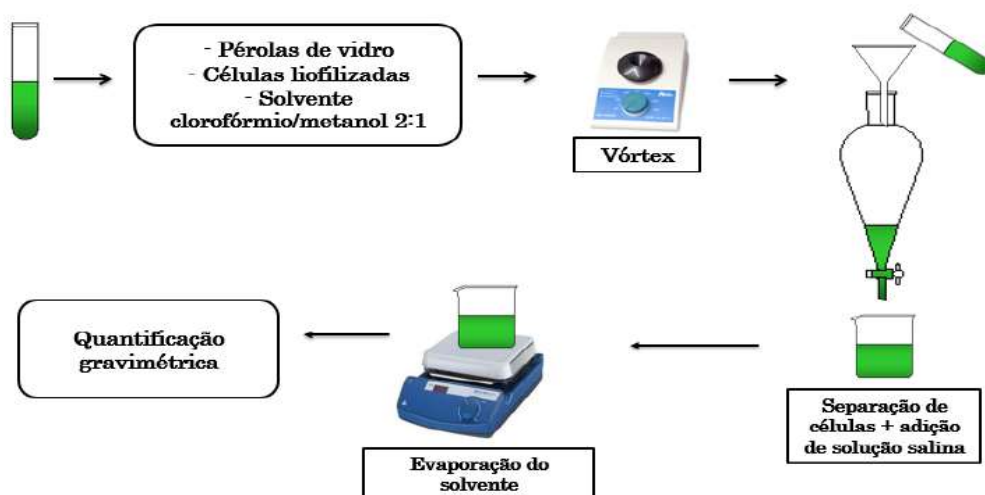
#### 3.7.1 Estudo do tratamento das células antes da extração

A partir de uma amostra de 1,0 g de células cultivadas em meio YPD, analisaram-se três procedimentos de tratamento das células para realizar a extração dos lipídeos:

- 1) Centrifugação (3000 g) da amostra, descarte do meio de cultivo, banho-maria por 30 minutos, congelamento à  $-50^{\circ}\text{C}$  e liofilização.
- 2) Centrifugação (3000 g) da amostra, descarte do meio de cultivo e secagem em estufa à  $90^{\circ}\text{C}$ .
- 3) Centrifugação (3000 g) da amostra, descarte do meio de cultivo, congelamento a  $-50^{\circ}\text{C}$  e liofilização.

#### 3.7.2 Extração dos lipídeos

Após o tratamento das células descrito anteriormente, foi realizado o seguinte procedimento, apresentado também na Figura 14.



**Figura 14: Representação esquemática do processo de extração de lipídeos**  
**Fonte: elaboração do próprio autor**

1) Rompimento da parede celular: Tubo de ensaio contendo 1g de células, 20 g de pérolas de vidro e 20 mL da mistura de Clorofórmio e Metanol 2:1 segundo Folch *et al.* (1957) foi submetido à agitação intensa em vortex por três minutos.

2) Filtração para a retirada de resíduos celulares;

3) Adição de solução salina 0,9% p/v para separação de fases;

4) Evaporação do solvente;

5) Pesagem gravimétrica;

6) Quantificação gravimétrica: O percentual lipídico foi calculado conforme a seguinte equação:

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

onde: PL – percentual lipídico

Ml= massa de lipídeos obtida na pesagem gravimétrica

Mc = massa de células secas utilizada na extração

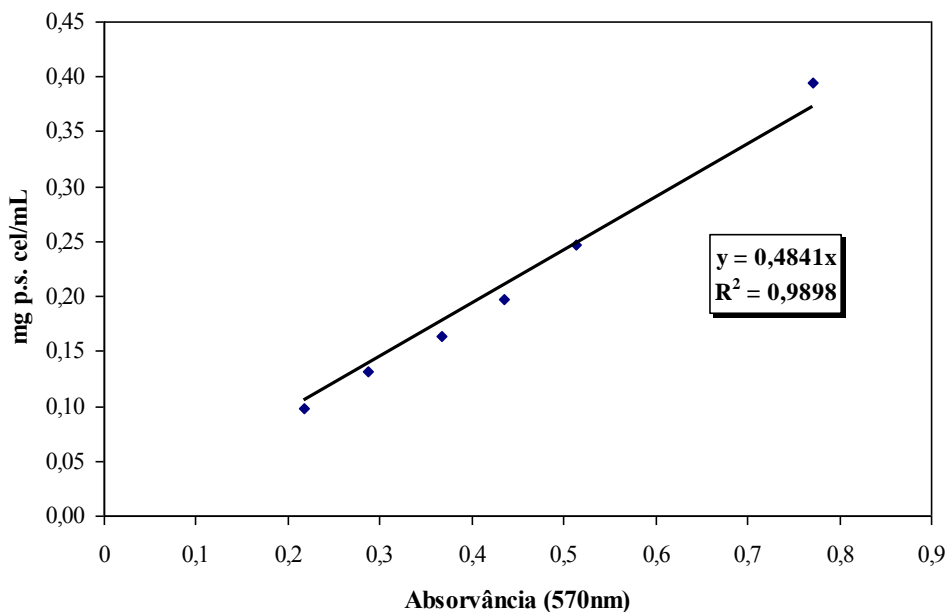
### 3.7.3 Otimização da extração de lipídeos

A partir da melhor condição de cultivo para o acúmulo de óleo intracelular foram avaliadas as influências dos parâmetros da extração como quantidade de pérolas de vidro, volume de solvente adicionado, adição da solução salina e número de repetições do processamento.

### 3.8 Métodos Analíticos

#### 3.8.1 Quantificação celular

A concentração celular foi acompanhada através de medidas de densidade ótica em espectrofotômetro *Shimadzu* à 570 nm e esses valores foram convertidos para mg de massa seca de células/mL usando-se o fator de conversão previamente determinado através da realização da curva de peso seco, que é apresentada na Figura 15. A curva de peso seco *versus* absorvância é obtida usando-se uma suspensão de células em solução 0,9% p/v de NaCl. Desta suspensão retira-se uma amostra de 2 mL que é filtrada em membrana Milipore 0,45  $\mu$ m. Posteriormente, seca-se a membrana através de fonte luminosa de infravermelho, até a mesma atingir peso constante. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas e, então, o valor de absorvância para cada concentração é obtida em espectrofotômetro a 570 nm.



