**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

ANA KARINE FURTADO DE CARVALHO

**Avaliação do potencial do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* como
fonte de lipase e lipídios para a produção de biodiesel
dentro do conceito de biorrefinaria**

Lorena

2015

ANA KARINE FURTADO DE CARVALHO

Avaliação do potencial do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* como
fonte de lipase e lipídios para a produção de biodiesel
dentro do conceito de biorrefinaria

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Industrial na área de
Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Versão original

Lorena
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Carvalho, Ana Karine Furtado de

Avaliação do potencial do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* como fonte de lipase e lipídios para a produção de biodiesel dentro do conceito de biorrefinaria / Ana Karine Furtado de Carvalho; orientadora Heizir Ferreira de Castro - Versão Original. - Lorena, 2015.

221 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientadora: Heizir Ferreira de Castro

1. Biodiesel. 2. Lipase. 3. Transesterificação. 4. Óleo vegetais. 5. Óleo microbiano. I. Título. II. Castro, Heizir Ferreira de, orient.

Dedicatória

*Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais Carvalho e Acácia
que partilham comigo todos os momentos da
vida, a caminhada e as realizações.*

*A eles, por tudo que
têm me ensinado – solidariedade e amor.*

*À minha irmã Ana Cristina,
exemplo de quem venceu as dificuldades,
sem abrir mão de seus valores*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me presentear com momentos e pessoas especiais, por iluminar meu caminho e amparar nos momentos de felicidade e de fracasso. Obrigado Senhor, por ter me concedido fé, força, alegria e capacidade em todos os momentos difíceis.

Aos meus pais Carvalho e Acácia, meus maiores líderes, que sempre me auxiliaram e me incentivaram na busca de meus sonhos. Obrigada por todo o amor, apoio, incentivo, preocupação, valores e princípios. Agradeço também pela presença cotidiana mesmo com toda a ausência física e por sempre estarem dispostos a me ajudar com palavras sábias ou mesmo por meio de um silêncio necessário.

À minha irmã Ana Cristina e ao meu cunhado Emerson por terem se mantido presente em toda essa caminhada. Muito obrigada pelo carinho e pelas doces palavras de estímulo.

À Prof^a Dra. Heizir Ferreira de Castro, agradeço pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela extrema paciência, insistência, sugestões, correções e boas conversas indispensáveis para a conclusão desta etapa da minha vida.

Aos queridos tios João Bosco e Maria Aglaí pela oração, preocupação, amor e disponibilidade em me ajudar em todos os momentos.

Aos meus tios de coração José, Marlene, Fátima e toda sua família por terem me acolhido em Lorena, por toda a dedicação, preocupação e amizade. A vocês minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos Carvalho Filho, Furtado, Sávio, Walbert e minhas respectivas cunhadas pelo apoio prestado com tanto carinho e pela motivação constante nesta caminhada.

Aos meus sobrinhos, muito obrigada pelas lindas cartinhas e desenhos e pela compreensão de minhas ausências e por sempre me receberem com tanto amor.

Aos meus familiares, pela torcida e por todo o carinho e atenção. À minha prof^a e tia Yaci Torres Furtado pelo exemplo de vida, sabedoria e eterna admiração. Aos meus queridos Roberio, Tio Valmir, Tio Ciro, Tia Sineide, Vovô Chico que esperaram ansiosamente por cada retorno meu a Fortaleza, mas agora são anjos que me protegem de onde estiverem.

À Profa. Dra. Grazielle Andrade pela amizade e por todos os ensinamentos concedidos a mim no início da realização deste trabalho. Aos professores João, Pedro, Jayne e Juan pelas valiosas sugestões e contribuições neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Helcio José Hizário Filho e seu aluno Otávio, pelo apoio na realização de parte deste trabalho e principalmente por estarem sempre disponíveis a ajudar.

À Dra. Laura Maria Bruno, obrigada pela base científica que me proporcionou e por acreditar na minha capacidade. Obrigada pelo incentivo e companheirismo verdadeiro.

À Dra. Fátima Borges, Dra. Terezinha Feitoza, Dra. Juliane Carvalho, Dra. Adriana Crispim, Dr. Jorge Zapata e a técnica Regia Sobral, pela grande colaboração ao longo da minha formação acadêmica, amizade e incentivo. Às minhas grandes amigas Natalia Vasconcelos e Mônica Nunes pelos ensinamentos e palavras de incentivo e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos meus amigos/irmãos Bruna Curry, Tali, Miguelzinho, Lorena, Livia de Souza, Natália Medeiros, Rafael Coelho, Maura, Ana Roma e suas respectivas famílias pela motivação, carinho e estímulos constantes e por tornarem os meus finais de semana mais divertidos e acima de tudo por amenizarem a saudade que sentia da minha família e dos meus amigos distantes. Aos amigos Renata, Wagner, Luciano, Cecilia, Mário, Bárbara, Alegria, Lara, Rá, Teo e suas respectivas famílias pela convivência, amizade, carinho, apoio e ajuda.

Aos meus queridos amigos Arlei, Ana, Adriano, Livia e Alessandro, obrigada pelo incentivo, apoio e carinho, pelas orações constantes e por amenizarem a saudade que eu sinto da minha família.

A todos amigos que fizeram ou fazem parte do nosso grupo de trabalho, inclusive os que ficaram por pouco tempo: Karen, Natalia, Gisanara, Ana Paula, Poliana, Adriano, Andre, Matheus B., Matheus C., Murillo, Tamires, Marcio G., Marcio S., Aline S., Daniel E., Daniel G., Ana Letícia, Tomas, Eduardo, Manu, Kevin, Martim, Lucas M., Lucas R., Bruno, Lainy, Angela, Heitor, Guilherme, Patricia M., Juan, Renata, William, Annie, Dani, Flavia, Martim, Pedro, Braz, Rafael. Obrigada de coração pela amizade e convivência.

Às minhas queridas amigas que fizeram parte do grupo de trabalho e que deixaram o gostoso sabor de suas amizades: Grazi, Gisele, Ariela e Livia. Obrigada pelo carinho trocado e por serem exatamente como são.

Aos queridos amigos que estão presentes desde o começo do meu mestrado e pelos quais tenho imenso carinho: Larissa, Patricia e Weriton. Obrigada pelo auxílio constante, pelos cafés, almoços e risadas.