**Figura 15 - Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro. Fonte: MARTINS, 2011**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo das variáveis que influenciam no processo de produção de lipídeo intracelular

Para identificar a presença de corpúsculos lipídicos no interior das células de *Y. lipolytica* foi utilizado um método de fluorimetria através da adição de um fluorocromo (BODIPY), que se adere às partículas lipídicas, na amostra contendo as células a serem analisadas. A fluorescência é medida em concentrações celulares crescentes da mesma amostra em quantidade constante de BODIPY. Como quanto maior a concentração de células, maior é a fluorescência, a inclinação da curva de fluorescência *versus* a concentração de células, resulta no Índice de Corpúsculo Lipídico (ICL). Quanto maior o ICL, maior é a quantidade de lipídios no interior da célula. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 9: Resultados dos ICLs máximos obtidos a partir do planejamento experimental**

Ensaio	Glicerol PA (g/L)	Extrato de lêvedo (g/L)	Peptona (g/L)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	ICLmáx*	ICL/tempo
1	50	0,1	0	0	4621,9	85,6
2	150	0,1	0	1,0	1945,9	36,0
3	50	2,5	0	1,0	1900,0	79,2
4	150	2,5	0	0	3061,9	510,3
5	50	0,1	2,0	1,0	3893,1	81,1
6	150	0,1	2,0	0	3061,2	102,0
7	50	2,5	2,0	0	1698,9	70,8
8	150	2,5	2,0	1,0	2196,0	45,7
9	100	1,3	1,0	0,5	1883,9	39,2
10	100	1,3	1,0	0,5	2409,8	44,6
11	100	1,3	1,0	0,5	2492,6	44,2

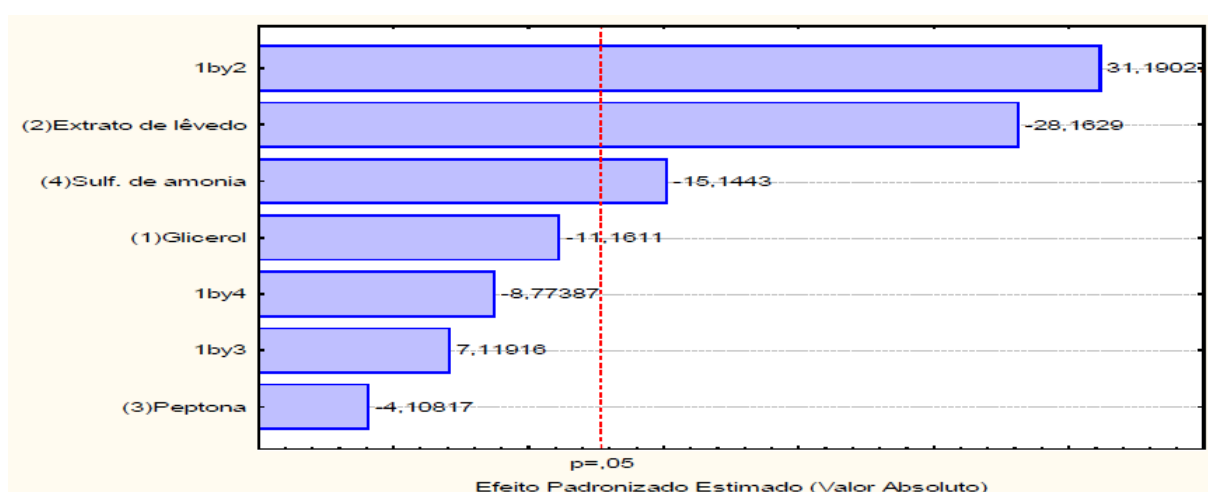
\*ICLmax: máximo de Índice de Corpúsculo Lipídico encontrado para uma cinética de 54 horas

É possível identificar na Tabela 9 que maiores ICLs foram encontrados nos ensaios 1, 4, 5 e 6. Os ensaios 1 e 5, que foram realizados com menor concentração de glicerol e extrato de lêvedo, apresentaram os maiores valores de ICL. A diferença entre eles é a presença de sulfato de amônio e peptona no ensaio 5. O ensaio 4 apresentou a maior produtividade



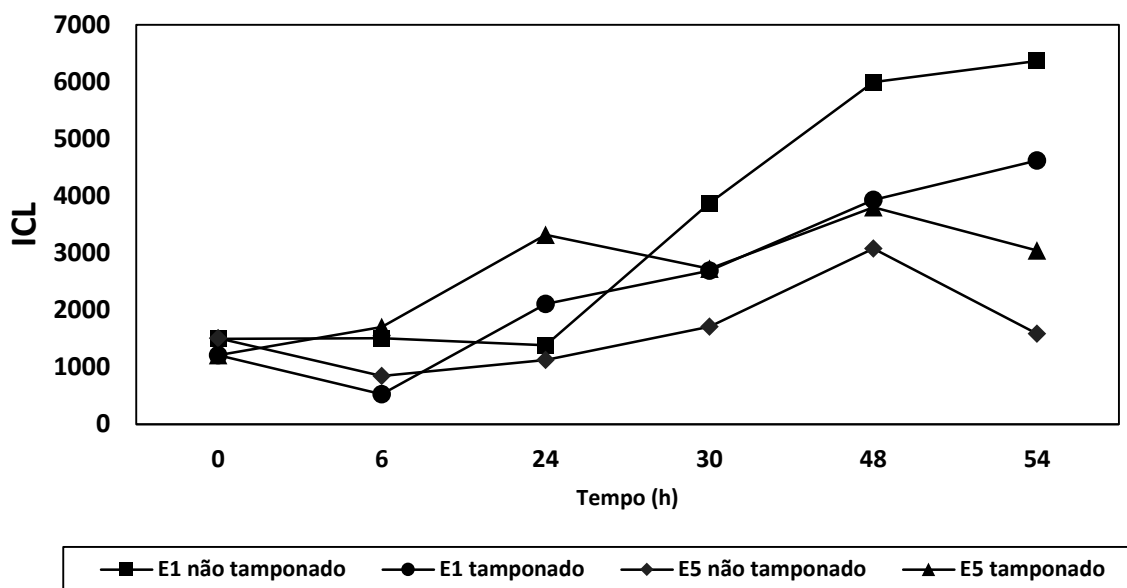
(ICL/tempo), em um meio contendo as maiores quantidades de glicerol e extrato de lêvedo. Como inicialmente o objetivo é produzir uma célula com maior conteúdo lipídico os ensaios 1 e 5 foram considerados os melhores.