Aos amigos Tales, Vanessa, Diana, Aline N. e Cintia, que passaram rapidamente pelo laboratório e pelos quais eu tenho imenso carinho.

Aos meus queridos amigos de Fortaleza (infância, colégio, faculdade, Embrapa, grupo de oração) muito obrigada pelas inúmeras ligações, e-mails, recepções e por sempre terem compartilhado minhas alegrias e tristezas.

A todos os funcionários da Escola de Engenharia de Lorena.

A todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço o apoio financeiro concedido pela Capes- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

“A humildade é o primeiro degrau para a sabedoria”

São Tomás de Aquino

“A simplicidade é o último grau de sofisticação”

Leonardo da Vinci

RESUMO

CARVALHO, A. K. F. **Avaliação do potencial do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* como fonte de lipase e lipídios para a produção de biodiesel dentro do conceito de biorrefinaria.** 2015. 221 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2015.

O desenvolvimento sustentável é atualmente um dos maiores focos das pesquisas no mundo em virtude dos impactos ambientais, tais como aquecimento global, geração de resíduos e emissão de gases poluentes causados pelo uso de combustíveis fósseis. Deste modo, pesquisas têm sido concentradas em tecnologias que permitam a substituição de refinarias à base de petróleo por biorrefinarias que utilizam matérias-primas renováveis. Neste contexto, os fungos filamentosos surgem como um recurso promissor no desenvolvimento de novos produtos sustentáveis, entre os quais os fungos pertencentes ao filo Zigomiceto, contribuem significativamente para esse desenvolvimento e estão sendo extensivamente estudados para a aplicação em biorrefinarias, com destaque especial para os fungos do gênero *Mucor*. Esse gênero, particularmente da espécie *Mucor circinelloides*, é um potencial produtor da enzima lipase e de biomassa com quantidades significativas de lipídios (*single cell oil*) o que permite sua exploração no processo de produção de biodiesel. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi explorar importantes aplicações biotecnológicas da linhagem de *Mucor circinelloides* URM 4182, tanto para produção de lipases quanto de lipídios. O trabalho experimental realizado consolidou dados da potencialidade do fungo para produção de lipase ligada ao micélio e sua utilização como biocatalisador para obtenção de biodiesel partir de óleos vegetais alternativos, como andiroba, coco, macaúba, palma e pinhão manso. Nas condições estudadas, foram obtidos rendimentos de transesterificação entre 88% a 97% e as conversões mais elevadas foram alcançadas para os óleos láuricos sugerindo seletividade da lipase para ácidos de cadeia curta. A potencialidade da linhagem *Mucor circinelloides* URM 4182 foi comprovada na obtenção de lipídios em cultivos efetuados em biorreator utilizando glicose e milhocina, respectivamente, como fontes de carbono e de nutrientes alternativos aos suplementos sintéticos. Nessas condições, valores médios de produtividade biomassa ($3,10 \pm 0,01$ g/L/dia) contendo ($31 \pm 0,01$ % m/m) de lipídios, correspondendo produtividade lipídica de ($0,97 \pm 0,01$ g/L.dia) foram alcançados. A composição do óleo microbiano revelou elevados teores dos ácidos graxos saturados palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) e dos insaturados oleico (C18:1) e linoleico (C18:2), que são os ácidos graxos semelhantes aos dos óleos vegetais convencionais utilizados para a produção de biodiesel. Além disso, foram verificados teores consideráveis do ácido gama-linolênico (GLA - C18:3), que tem relevante importância nas indústrias farmacêutica e de alimentos. A esterificação e transesterificação simultâneas do óleo microbiano ou diretamente da biomassa celular com etanol mediada por catalisadores heterogêneos bioquímicos e químicos forneceram amostras de biodiesel com elevados teores de ésteres de etila (> 97%) que atendem as normas de qualidade para uso como biocombustível.

Palavras-chave: Biodiesel. Lipase. Transesterificação. Óleos vegetais. Óleo microbiano. Etanol

ABSTRACT

CARVALHO, A. K. F. **Assessing the potential of the filamentous fungus *Mucor circinelloides* as a source of lipase and lipids for biodiesel production in the biorefinery concept.** 2015. 221 p. Thesis (Doctoral of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2015.

Sustainable development is now the major research focus in the world because of the environmental impacts, such as global warming, waste generation and greenhouse gas emissions caused by the use of fossil fuels. Thus, research has been focused on technologies that enables the replacement of petroleum based refineries by biorefinery based on renewable raw materials. In this context, filamentous fungi emerge as a promising resource in the development of new sustainable products, including the fungi belonging to the phylum Zigomicete which contribute significantly to this development and are being extensively studied for using in biorefineries, with particular emphasis on the *Mucor* sp. fungus genus. This genus, particularly from the species of *Mucor circinelloides*, is a potential producer of the enzyme lipase and biomass having significant amounts of lipids (*single cell oil*) which allows its exploitation in the biodiesel production. Thus, the aim of this study was to explore important biotechnological applications of a Brazilian strain of *Mucor circinelloides* URM 4182 for both production of lipases and lipids. The experimental work consolidated this fungus capability to produce mycelium bound lipase and its use as biocatalysts for biodiesel production from alternative vegetable oils such as andiroba, coconut, macaw palm, palm and jatropa. The attained transesterification yields were in the range from 88 to 97%, and the highest conversions were achieved for lauric oils suggesting that *M. circinelloides* lipase has high selectivity for short chain fatty acids. The capability of this strain was also proven to produce lipids at cultivation conditions established in this work using glucose and corn steep liquor, respectively, as carbon sources and alternative nutrients to the mineral supplements. Under these conditions, average values for biomass productivity (3.10 ± 0.01 g/L/day) containing high lipis levels ($31.2 \pm 0.01\%$ m/m) and lipid productivity of 0.97 ± 0.01 g/L.dia were achieved. The composition of microbial oil revealed high levels of saturated fatty acids such as palmitic acid (C16:0) and stearic (C18:0) and unsaturated oleic (C18:1) and linoleic (C18:2), which are fatty acids similar to conventional vegetable oils used for the production of biodiesel. In addition, considerable levels of gamma-linolenic acid (GLA-C18:3) were also verified which has relevant importance in the pharmaceutical and food industries. The simultaneous esterification and transesterification from microbial oil or direct fungal biomass with ethanol mediated by heterogeneous catalysts (biochemical and chemical) provided samples with high levels of ethyl esters (> 97%) that meet the quality standards for using as biofuel.