A Figura 16 apresenta o gráfico de pareto que indica que o extrato de lêvedo e o sulfato de amônia foram as variáveis que tiveram efeito estatisticamente significativo (considerando 95 % de confiança) sobre o ICL, ambas com efeito negativo. A interação entre o glicerol e o extrato de lêvedo também apresentou efeito significativo. Isso significa que o extrato de lêvedo e o sulfato de amônia devem ser utilizados em baixa concentração e, reduzindo-se o extrato de lêvedo, a concentração de glicerol deve ser reduzida também.



**Figura 16- Diagrama de Pareto gerado pelo software *Statistica 7.0* para analisar máximo  ndice de corpúsculo lipídico com diferentes variáveis que influenciam na produção de lipídeo intracelular.**

Com base nesses resultados, optou-se por utilizar as condições dos melhores ensaios (E1 e E5) e testar um meio não tamponado. A utilização do meio tamponado foi sugerida por Papanikolaou *et al.* (2002) devido a maior obtenção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica*. No entanto, como o objetivo não é produzir este ácido, optou-se por testar um meio sem o tamponamento, reduzindo, assim, o custo de produção. As análises foram também realizadas por fluorimetria. A Figura 17 apresenta os perfis de ICL para esses experimentos.



**Figura 17 – Cinética do índice de corpúsculo lipídico dos experimentos do planejamento experimental em meio tamponado e não tamponado.**

Conforme mostra a Figura 17, o não tamponamento do meio foi benéfico apenas para o Ensaio 1. É possível que na presença de peptona (Ensaio 5) a formação de amônia pelo metabolismo possa aumentar muito o pH do meio, prejudicando a produção de lipídeos e, portanto, esse ensaio tenha sido beneficiado pelo tamponamento. O Ensaio 1 não apresenta essa fonte de nitrogênio, portanto, a presença dos sais em maior quantidade pode ter prejudicado o acúmulo de óleo intracelular. Como o Ensaio 1 em meio não tamponado tem o maior valor de ICL e menor gasto de reagentes, esse foi considerado o melhor para produção de lipídeo intracelular. Com esta definição de melhor meio de acúmulo de lipídeo intracelular foi realizada a substituição do glicerol puro pelo glicerol bruto como fonte de carbono no meio de produção. As análises fluorimetria foram realizadas e a Figura 18 apresenta o comportamento obtido.

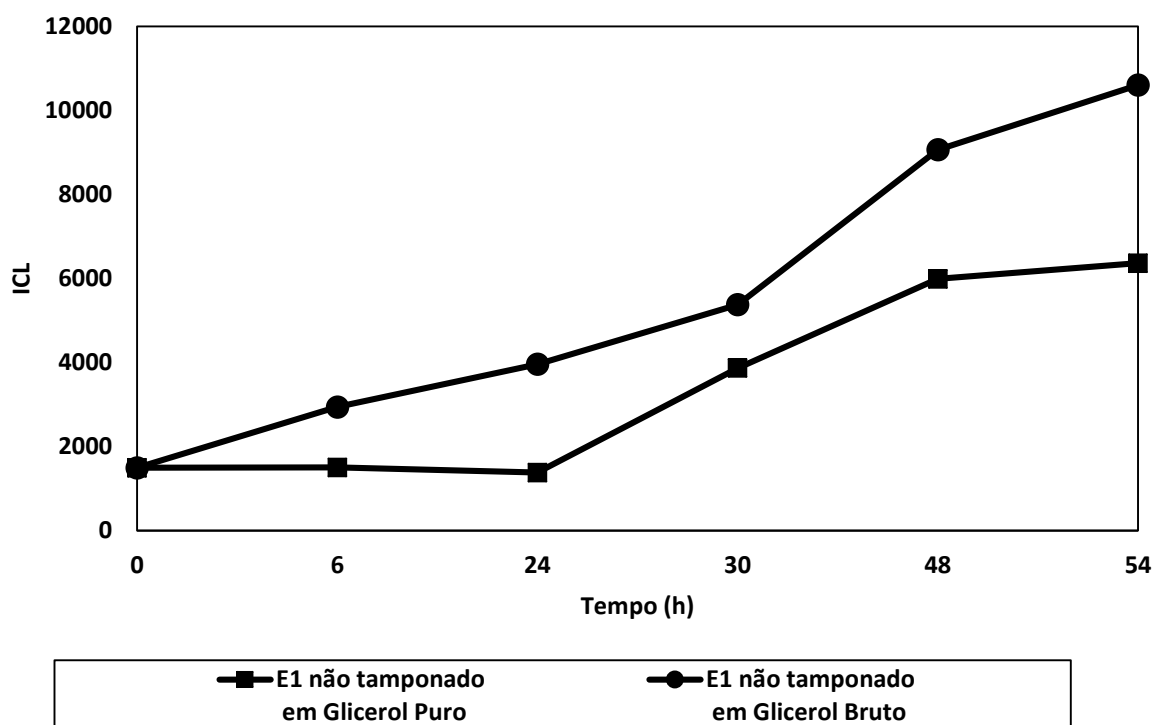


Figura 18 – Cinética do índice de corpúsculo lipídico dos experimentos contendo glicerol puro e bruto.

Segundo BEOPOULOS *et al.* (2009), a transição do crescimento celular para o acúmulo de lipídios geralmente ocorre quando o excesso de carbono no meio está associado a uma limitação de nutrientes. Nestas condições, a levedura *Y. lipolytica* produz grandes quantidades de metabólitos secundários como o ácido cítrico, isocítrico, ácido 2-cetoglutarico e ácido pirúvico e também pode converter o carbono em triacilglicerol. Dependendo da relação carbono/nitrogênio (C/N), diferentes caminhos metabólicos podem ser observados. O primeiro corresponde à máxima taxa de crescimento com o consumo das fontes em concentrações ótimas de carbono e nitrogênio. Isto resulta numa produção máxima de biomassa. O segundo corresponde a um excesso de carbono no meio, o qual tem uma elevada relação C/N, resultando numa diminuição na produção de biomassa e altos níveis de produção de lipídeos. E o terceiro é resultado de uma relação C/N ainda maior, levando à diminuição do acúmulo de lipídios a favor da produção de metabólitos secundários. Conforme a Figura 22 demonstra, o glicerol bruto proporcionou o um aumento do acúmulo de lipídeo intracelular superior ao glicerol puro como fonte de carbono. O que pode indicar que houve uma possível menor produção de metabólitos secundários devido a uma relação C/N elevada que propicia o acúmulo e/ou devido aos outros compostos contidos no glicerol bruto.