Keywords: Biodiesel. Biocatalyst. Transesterification. Vegetable oils. Microbial oil. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Potenciais produtos obtidos a partir do cultivo de <i>Zigomicetos</i>	28
Figura 2.1. Classificação dos biocombustíveis de acordo com a natureza, origem, processo de produção e matéria-prima.	36
Figura 2.2. Representação esquemática da reação global de transesterificação	40
Figura 2.3. Representação esquemática das etapas envolvidas na transesterificação	41
Figura 3.1. Reação geral de hidrólise de triacilglicerol catalisada pela lipase	61
Figura 3.2. Diferentes métodos de imobilização celular de microrganismos: (A) imobilização na superfície do suporte; (B) Engaiolamento em matriz porosa; (C) Floculação celular (D) Barreiras de contenção mecânica.	66
Figura 3.3. Diagrama esquemático da localização das lipases nas células de <i>Rhizopus oryzae</i>	68
Figura 3.4. Comparação das etapas envolvidas no processo de obtenção de biodiesel por via enzimática empregando: a) Lipase purificada imobilizada; b) células íntegras imobilizadas.	69
Figura 3.5. Fungo <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182: cultivo e produção de esporos em meio sólido	78
Figura 3.6. Suporte para imobilização de fungos: a) palha de trigo; b) bagaço de milho; c) ágar-ágar; d) Celite®; e) PHB; f) espumas de poliuretano	79
Figura 3.7. Produção de células de <i>M. circinelloides</i> URM 4182: a) caldo fermentativo; b) biomassa celular	90
Figura 3.8. Crescimento da biomassa de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 com concomitante imobilização em: a) Celite®; b) PHB; c) sabugo de milho; d) ágar-ágar; e) palha de trigo	91
Figura 3.10. Rendimento em éster de etila na reação de etanólise de diferentes óleos vegetais: (□) óleo de andiroba, (●) óleo de coco, (○) óleo de macaúba, (■) óleo de palma e (▲) óleo de pinhão manso.	95
Figura 3.11. Espectro RMN ¹ H integrado dos ésteres etílicos obtidos a partir da etanólise dos óleos: a) andiroba, b) coco, c) macaúba, d) palma, e) pinhão manso catalisada por células integras de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 imobilizada em poliuretano	96
Figura 3.12. a) Espectro RMN ¹ H integrado do biodiesel e triglicerídeo	98
Figura 3.12. b) Espectro RMN ¹ H integrado das regiões de formação de mono-, di-, triglicerídeo e ésteres etílicos	98
Figura 4.1. Produtos que podem ser gerados em uma Biorrefinaria	116
Figura 4.2. Via bioquímica para a produção de lipídio	118
Figura 4.3. Lipogênese	119
Figura 4.4. Etapas básicas envolvidas no processo de obtenção de biodiesel a partir de microrganismos oleaginosos	135
Figura 4.5. Esquemas das reações simultâneas de esterificação e transesterificação de material lipídico contendo elevado grau de acidez mediadas por catalisadores	

heterogêneos: a) transesterificação direta da biomassa (catalisador químico de caráter ácido); b) transesterificação do lipídio (catalisador bioquímico-lipase imobilizada).....	136
Figura 4.6. Cultivo de <i>M. circinelloides</i> em shaker com agitação orbital	140
Figura 4.7. Cultivo de <i>Mucor circinelloides</i> em biorreator	141
Figura 4.8. Aparato experimental utilizado na etanólise enzimática do óleo microbiano	142
Figura 4.9. Reator de micro-ondas operando durante a reação de biodiesel	142
Figura 4.10. Aparato experimental utilizado na etanólise química heterogênea da biomassa microbiana	143
Figura 4.11. Extração de lipídio pelo método “Bligh & Dyer” modificado.....	145
Figura 4.12. Extração de lipídio pelo método Folch empregando ultrassom de sonda	146
Figura 4.13. Extração de lipídio pelo método empregando micro-ondas/etanol.....	147
Figura 4.14. Etapas do cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM4182 em meio glicose e nutrientes (meio A)	154
Figura 4.15. Extração de lipídios com etanol assistida por micro-ondas, sob diferentes condições de tempo e temperatura.....	157
Figura 4.16. Estudo do efeito da irradiação de micro-ondas nos micélios de <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182. (a) biomassa antes da extração com etanol assistida por micro-ondas; b) biomassa após da extração com etanol assistida por micro-ondas.....	158
Figura 4.17. Extração de lipídio da biomassa microbiana assistida por: a) micro-ondas; b) ultrassom.....	162
Figura 4.18. Perfil da concentração de biomassa (■) e consumo de glicose (●) durante a produção de lipídio (▲) pelo fungo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182: a) cultivo em meio A; b) cultivo em meio D.	165
Figura 4.19. Fotografias do cultivo do <i>M. circinelloides</i> URM 4182 em meio glicose (Meio A) conduzido em biorreator	168
Figura 4.20. Perfil de concentração do consumo de glicose durante a produção de lipídio pelo fungo de <i>M. circinelloides</i> URM4182 em biorreator contendo glicose como fonte de carbono em duas concentrações: a) 20g/L (meio A) e b) 40g/L (Meio D).....	169
Figura 4.21. Cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 em shaker orbital utilizando milhocina como fonte de nutrientes: a) caldo fermentativo; b) biomassa	173
Figura 4.22. Perfil de concentração de biomassa (■) e consumo de glicose (●) durante a produção de lipídio (▲) pelo fungo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182: a) cultivo em meio C; b) cultivo em meio E.....	173
Figura 4.23. Cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 em biorreator utilizando milhocina como nutriente: a) Glicose (20g/L) + milhocina 5%); b) Glicose (40g/L) + milhocina 5%) (120h).....	174
Figura 4.24. Perfil do consumo de glicose durante a produção de lipídio pelo fungo de <i>M. circinelloides</i> URM4182 em biorreator contendo meio enriquecido com milhocina a) (Meio C); b) (Meio E).....	175
Figura 4.25. Viscosidade absoluta em função da taxa de deformação do material lipídico da biomassa de <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182	179