## 4.2 Estudo da extração do óleo intracelular

### 4.2.1 Pré-Tratamento das Células

Foram realizados diferentes procedimentos de tratamento das células, seguido do processo tradicional de extração (descrito na seção de materiais e métodos) com o objetivo de preservar o acúmulo de óleo no interior das células. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9: Percentuais lipídicos obtidos para cada diferente pré-tratamento das células**

<b>Pré-tratamento das células</b>	<b>Percentual Lipídico (%)*</b>
Células centrifugadas, imersas em banho-maria, congeladas a -50°C e liofilizadas	0,81
Células centrifugadas e secas em estufa à 90°C	1,65
Células centrifugadas, congeladas à -50°C e liofilizadas	1,81

\*: Percentual lipídico calculado com a massa de lipídeo por 100 g de células secas.

Como observado na Tabela 9, o tratamento das células com centrifugação, congelamento e posteriormente liofilização, mostrou ser o melhor para a preservação do acúmulo de lipídeo intracelular possibilitando o maior rendimento no processamento da extração.

### 4.2.2 Avaliação de parâmetros da extração dos lipídeos

Para o estudo da extração dos lipídeos as células cultivadas por 54 horas em meio mineral tamponado com 50 g/L de glicerol puro e 0,1 g/L de extrato de lêvedo (Ensaio 1), foram centrifugadas, congeladas a -50° C e liofilizadas foram submetidas ao processo de extração, variando-se alguns parâmetros como mostra a Tabela 10.

**Tabela 10: Percentuais lipídicos obtidos da variação de parâmetros no processo de extração**

<b>Amostras</b>	<b>Pérolas (g)</b>	<b>Solvente (mL)</b>	<b>Solução salina (mL)</b>	<b>Repetições da extração<sup>a</sup></b>	<b>Percentual Lipídico (%)</b>
I	20	20	20	3	3,01
II	20	40	20	3	3,03
III	10	20	0	3	11,12
IV	10	20	0	5	14,48

<sup>a</sup> Quantas vezes esse volume de solvente foi adicionada à mistura células tratadas/pérola de vidro para exaustão da extração.

É possível observar na Tabela 10 que aumentando a quantidade de solvente (comparando as amostras I e II) não houve melhora no percentual de extração. Comparando as amostras I e

III, é possível identificar que reduzindo a proporção de perolas para células e retirando a solução salina, houve uma melhora de 8% na extração. Além disso, aumentando o número de repetições da extração, um aumento de 3% na extração foi atingido (amostras III e IV).

## 5 PROJETO DE PLANTA

De acordo com os experimentos realizados e os resultados obtidos neste trabalho que demonstram um grande potencial da produção e posterior aplicação de lipídeo intracelular, neste capítulo é apresentado uma proposta e simulação de um projeto de planta para obtenção do composto de interesse.

O micro-organismo para esse processo é uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* obtida do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Para estocagem é utilizado o meio YPD. Esse meio é composto por 20g/L de glicose, 10g/L de extrato de lêvedo, 20g/L de peptona e 30g/L de ágar. A cultura deve ser armazenada à 4°C.

Para reativação do inóculo neste trabalho, utiliza-se o mesmo meio YPD, porém sem a presença do ágar. A reativação e a propagação das células devem ser realizadas a 28°C por 72h. Porém, para proposta de planta, é sugerido o uso do próprio glicerol bruto como fonte de carbono, de acordo com Lopes (2014), cuja composição é de 20,8g/L de glicerol bruto, 10g/L de extrato de lêvedo e 20g/L de peptona onde em 48h obteve-se uma concentração de células de, aproximadamente, 5,0 g/L.

Para a produção de lipídeo intracelular, é utilizado o meio de produção cujo meio mineral está descrito no item 3.5 adicionado a uma concentração de glicerol bruto de 66,7g/L. A produção de obtenção máxima de corpúsculos lipídicos dura 54 h sem necessidade de alimentações da fonte de carbono no processo.

### 5.1 Equações para a previsão da planta de produção

O tempo de produção de lipídeo intracelular é superior ao tempo de propagação de células. É proposto então, uma planta com apenas um reator de pré-fermentação para que o reator de produção de lipídeos seja utilizado continuamente, apenas com interrupção para limpeza, carga e descarga. Os cálculos foram baseados em Soares (2014).

Inicialmente, deve ser calculado o número de bateladas anuais para se obter a produção anual desejada. Para esse cálculo deve ser levado em consideração o número de dias e de horas

por dia de funcionamento da planta, e os tempos de produção do óleo intracelular e de carga e descarga do reator de produção. Sendo assim, o número de bateladas é encontrado pela equação:

$$B = \frac{D_f * H_f}{t_p + t_{c,d,l}} \quad (1)$$

Onde:

- $B$  é o número de bateladas anuais
- $D_f$  é o número de dias de funcionamento da planta
- $H_f$  é o número de horas de funcionamento da planta
- $t_p$  é o tempo de produção de lipídeo intracelular
- $t_{c,d,l}$  é o tempo de carga, descarga e limpeza do reator de produção

Para o cálculo do volume de produção do óleo microbiano, deve ser considerado o número de bateladas anuais, a quantidade anual a ser produzida e a concentração do produto de interesse em cada batelada. Esse volume pode ser calculado pela equação a seguir:

$$V_1 = \frac{M_p}{B * P} \quad (2)$$

Onde:

- $V_1$  é o volume da produção de lipídeo;
- $M_p$  é a massa de lipídeo a ser produzida por ano;
- $P$  é a concentração do lipídeo na saída do processo

Para os volumes de propagação: o volume de propagação do inóculo anterior ao reator de produção é de 10% do volume de produção do lipídeo. Esse é o reator de pré-fermentação.

$$V_2 = V_1 * 0,1 \quad (3)$$

Onde:

- $V_2$  é o volume do pré fermentador.

Como dito anteriormente, foi considerada uma planta com um reator de pré-fermentação para que o biorreator de produção de lipídeo intracelular não fique parado (exceto durante a limpeza, esterilização, carga e descarga). Para verificação e confirmação da necessidade de

apenas 1 pré-fermentador, calcula-se o número de pré-fermentadores necessários, calculado pela Equação (4), adaptada de Borzani et al (2001).

$$D = \frac{t_i + t_{c,d,l,i}}{t_p + t_{c,d,l}} \quad (4)$$

Onde:

- $D$  é o número de pré-fermentadores;
- $t_i$  é o tempo de preparo do inóculo no reator de pré-fermentação;
- $t_{c,d,l,i}$  é o tempo de carga, descarga e limpeza do reator de pré-fermentação

Todos os reatores seguintes devem ter 10% do volume do próximo reator para que o crescimento do inóculo seja feito adequadamente. Essa redução de escala deve ser feita até que o volume do meio no reator de reativação do inóculo seja de, no máximo, 500mL, para que essa etapa inicial possa ser feita em *Erlenmeyer* e *shaker*.

$$V_x = V_{x-1} * 10\% \quad (5)$$

Onde:

- $V_x$  é o volume do reator de propagação do inóculo anterior, que deverá ser no máximo 500 mL;
- $V_{x-1}$  é o volume do reator posterior;

Todos os volumes calculados são os volumes de meios de reatores. O volume do reator a ser utilizado pode ser considerado 20% maior que o volume do meio. Sendo assim:

$$V_R = V_M * 1,2 \quad (6)$$

Onde:

- $V_R$  é o volume do reator;
- $V_M$  é o volume do meio total.

Para o caso da utilização de *Erlenmeyers* para reativação e/ou propagação do inóculo, é considerado que o volume do meio deve ser aproximadamente 40% da capacidade do

*Erlenmeyer* para boas condições de aeração e agitação do meio. Sendo assim, a equação para o cálculo do volume do *Erlenmeyer* é:

$$V_{R,y} = \frac{V_y * 100}{40} \quad (7)$$

Onde:

- $V_{R,y}$  é o volume do *Erlenmeyer*;
- $V_y$  é o volume do meio.

## 5.2 Cálculos para a planta de Produção de Lipídeo Intracelular

Segundo as equações já descritas anteriormente, foi possível calcular o número de bateladas anuais e o volume de meio para cada reator, supondo uma produção anual de 100 toneladas de óleo intracelular.

A equação (1) será utilizada para calcular o número de bateladas necessárias por ano para se atingir a produção de óleo intracelular desejada. Para esse cálculo, foram feitas as seguintes considerações:

- A planta funciona 330 dias ao ano;
- A planta funciona 24 horas por dia;
- O tempo de produção de óleo intracelular é de 54 h
- O tempo de carga, descarga e de limpeza é de 6 horas (Adaptado de Borzani *et al.* (2001)).

$$B = \frac{D_f * H_f}{t_p + t_{c,d,l}} = \frac{330 * 24}{54 + 6}$$

$$B = 132 \text{ bateladas / ano}$$

Então poderiam ser realizadas 132 bateladas por ano.

Pela equação (2), foi encontrado o volume final do meio para a produção de lipídeo intracelular. Em seguida, pela equação (6), será possível calcular o volume do reator para essa produção. As seguintes considerações foram feitas:



- Segundo a ABIOVE (Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais) o volume de óleo de soja para consumo doméstico no Brasil em 2010 foi 5,4 milhões de toneladas. Destes, 1,9 milhões de toneladas de óleo de soja foram destinadas para a produção de biodiesel. Supondo um suprimento de 0,0005% dessa matéria-prima, a massa de lipídeo intracelular necessária seria de 100 toneladas por ano.
- Foram consideradas 132 bateladas por ano;
- Considerando que no trabalho experimental, o maior percentual lipídico obtido foi de 14 g de lipídeo em 100 g de células secas e que a concentração celular obtida nesse cultivo é de 10 g/L, a concentração no final de cada batelada é de 1,4g/L de óleo intracelular bruto.

$$V_1 = \frac{M_p}{B * P} = \frac{1000000}{132 * 1,4}$$

$$V_1 = 5.411 L$$

$$V_{R,1} = V_{M,1} * 1,2 = 6.493 L$$

Então ao final de cada batelada, são obtidos aproximadamente 5.500 litros de solução de óleo intracelular a 1,4 g/L. O reator para esta produção deve ter um volume aproximado de 6.500 litros. Para o cálculo dos volumes dos pré-fermentadores, foi utilizada a equação (3) e novamente a equação (6) para a capacidade do reator.

$$V_2 = V_1 * 10 \% = 5.411 * 10\%$$

$$V_2 = 541 L$$

$$V_{R,2} = V_{M,2} * 1,2 = 541 * 1,2$$

$$V_{R,2} = 649,3 \sim 650 L$$

Então o pré-fermentador deverá ter a capacidade nominal de 650 litros, para o volume de mosto igual a 541 litros.

Para que o biorreator de produção não fique parado é necessário calcular a necessidade de apenas 1 ou mais de um pré-fermentador. O tempo de crescimento do pré-inóculo é de 48 horas e o tempo da produção de lipídeo intracelular é de 54 horas. Para o cálculo do número de pré-fermentadores necessários, foi utilizada a equação (4), levando em consideração as seguintes hipóteses:

- Tempo de preparo do inóculo:  $t_i = 48 \text{ horas}$
- Tempo de carga, descarga e limpeza do pré-fermentador:  $t_{c,d,l,i} = 6 \text{ horas}$
- Tempo de produção de lipídeo intracelular:  $t_p = 54 \text{ horas}$
- Tempo de carga, descarga e limpeza do reator de produção:  $t_{c,d,l} = 6 \text{ horas}$

$$D = \frac{t_i + t_{c,d,l,i}}{t_p + t_{c,d,l}} = \frac{48 + 6}{54 + 6}$$

$$D = 0,9 \sim 1 \text{ dorna}$$

É necessária apenas uma dorna de pré-fermentação para que o biorreator de produção de lipídeo não fique parado (exceto durante a limpeza, esterilização, carga e descarga).

A equação (5) calcula o volume do mosto no reator de propagação antes do reator de pré-fermentação. Novamente a equação (6) é utilizada para o cálculo do volume do reator:

$$V_3 = V_2 * 10\% = 541 * 10\%$$

$$V_3 = 54,1 \text{ L}$$

$$V_{R,3} = V_{M,3} * 1,2 = 54,1 * 1,2$$

$$V_{R,3} = 64,9 \text{ L} \sim 65 \text{ L}$$

O biorreator anterior ao pré-fermentador, deve ter capacidade de 65 litros para suportar 54 litros de mosto.

Novamente utilizando a equação (5), calcula-se o volume no bioreator anterior ao bioreator  $V_{R,3}$ . E a equação (6) calcula o volume do reator:

$$V_4 = V_3 * 10\%$$

$$V_4 = 54,1 * 10\%$$

$$V_4 = 5,4 \text{ L}$$

$$V_{R,4} = V_{M,4} * 1,2 = 5,4 * 1,2$$

$$V_{R,4} = 6,5 \text{ L}$$

Essa propagação deve ser realizada em um biorreator de 6,5 litros sendo que o volume a ser utilizado de mosto será 5,4 litros.