Figura 4.26. Espectro de RMN ^1H : a) lipídio de <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182; Produto da etanólise do lipídio de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 obtido a partir do Método 1 (b); Método 2 (c) e Método 3(d).....	184
Figura 4.27. Espectro do infravermelho do lipídio <i>M. circinelloides</i> URM 4182.....	186
Figura 4.28. Espectro na região do infravermelho, do óleo e do biodiesel de palma.....	188
Figura 4.29. Espectro na região do infravermelho das amostras de biodiesel obtidas do lipídio de <i>M.circinelloides</i> pelo Método 1 (-); Método 2 (-); Método 3 (-).	189
Figura 4.30. Cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 em shaker orbital utilizando metodologia descrita por Xia et al., 2011	192
Figura 4.31. Perfil de concentração de biomassa (■) e consumo de glicose (●) durante a produção de lipídio (▲) pelo fungo de <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182: a) cultivo em meio A; b) cultivo em meio B	193

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Exemplos de catalisadores usados na produção de biodiesel	43
Tabela 2.2. Matérias-primas lipídicas utilizadas na produção de biodiesel.....	45
Tabela 2.3. Comparação das vantagens e desvantagens do etanol e metanol como agente acilante na obtenção de biodiesel.....	47
Tabela 3.1. Características das culturas tropicais selecionadas para utilização no presente trabalho	75
Tabela 3.2. Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.....	80
Tabela 3.3. Composição do meio de cultura para o crescimento de biomassa de <i>M. circinelloides</i> URM 4182.....	81
Tabela 3.4. Condições de operação para a determinação dos ésteres etílicos purificados .	84
Tabela 3.5. Propriedades físico-químicas e composição em ácidos graxos dos óleos vegetais utilizados para a produção de biodiesel	89
Tabela 3.6. Atividade lipolítica em células íntegras de <i>M. circinelloides</i> URM 4182	90
Tabela 3.7. Atividade lipolítica em células de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 imobilizadas em diferentes suportes	92
Tabela 3.8 - Área de integração dos sinais nos espectros e conversão porcentual dos óleos vegetais em ésteres de etila determinados por RMN ¹ H.....	97
Tabela 3.9. Propriedades dos ésteres de etila obtidos na etanólise dos óleos vegetais mediada por células íntegras de <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182	99
Tabela 4.1. Produção de lipídios por alguns microrganismos oleaginosos	120
Tabela 4.2. Produção de lipídio a partir do cultivo de <i>Mucor circinelloides</i>	127
Tabela 4.3. Fontes de óleos microbianos exploradas na produção de biodiesel.....	134
Tabela 4.4. Composição dos diferentes meios de culturas e condições de cultivo para produção de lipídios por <i>M. circinelloides</i> URM 4182	139
Tabela 4.5. Constituintes da biomassa de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 cultivada em meio A em função do tempo.....	154
Tabela 4.6. Concentração total de lipídios da biomassa de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 por diferentes métodos de extração	156
Tabela 4.7. Composição do lipídio extraído da biomassa de <i>M. circinelloides</i> URM 4182	160
Tabela 4.8. Comparação do perfil de ácidos graxos produzidos por diferentes linhagens de <i>Mucor circinelloides</i>	164
Tabela 4.9. Parâmetros bioquímicos do cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM4182 (120 h) de cultivo em shaker orbital utilizando glicose como fonte de carbono em concentrações diferentes.....	166
Tabela 4.10. Comparação dos parâmetros bioquímicos obtidos no cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM4182 em diferentes aparatos (Shaker e biorreator) em 120 h utilizando glicose como fonte de carbono	170

Tabela 4.11. Parâmetros bioquímicos do cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 em 120 h de cultivo contendo meio com milhocina	176
Tabela 4.13. Propriedades dos ésteres etílicos de SCO de <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182	185
Tabela 4.14. Comparação das bandas de infravermelho do óleo <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182 com bandas de óleos vegetais alternativos explorados para a produção de biodiesel	187
Tabela 4.15. Parâmetros de qualidade do biodiesel a partir de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 estimados por modelos empíricos	191
Tabela 4.16. Parâmetros bioquímicos do cultivo de <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182 em shaker (Meio de Cultivo “B”).	195
Tabela 4.17. Parâmetros bioquímicos do cultivo de <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182 em shaker utilizando diferentes fontes de carbono (120h)	198

LISTA DE SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	American Oil Chemists' Society
ASTM	American Society for Testing and Materials
DAG	Diacilglicerol
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAG	Monoacilglicerol
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
URM	University Recife Mycology
TAG	Triacilglicerol

SUMÁRIO

1. BIORREFINARIAS	25
1.1. Contexto de Biorrefinaria	25
1.2. Trabalhos anteriores desenvolvidos	28
1.3. Objetivo do presente estudo	29
1.4. Estrutura da tese	30
Referências	31
2. PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	35
2.1. Biocombustíveis como fonte renovável de energia	35
2.2. Biocombustíveis no Brasil	36
2.3. Biodiesel	37
2.4. Processos de obtenção de biodiesel	38
2.4.1. Síntese de biodiesel por transesterificação	39
2.5. Catalisadores	41
2.6. Matérias-primas para a produção de biodiesel	44
2.6.1. Matérias-primas lipídicas.....	44
2.6.2. Matérias-primas alcoólicas	46
2.7. Propriedades do biodiesel	48
Referências	54
3. POTENCIAL DO FUNGO FILAMENTOSO <i>Mucor circinelloides</i> COMO FONTE DE LIPASE LIGADA AO MICÉLIO	61
3.1. Lipases	61
3.1.1. Lipases como biocatalisadores na síntese de biodiesel.....	62
3.1.2. Imobilização de células íntegras	65
3.1.2.1. Suportes de imobilização	67
3.1.3. Localização e excreção da lipase a partir de células íntegras	67
3.1.4. Etanólise mediada por células íntegras	68
3.2. Óleos vegetais selecionados para a produção de biodiesel.....	71
3.3. Materiais e Métodos.....	78
3.3.1. Cultura de microrganismo	78
3.3.2. Suportes de imobilização	78
3.3.3. Materiais de partida	79
3.3.4. Outros reagentes	80
3.3.5. Equipamentos utilizados	80
3.3.6. Procedimentos.....	81
3.3.6.1. Esterilização dos meios e equipamentos.....	81
3.3.6.2. Seleção da fonte de carbono na produção de lipase ligada ao micélio	81
3.3.6.3. Imobilização das células íntegras dos fungos	82
3.3.6.4. Síntese e purificação de ésteres etílicos	82
3.3.7. Métodos de Análise	82
3.3.7.1 Determinação da atividade hidrolítica	82
3.3.7.2 Caracterização das propriedades dos óleos vegetais.....	83
3.3.7.3 Qualidade do biodiesel obtido	84
3.4. Resultados e Discussão	87
3.4.1. Propriedades dos óleos vegetais	87

3.4.2. Produção e imobilização de células íntegras de <i>M.circinelloides</i> URM 4182	90
3.4.3. Etanólise dos óleos vegetais	94
3.4.4. Influência da lipase e do solvente na especificidade da catalise enzimática	100
3.5. Conclusões	102

Referências 105

4. PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE ÓLEO MICROBIANO (*Single Cell Oil*) 115

4.1. Lipídios microbianos	117
4.1.1. Gênero <i>Mucor</i>	124
4.1.2. Métodos de extração de lipídio microbiano.....	131
4.1.3. Produção de biodiesel a partir de lipídio microbiano	133
4.2. Materiais e Métodos.....	137
4.2.1. Microrganismo.....	137
4.2.2. Matérias-primas	137
4.2.3. Catalisadores	137
4.2.4. Outros reagentes	137
4.2.5. Equipamentos.....	138
4.2.6. Procedimento experimental	138
4.2.6.1. Preparo da suspensão de esporos	138
4.2.6.2. Preparo dos meios de cultivo para produção de lipídio por <i>M. circinelloides</i> URM 4182	138
4.2.6.3. Cultivos de <i>M. circinelloides</i> URM4182 em shaker orbital	139
4.2.6.4. Cultivo do <i>M. circinelloides</i> URM 4182 em biorreator.....	140
4.2.6.5. Determinação do kLa.....	141
4.2.6.6. Síntese de biodiesel.....	141
4.2.6.7. Etapa de purificação dos ésteres etílicos.....	143
4.2.7. Métodos Analíticos	144
4.2.7.1 Determinação da concentração de glicose	144
4.2.7.2. Extração de lipídios da biomassa microbiana.....	144
4.2.8 Caracterização das propriedades da biomassa celular e do óleo microbiano	148
4.2.8.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da biomassa.....	148
4.2.8.2. Índice acidez do óleo microbiano	148
4.2.8.3. Determinação do perfil em ácidos graxos do óleo microbiano	148
4.2.8.4. Estudo reológico do óleo microbiano	148
4.2.8.5. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	149
4.2.9. Análise dos produtos da transesterificação	149
4.2.10. Cálculos	149
4.2.10.1. Determinação dos parâmetros bioquímicos de cultivo e análise dos resultados	149
4.2.10.2. Determinação das propriedades do biodiesel por modelos empíricos	151
4.3. Resultados e Discussão	153
4.3.1. Avaliação do potencial da linhagem <i>M. circinelloides</i> URM 4182 como fonte de produção de lipídios.....	153
4.3.2. Estabelecimento da metodologia de extração de lipídios produzidos pelo <i>M. circinelloides</i> URM 4182.....	155
4.3.3. Perfil dos ácidos graxos presentes nos óleos microbianos extraídos por diferentes métodos.....	159
4.3.4. Produção de <i>single cell oil</i> por <i>M. circinelloides</i> URM 4182 em shaker orbital.....	165
4.3.5. Produção de <i>single cell oil</i> por <i>M. circinelloides</i> URM4182 em biorreator.....	167

4.3.6. Cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 para a produção de lipídio utilizando milhocina como fonte de nutrientes.....	172
4.3.7. Estudo reológico do lipídio de <i>M. circinelloides</i> URM 4182.....	178
4.3.8. Produção de ésteres etílicos a partir de SCO de <i>M. circinelloides</i> URM 4182	180
4.3.9. Caracterização do lipídio e biodiesel de <i>M.circinelloides</i> URM4182 por meio de espectroscopia vibracional na região do infravermelho por FTIR	185
4.4. Propriedades das amostras de biodiesel obtidas	189
4.5. Pesquisas exploratórias para trabalhos futuros	191
4.5.1. Cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 para a produção de biomassa celular em pellets	191
4.5.2. Cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 para a produção de lipídio utilizando diferentes fontes de carbono	196
4.6. Conclusões	199
Referências	201
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES PARA DESENVOLVIMENTO DE TRABALHOS FUTUROS	219
ANEXOS.....	221

Capítulo 1

BIORREFINARIAS

1. BIORREFINARIAS

1.1. Contexto de Biorrefinaria

Com o surgimento de novas tecnologias baseadas em recursos renováveis, diversos países têm empregado o conceito de biorrefinaria, arquétipo de uma nova economia verde ou ambientalmente correta. Nas biorrefinarias, seriam produzidos biocombustíveis e produtos químicos de base renovável (HARISH; RAMAIAH; UPPULURI, 2015; BASTOS, 2012).

As biorrefinarias, em conceito, são consideradas similares às refinarias de petróleo, nas quais múltiplos produtos são obtidos de uma única matéria-prima. O termo foi empregado pela primeira vez em 2002 na lei agrícola americana (Farm Bill), incluindo unidades, equipamentos e processos para converter biomassa em biocombustíveis, energia e produtos químicos (BASTOS, 2012). É um conceito ainda em construção que inclui diferentes fontes de matérias-primas e tecnologias de conversão. Desta forma, as biorrefinarias podem ser classificadas de acordo com o tipo de plataforma utilizada, agrupando os tipos de produtos a serem produzidos, as matérias-primas e os processos de conversão (JIN et al., 2015; MONCADA; TAMAYO; CARDONA, 2014).

Dentre as principais classes pode-se citar: o agrupamento dos produtos em dois grupos principais, os produtos energéticos (bioetanol, biodiesel e combustíveis sintéticos) e os materiais (químicos, alimentos, ração, etc); as matérias-primas podem ser obtidas a partir de culturas energéticas, culturas alimentares, resíduos (agroindústrias, florestais ou industriais) ou ainda biomassa microbiana; os processos de conversão podem ser bioquímicos (fermentação e conversão enzimática), termoquímicos (pirólise e gaseificação), químicos (hidrólise ácida, transesterificação, etc.) e mecânicos (fracionamento, pressão, etc.) (JIN et al., 2015).