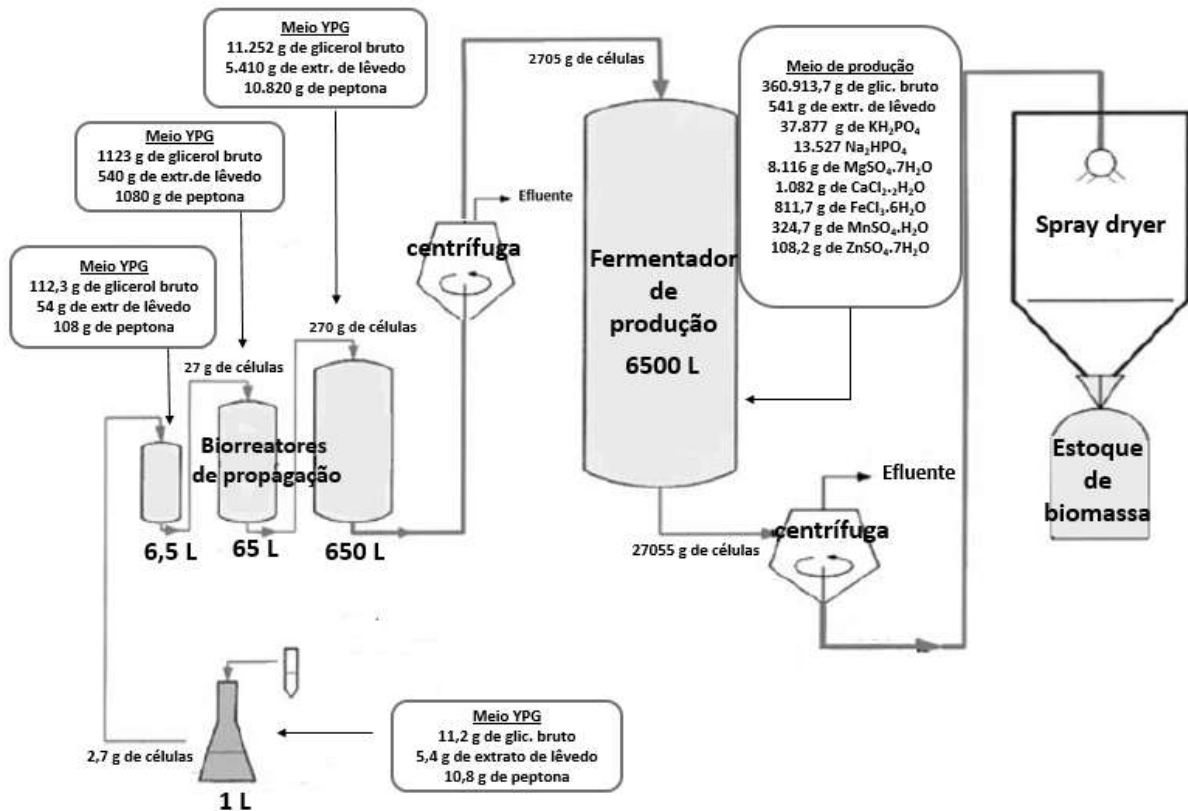
Como ainda não foi atingido o volume de, no máximo 500 mL, para reativação do inóculo, é necessário pelo menos mais um reator de propagação de inóculo que deve ser calculado pela equação (5):

$$\begin{aligned}V_5 &= V_4 * 10\% \\V_5 &= 5,4 * 10\% \\V_5 &= 0,54 L \sim 0,5 L\end{aligned}$$

Esse volume já é suficiente para o início da reativação do inóculo em Erlenmeyer e shaker. Segundo a equação (8), o volume do Erlenmeyer deverá ser:

$$\begin{aligned}V_{R,5} &= \frac{0,5 * 100}{40} \\V_{R,5} &= 1,3 L \sim 1 L\end{aligned}$$

Portanto, a primeira etapa do processo de produção de lipídeo intracelular será a reativação do inóculo iniciada em um Erlenmeyer de 1 litro. A Figura 19 demonstra a representação do processo produtivo juntamente com os cálculos da concentração de reagentes e de células obtidas ao final do processo:



**Figura 19: Fluxograma representativo do processo de produção de lipídeo intracelular.**  
**Fonte: COHEN, RATLEDGE (2005) adaptado pelo autor**

Para a extração de células, como o melhor resultado obtido (descrito no ítem 4.4.2) obteve-se com 20 mL na escala de laboratório. Portanto, o volume necessário de solvente para aplicar o processo de extração na produção de 27.055 g de células produzidas na escala industrial será:

$$\begin{aligned}
 1,0 \text{ g de células} & \text{-----} 0,02 \text{ L de solvente} \\
 27.055 \text{ g de células} & \text{-----} X \text{ L de solvente} \\
 X & = 541 \text{ L de solvente}
 \end{aligned}$$

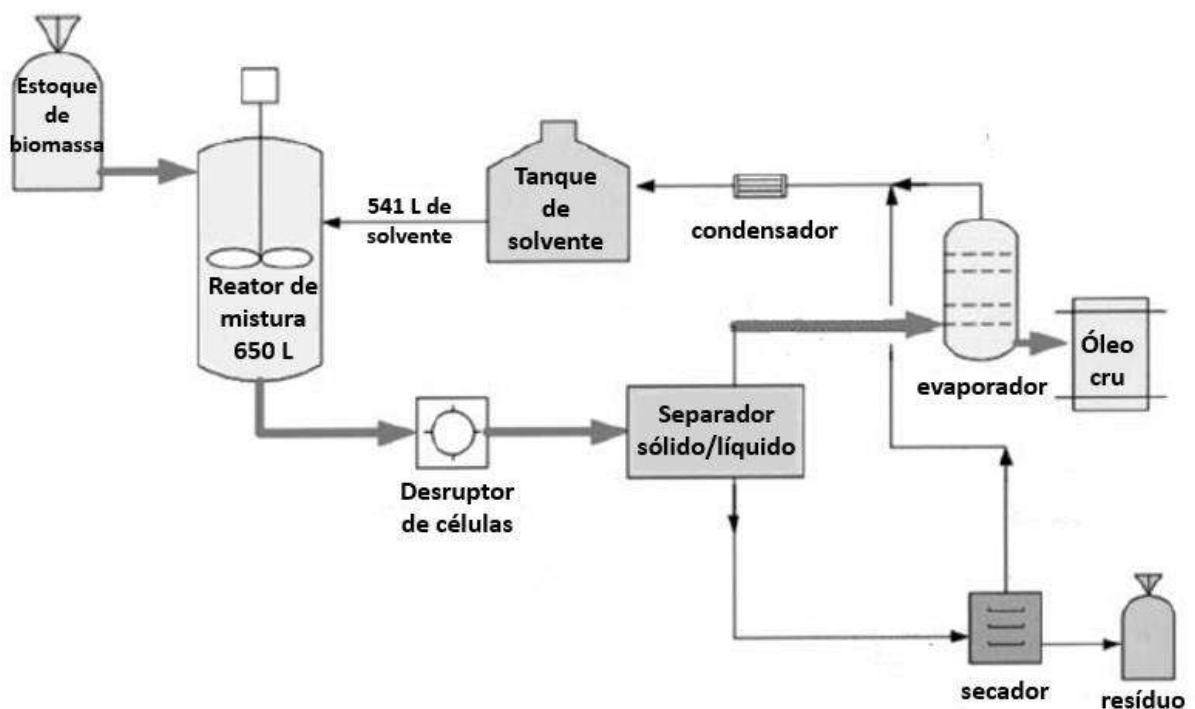
Aplicando a equação (7) para saber o volume do reator necessário:

$$\begin{aligned}
 V_R & = V_M * 1,2 = 541 * 1,2 \\
 V_R & = 650 \text{ L}
 \end{aligned}$$

Obtém-se um reator de 650 L de volume de forma a este, ser responsável pela homogeneização das células. Em seguida, a proposta é que essa solução de células resultante no

reator de mistura, passe por um equipamento conhecido como desruptor de células para o rompimento da parede celular, liberando o corpúsculo lipídico para que este solubilize no solvente.

Em seguida, deverá ocorrer uma separação sólido-líquido de forma que a corrente úmida contendo sólidos remanescente de células rompidas, vá para um secador e posteriormente sendo estocado como residuo sólido. E a corrente líquida contendo o lípideo entre em um evaporador para recuperação do solvente e concentração do óleo obtido no processo. A Figura 20 demonstra a representação do processo de extração:



**Figura 20: Fluxograma representativo do processo de extração lipídica intracelular.**  
Fonte: COHEN & RATLEDGE (2005) adaptado pelo autor

## CONCLUSÕES

1. Foi possível obter lipídeo intracelular em *Y. lipolytica* na presença de glicerol bruto como fonte de carbono. Através do planejamento experimental foi possível obter uma melhor composição de meio de cultivo, que apresenta menor quantidade de reagentes, reduzindo, assim o custo de produção.

2. O meio de produção de lipídeos apresentou elevada relação carbono/nitrogênio, e uma grande diminuição no pH do meio de cultura, esta podendo ser justificada pela produção de metabólitos secundários como o ácido cítrico.

3. Através da avaliação do processamento de extração do óleo intracelular, incluindo pré-tratamento das células, foi possível aumentar o percentual lipídico extraído, atingindo 14,5% de lipídeos em células secas.

4. O projeto de planta para uma produção industrial apresenta uma demanda de grandes volumes de meios e conseqüentemente o número de reatores necessários, que pode resultar em elevado custo de produção. Portanto, incrementos no percentual lipídico e no rendimento de extração devem ser aperfeiçoados para um novo cálculo utilizando as equações e fluxogramas apresentados.

5. O glicerol bruto mostrou-se importante em relação à produção de lipídeo intracelular podendo ser um destino apropriado para o composto já que é um grande excedente da produção de biodiesel.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glicerol as a carbón source to obtain added-value metabolities: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, 30, 2012, p. 733-741

AGGELIS, G.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S.; PAPADOPOULOS, G. A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. II Study of cellular lipids of *Mucor circinelloides* during growth on a vegetable oil. *Grasas Y Aceites*, Sevilla, v. 46, p. 245-250, 1995.

ALICEWEB. SECEX – Secretaria de Comércio Exterior. MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em <<http://aliceweb2.mdic.gov.br/>>

ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBACH, M.; GUETZ, G.M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Biosource Technology*, Oxford, v. 99, p. 3051-3056, 2007.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/>>

AYOUB, M.; ABDULLAH, A. Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 2012, p. 2671-2686

ARANDA, D., *et al.* Geração de Energia a partir de Resíduos do Lixo e Óleos Vegetais: Fontes Renováveis de Energia no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003.

BARTH, G. & GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 19, pp. 21-237, 1997.

BASTOS, V.D., Desafios da Petroquímica Brasileira no Cenário Global- BNDES Setorial, 2009.

BEOPOULOS, A., *et al.* *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res.* v.48(6), p.375-87, 2009.

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), p.692-696, 2009.

BEOPOULOS, A., NICAUD, J., GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* v.90(4), p.1193-206, 2011.

BIALY, H.E.; GOMAA, O.M>; AZAB, K.S. Conversion of oil waste to valuable fatty acids using Oleaginous yeast. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v. 27, p. 2791-2798, 2011.

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

BOMTEMPO, J.V., Bioprodutos, biocombustíveis e bioprocessos. *Química Verde no Brasil*: 2010-2030. – CGEE, 2010, p. 333-373

BORZANI, W.; SCHIMDELL, W., LIMA, U., & AQUARONE, E., *Biotecnologia Industrial* 1ª edição Volume 2 – Engenharia Bioquímica. Editora: Edgar Blucher Ltda, 2001

CHANG, C., *et al.* Enhancement of rice  $\alpha$ -amylase production in recombinant *Yarrowia lipolytica*. *J Ferment Bioeng*, v.84 (5), p.421-442, 1997.

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

CHI, Z.; ZHENG, Y.; MA, J.; CHEN, S. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. *International Journal of Hydrogen Energy*, Oxford, v. 36, p. 9542-9550, 2011.



CESAR, A.S., Análise dos direcionadores de competitividade para a cadeia produtiva do biodiesel: o caso da mamona. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Produção – Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de São Carlos, 2009.

COHEN, Z. RATLEDGE, C., Single Cell Oils- by AOSPress 2005

DEMIRBAS, A., Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy*. V.35, p.4661-4670, 2007.

DERMIBAS, A., Biodiesel from waste cooking oil via base-catalytic and supercritical metanol transesterification. *Energy Conversion and Management*, v. 50, 2009, p. 923-927.

DOBSON, Rosemary; GRAY, Vincent; RUMBOLD, Karl. Microbial utilization of crude glicerol for the production of value-added products – *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39:217-226

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

EIA – U.S. Energy Information Administration – International Energy Outlook, 2013. Disponível em: <<http://www.eia.gov/>>

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

FAKAS, S., *et al.* Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*., *Biomass and Bioenergy*, v.33(4), p.573–580, 2009.