As vantagens das biorrefinarias são amplamente discutidas, uma vez que geram diversos produtos, as biorrefinarias podem explorar o potencial máximo das biomassas e agregar o maior valor possível a estas, aumentando assim a rentabilidade, reduzindo a demanda energética, bem como a emissão de gases do efeito estufa (RICO; SAUER, 2015). O amplo espectro de produtos reduz também a dependência da produção de somente um único produto, aumentando assim a sustentabilidade do uso racional da biomassa, reduzindo a competição existente entre o uso da biomassa para alimentos ou combustíveis.

No Brasil considerando a estrutura de produção existente, a gama de produtos obtida da cana-de-açúcar e o aproveitamento em larga escala de vários subprodutos do processo, pode-se afirmar que o setor sucroenergético já pratica o conceito de biorrefinaria há vários anos (RICO; SAUER, 2015).

Embora os principais produtos primários desse setor sejam o açúcar e o etanol, outros produtos importantes também são obtidos em maior ou menor escala. As diversas aplicações do etanol, seja na forma de combustível ou insumo em diversos setores, como a indústria química, farmacêutica, de cosméticos, de produtos de higiene e de alimentos, são um bom exemplo.

Outro importante exemplo que envolve o aproveitamento de subprodutos de processo é o uso do bagaço de cana para diversas aplicações, como geração de bioetanol (etanol de segunda geração), de energia térmica e elétrica, alimentação do gado e matéria-prima na produção de papel e celulose, placas de aglomerado e peças de artesanato. Outros exemplos relacionados com o aproveitamento dos subprodutos são a utilização da vinhaça como fertilizante orgânico, o aproveitamento das cinzas e fuligem da queima do bagaço em caldeiras e o uso da torta de filtro para produção de composto agrícola.

Outras biorrefinarias baseadas no tipo de matéria-prima podem ser também identificadas na literatura pertinente, tais como (HARISH; RAMAIAH; UPPULURI, 2015; RICO; SAUER, 2015):

- Biorrefinarias de planta inteira (whole plants) baseadas em grãos comestíveis (fonte de amido);
- Biorrefinarias lignocelulósicas: baseadas em matérias-primas lignocelulósica;
- Biorrefinaria aquáticas: baseadas na biomassa algal.

As biorrefinarias aquáticas têm sido descritas como uma das mais promissoras fontes de biomassa, com potencial para cumprir as metas de substituição de combustível fóssil, sem interferir em terra arável adequada para a produção de alimentos (LEE et al., 2010). Estas destacam-se por serem fontes contínuas e rápidas de óleo, que pode ultrapassar em dez vezes a produção das oleaginosas, crescem em meio aquoso, porém, necessitam de menos água do que a agricultura, podendo ser cultivadas em água de reuso, salobra e em áreas não cultiváveis para alimentos (HARISH; RAMAIAH; UPPULURI, 2015).

O cultivo de microalgas contribui para o sequestro de carbono (1 kg de biomassa seca de microalga utiliza 1,83 kg de CO₂) e não utilizam pesticidas nem herbicidas. Os

subprodutos após a extração de óleo podem ser usados como alimento, fertilizantes (BRENNAN et al., 2009) ou na indústria farmacêutica (ARJUNA, 2014). Isto abre o caminho para uma produção robusta em massa de biocombustíveis a partir de fonte microbiana e de produtos químicos finais com custos compatíveis.

Recentemente o conceito de biorrefinarias tem sido também ampliado para outros microrganismos com capacidade de acumular lipídio em organelas especializadas, sendo classificados entre as espécies denominadas oleaginosas (bactérias, leveduras e fungos) (FERREIRA et al., 2013).

Nesse contexto, os fungos filamentosos pertencentes ao filo Zigomicota e a classe Zigomiceto em função de suas propriedades estruturais e fisiológicas preenchem os requisitos para serem utilizados como núcleo central em biorrefinarias, e podem ser empregados para obtenção de diversos produtos sustentáveis (NYMAN et al., 2013; FERREIRA et al., 2013).

Adicionalmente, ao seu uso intenso no preparo de alimentados fermentados, metabólitos industriais como ácido lático, ácido fumárico e etanol, podem ser produzidos por meio de cultivo de zigomicetos uma vasta gama de matérias-primas. Esses fungos também produzem enzimas que facilitam assimilação de substratos complexos como, por exemplo, amido, celulose, que são relevantes sob o ponto de vista industrial. As enzimas produzidas são capazes de catalisar várias reações envolvidas na produção de biodiesel, preparo de drogas corticóides, entre outras.

A biomassa produzida no cultivo de zigomicetos contém quantidades consideráveis de proteínas, lipídios, aminoácidos, quitosana e quitina, como ilustrado na Figura 1.1 (FERREIRA et al., 2013).

Candida boidinii, *Candida curvata*, *Candida oleophila*, *Candida pulcherrima*, *Candida echinulata*, *Mortierella isabellina*, *Mortierella ramanniana*, *Mucor* sp., *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula* sp., *Thamnidium elegans*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygorhynchus moelleri* são fungos pertencentes à classe dos Zigomicetos (PAPANIKOLAOU et al., 2011), entre os quais o gênero *Mucor* tem grande importância biotecnológica por ser uma fonte de carotenos e lipídios, pois acumula altos níveis desses compostos em seu micélio. Essa propriedade tem sido muito destacada, uma vez que sua biomassa pode ser convertida facilmente em monoésteres, o que torna essa espécie uma fonte alternativa de oleaginosas para a produção de biodiesel (SITEPU et al., 2015).

Figura 1.1. Potenciais produtos obtidos a partir do cultivo de Zigomicetos

Fonte: Adaptado de (FERREIRA et al., 2013).

Entre os maiores produtores de lipídios destaca-se o fungo *Mucor circinelloides* que apresenta lipídios ricos em ácidos graxos poli-insaturados, principalmente ácido- γ -linolênico (GLA, 18:3, n-6) de alta demanda comercial. Adicionalmente, os lipídios microbianos produzidos por essa espécie mostraram elevado teor (> 85%) de matéria saponificável e perfil de ácidos graxos adequado para a produção de biodiesel (VONGSANGNAK et al., 2012).

1.2. Trabalhos anteriores desenvolvidos

O Grupo de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo vem aprimorando técnicas para a produção enzimática de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas lipídicas. Em trabalhos anteriores verificou-se que o fungo *Mucor circinelloides* é um potente produtor de enzimas, particularmente lipase ligada ao micélio e, além disso, tem a habilidade de produzir lipídios quando submetidos a condições adequadas.

As pesquisas relacionadas à obtenção de lipases ligadas ao micélio pelo fungo *Mucor circinelloides* tiveram início com o desenvolvimento da tese de doutorado defendida em 2012 (ANDRADE, 2012). O trabalho teve como enfoque o estabelecimento de processo de obtenção de biodiesel por via enzimática, incluindo desde seleção da

linhagem de fungo filamentoso mais promissora para obtenção de elevada atividade lipolítica (*Mucor circinelloides* URM 4182) até a utilização das células íntegras imobilizadas na síntese de biodiesel a partir de óleo de babaçu em regime descontínuo e contínuo (ANDRADE et al., 2012, ANDRADE et al., 2014). Entretanto, a habilidade da linhagem selecionada de *Mucor circinelloides* URM 4182 em acumular lipídios não foi explorada.

Desta forma, no presente trabalho, pretende-se aprofundar os estudos desta particular linhagem de fungo dando continuidade aos testes de síntese de biodiesel a partir de diferentes fontes de óleos vegetais mediada por células íntegras de *Mucor circinelloides* URM 4182 imobilizadas. Será também explorada a habilidade desta particular linhagem em produzir biomassa rica em lipídios para posterior aplicação como matéria-prima de terceira geração na produção de biodiesel.

1.3. Objetivo do presente estudo

O objetivo desse trabalho foi explorar importantes aplicações biotecnológicas da linhagem de *Mucor circinelloides* URM 4182, tais como sua capacidade de produção de enzimas, particularmente lipases, e biomassa rica em lipídios (single cell oil), e seu uso como potencial matéria-prima para o campo da biorrefinaria. Para alcançar o objetivo proposto, foram executadas as seguintes atividades.

- ✓ Validar o desempenho da lipase de *Mucor circinelloides* imobilizada na síntese do biodiesel a partir de diferentes óleos vegetais (andiroba, coco, macaúba, palma e pinhão manso) tendo etanol como agente acilante, utilizando as condições estabelecidas anteriormente;
- ✓ Investigar o acúmulo de lipídios (*Single cell oil*) pela estirpe de *Mucor circinelloides* visando explorar o seu potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel.

1.4. Estrutura da tese

O presente trabalho de tese encontra-se organizado em 5 capítulos. No primeiro Capítulo apresentam-se as definições básicas relacionadas à biorrefinaria, seus diferentes tipos, abordando aquelas que utilizam biomassa microbiana como ponto de partida. O capítulo também inclui os objetivos propostos e a estrutura do trabalho.

No segundo Capítulo são abordadas as informações gerais sobre biodiesel, importância na matriz energética, dados sobre o mercado mundial e brasileiro, descrição dos processos de obtenção, disponibilidade de matérias-primas, tipos catalisadores e normas de qualidade para uso deste produto como combustível.

No Capítulo 3 descreve-se a parte conceitual, metodologia e dados experimentais do processo de obtenção de biodiesel a partir de óleos vegetais, utilizando células íntegras do fungo *Mucor circinelloides* URM 4182 como catalisador.

A produção de biodiesel a partir de óleo microbiano é detalhada no Capítulo 4, incluindo a estratégia geral adotada na pesquisa, procedimentos metodológicos e os resultados obtidos nas diferentes etapas do processo, em especial do processo de obtenção do biodiesel partir do óleo microbiano. No quinto Capítulo deste trabalho são apresentadas as conclusões gerais, assim como sugeridas as propostas para desenvolvimento de trabalhos posteriores.

Referências

- ANDRADE, G. S. S. **Produção de biodiesel a partir de óleos vegetais usando células íntegras imobilizadas de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica (Glicerol Éster Hidrolase – EC 3.1.1.3)**. 2012. 158f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2012.
- ANDRADE, G. S. S.; CARVALHO, A. K. F.; ROMERO, C. M.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 37, p. 2539-2548, 2014.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Screening immobilization and utilization of whole cell biocatalyst to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183– 188, 2012.
- ARJUNA, A. Production of polyunsaturated fatty acids by fungi: a review, **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 5, p. 931-954, 2014.
- BASTOS, V. D. Biorrefinaria, biocombustíveis e química renovável: revolução tecnológica e financiamento. **Revista BNDES**, v. 38, p. 1-27, 2002.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.
- HARISH, B.S.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Bioengineering strategies on catalysis for the effective production of renewable and sustainable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 533-547, 2015.
- FERREIRA, J. A.; LENNARTSSON, P. R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 523-532, 2013.
- JIN, M.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; WAGHMODE, S.; MOSER, B. R.; ORJUELA, A.; SOUSA, L. C.; BALAN, V. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 33, p. 43-45, 2015.
- MONCADA J.; TAMAYO J. A.; CARDONA C. A.; Tech-economic and environmental assessment of essential oil extraction from Citronella (*Cymbopogon winteriana*) and Lemongrass (*Cymbopogon citratus*): a Colombian case to evaluate different extraction technologies. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 175-184, 2014.
- NYMAN J.; LACINTRA M. G.; WESTMAN J. O.; BERGLIN M.; LUNDRIN M.; LENNARTSSON P. R.; TAHERZADEH M. J.; Pellet formation of zygomycetes and immobilization of yeast. **New Biotechnology**, v. 30, p. 516, 2013.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Part I: biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 1031-1051, 2011.
- RICO, J. A. P.; SAUER, I. L. A review of Brazilian biodiesel experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 513-529, 2015.

SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D.; BLOCK, D. E.; GERMAN, J. B.; BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1336-1360, 2014.