FAN, Xiaohu; BURTON, Raxhel; ZHOU, Yongchang. Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals – Mini Review – *The Open Fuels & Energy Science Journal*, 2010, 3, p.17-22

FEI, Q.; CHANG, H.N.; SHANG, L.; CHOI, J.; KIM, N.; KANG, J. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, Oxford, v. 102, p. 2695-2701, 2011.

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.

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.

GOLDEMBERG, J; LUCON, O., Energias Renováveis: um futuro sustentável. *Revista USO*, n. 72, 2007, p. 6-15

GORECKI, Paul K.; LYONS, Sean; TOL, Richard S.J. EU climate change policy 2013-2020: Using the Clean Development Mechanism more Effectively in the non-EU-ETS Sector – *Energy Policy*, 38, 2010, p. 7466-7475

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.

HUANG, C., Single cell oil production from lowcost substrates: The possibility and potential of its industrialization – *Biotechnol Adv* 31, p. 129-139, 2013

ISMAIL, S.A.S.; DEAK, T.; ABD EL-RAHMAN, H.A.; YASSIEN, M.A.M.; BEUCHAT, L.R. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, pp.13–19, 2001.

JOHNSON, Duane T. and Taconi, Katherine A. – The Glycerin Glut: Options for the Value-Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiesel Production. *Environmental Progress*, 2007, 26, 4, p.338-348

KIM, T. H.; YOUNG, S.O.; KIM, S.J. The possible involvement of de cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil-degrading Yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. *J.Microbiol. Biotechnology.*, v. 10 (3), pp. 333-337, 2000.

KIT – Karlsruhe Institute Technology, Disponível em <<http://www.kit.edu/english/>>

LEONETI, Alexandre Bevilacqua; LEONETI, Valquiria Aragão; OLIVEIRA, Sonia Valle Walter Borges de. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, 45, 2012, p.138-145

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology*, Berlin, v. 80, p. 749-756, 2008.

LOPES, R.S., Seleção de cepas de *Yarrowia lipolytica* para a produção de bio-óleo, Dissertação de Mestrado de Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo de Gás Natural – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

KOUTINAS, Apostolis A.; WANG, Ruo-Hang; WEBB, Colin. The biochemurgist – Bioconversion of agricultutal raw materials forchemical production- *Biofuels, Bioproducts & Biorefinfg.* 2007, 1, p.24-38

MAKRI, A., FAKAS, S., AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresour Technol.* v.101(7), p.2351–2358, 2010.

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

MATTEI, Lauro. Programa Nacional para Produção e Uso do Biodiesel no Brasil (PNPB): Trajetória, Situação Atual e Desafios. Documentos Técnicos Científicos do Banco do Nordeste do Brasil. Volume 41 número 04, 2010, p. 731-740

MILLI, Brunela Bonatto; GRIPA, Danielly Cristina; SIMONELLI, George. Aplicações Alternativas da Glicerina Oriunda do Biodiesel – Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, 7, 12, 2011, p. 1-9

MORAIS, B., *et al.* A new fluorescence-based method identifies protein phosphatases regulating lipid droplet metabolism. *PLoS ONE*, v.5, n.10, 2010.

MOTA, C., da SILVA, C., GONÇALVES, V. Gliceroquímica: Novos Produtos e Processos a partir da Glicerina de Produção de Biodiesel. *Química Nova*, v.32, p.639-649, 2009.

NWACHUKWU, Res; SHAHBAZI, A; WANG, L, Ibrahim,; WORKU, M; Schimmel, K. Bioconversion of glycerol to ethanol by a mutant *Enterobacter aerogenes* – *AMB Express* 2012,2:20, p. 1-6

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.* Accumulation of cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. *Curr Microbiol.* v.46, p.124-30, 2003.

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., *et al.* Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, v.32(1), p.60-71, 2008.

PAPANIKOLAOU, S., AGGELIS, G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technol.* v.21, p.83–87, 2009.

PAPANIKOLAOU, S., AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol* 113: 1031-1051, 2011.

PARENTE, E.J.S., Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Tecbio , Fortaleza, 2003

QNINT/SBQ- Qupimica Nova Interativa. Sociedade Brasileira de Química. Disponível em: <<http://qnint.s bq.org.br/qni/pagina.php>>

RASCHKE, D.; KNORR, D. Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in the oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 79, p. 178-183, 2009.

ROSSI, M., *et al.* Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi, Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies, Ed. Stoytcheva, M., *InTech*. 2011.

RYMOWICZ, W., RYWINSKA, A., GLADKOWSKI, W. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratlavia K1. *Chem Pap.* v.62(3), p.239-246, 2008.

RYMOWICZ, W., RYWINSKA, A., MARCINIKIEWICZ, M. High yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett*, v.31, p.377-380, 2009.

RYWINSKA, A., *et al.* Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass Bioenergy*. v.66, p. 48:148–66, 2013.

SANTOS, I. T., Adaptação Regulatória na Indústria de Biocombustíveis – Dissertação de Mestrado em Economia – Universidade Federal do Rio de Janeiro - 2012

SIDS-Screening Information Data Set. Glycerol, CAS N°: 56-81-5. SIDS Initial Assessment Report. UNEP Publications. p. 26-28, 2002.

SOARES, C. E. Análise de uma Proposta de um Bioprocesso para Obtenção de um Intermediário Farmacêutico tendo como Base a resolução da Diretoria Colegiada 17.66.Rio de Janeiro, Brasil, 2014.

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.

THIRU, M.; SANKH, S.; RANGASWAMY, V.; Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresource Technology*, Oxford, v. 102, p. 10436-10440, 2011.

TIMILSINA, G.R.; SHRESTHA, A., How much hope should we have for biofuels? – *Energy*, 36, p. 2055 – 2069, 2011

WENDISCH, Volker F.; LINDNER, Steffen N. e MEISWINKEL, Tobias M. Use of Glycerol in Biotechnological Applications. *Biodiesel – Quality, Emissions and By-Products*. Free online editions of *InTech.*, 2011, 18, p.305-340

YU, Z., *et al.* Enhanced  $\alpha$ -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy. *Bioresour Technol.*, v.114, p.597-602, 2012.

ZHANG, J.; FANG, X.; ZHU, Z.L.; LI, Y.; XU, H.P.; ZHAO, B.F.; CHEN, L.; ZHANG, X.D. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass and Bioenergy*, Oxford, v. 35, p. 1906-1911, 2011.