VONGSANGNAK, W.; RUENWAI, R.; TANG, X.; HU, X.; ZHANG, H.; SHEN, B.; SONG, Y.; LAOTENG, K. Genome-scale analysis of the metabolic networks of oleaginous Zygomycete fungi. **Gene**, v. 521, p. 180–190, 2013.

Capítulo 2

Produção de Biodiesel

2. PRODUÇÃO DE BIODIESEL

2.1. Biocombustíveis como fonte renovável de energia

Biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores à combustão ou em outro tipo de geração de energia. Os principais argumentos para promover os biocombustíveis são os seus efeitos positivos, uma vez que eles surgiram como uma das mais significativas fontes de energia sustentável para atender três importantes políticas de desenvolvimento: a segurança energética mundial, o desenvolvimento econômico e a proteção ambiental (BAUTISTA et al., 2016; ANP, 2015; HARISH; RAMAIAH; UPPULURI, 2015).

Especialmente nos últimos anos observou-se um aumento na produção e uso de biocombustíveis, que estão sendo introduzidos no mercado, em virtude do encarecimento do petróleo e da depleção das matrizes energéticas, além da preocupação ambiental. A crescente demanda por novas fontes de energia torna os biocombustíveis uma boa alternativa aos combustíveis fósseis, em razão da sua natureza renovável, ampla disponibilidade, biodegradabilidade e sua capacidade de gerar gases atóxicos. São considerados biocombustíveis: biocarvão, bioetanol, biobutanol, biodiesel, biohidrogênio e biometano (BAUTISTA et al., 2016; RICO; SAUER, 2015).

Durante os anos 90 vários programas de incentivo foram criados para encorajar o uso de biocombustíveis nos Estados Unidos ("Clean Air Act Amendments"; "Reformulated Gasoline Program" (RFG Program); "Energy Policy Act" (EPACT)) e na União Europeia, ("Common Agricultural Policy" (CAP) (RICO; SAUER, 2015).

No mercado dos biocombustíveis, ainda em formação, os países latino-americanos são vistos como potenciais fornecedores, visto que apresentam vantagens na produção de biocombustíveis por possuírem grande disponibilidade de terras aráveis, condições climáticas favoráveis à agricultura e baixos custos com mão de obra (BAUTISTA et al., 2016; BALAT, 2011). Nos anos 2000, vários programas foram criados como estratégia de incentivo à produção e ao uso dos biocombustíveis nos países latino-americanos: Argentina (Lei 26,093/2006); Chile (Decreto 11/2008); Equador (Decreto 2332/2004); Peru (Lei 28054/2003); Uruguai (Lei 18195/ 2007); Costa Rica (Decreto 31087/2003); Guatemala (Decreto 52/2003); Colômbia (Programa de Biogás- Lei 693/2001, Programa de Biodiesel - Lei 939/2004); Paraguai (Biocombustíveis Lei 2748/2005) (RICO; SAUER, 2015; HARISH; RAMAIAH; UPPULURI, 2015; MASIERO; LOPES, 2008).

No Brasil, a produção de biocombustíveis começou em 1920 com o Programa Nacional do Álcool - Proálcool e anos mais tarde em meio a depleção do petróleo na década de 70, foi criado o programa de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos-Pro-óleo. Em 2004, uma nova proposta para a produção de biocombustível foi introduzida por meio do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel – PNPB (RICO; SAUER, 2015).

Em geral, os biocombustíveis são classificados como de primeira, segunda, terceira e quarta geração tendo como base a matéria-prima e a tecnologia empregada na sua produção (Figura 2.1).

Figura 2.1. Classificação dos biocombustíveis de acordo com a natureza, origem, processo de produção e matéria-prima.

Fonte: Adaptado de (HARISH; RAMAIAH; UPPULURI, 2015).

2.2. Biocombustíveis no Brasil

Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil, são o etanol obtido a partir da cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel, produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis (BAUTISTA et al., 2016; HARISH; RAMAIAH; UPPULURI, 2015; ANP, 2015).

No Brasil, a produção de álcool combustível foi iniciada em 1920 visando reduzir as importações de gasolina, mas foi somente com o advento do Proálcool, em novembro de 1975, que seu papel ficou claramente definido, permitindo que o setor privado investisse maciçamente no aumento de produção.

Na primeira fase do programa, até 1979, foi dada ênfase à produção de etanol anidro para ser misturado à gasolina. Na segunda fase, a ênfase foi também direcionada para a produção de etanol hidratado, usado puro em motores adaptados para este combustível. O Proálcool tinha como objetivo garantir o suprimento de etanol no processo de substituição da gasolina e apoiar o desenvolvimento tecnológico da indústria sucroalcooleira (ANP, 2015; RICO; SAUER, 2015).

No Brasil, no final da década de 70 em plena crise do petróleo, foi também proposto o programa de incentivo a utilização de óleos vegetais para fins energéticos (Pro-óleo), entretanto, este programa nunca foi totalmente implementado. Uma nova proposta para a produção de biocombustível baseado em óleos vegetais, somente foi introduzida em 2004, por meio do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel – PNPB (RICO; SAUER, 2015).

A produção de biodiesel é considerada área prioritária para desenvolvimento no país e desde 1º de novembro de 2014, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 7% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), que aumentou de 5% para 7% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel. A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do PNPB e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis (ANP, 2015).

O Brasil, devido ao seu pioneirismo no setor de biocombustíveis, tem firmado parcerias de transferência de tecnologia com vários países e está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2013, de 2,9 bilhões de litros e uma capacidade instalada, no mesmo ano, para cerca de 7,9 bilhões de litros (ANP, 2015).

2.3. Biodiesel

Biodiesel é definido pelo Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) como um “biocombustível derivado de fontes renováveis para uso em motores de combustão interna com ignição ou para a geração de outro tipo de energia que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis fósseis” (LOURINHO; BRITO, 2015;

ADEWALE; DUMONTN; NGADI, 2015; AVHAD; MARCHETTI, 2015). Pode ser usado puro ou misturado ao diesel de petróleo, pois possui características semelhantes (BAUTISTA et al., 2016; ADEWALE; DUMONTN; NGADI, 2015; AVHAD; MARCHETTI, 2015).

O biodiesel é também definido como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos, produzido a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois de cadeia curta, gerando glicerol como coproduto (LOURINHO; BRITO, 2015; ADEWALE; DUMONTN; NGADI, 2015; LI et al., 2012).

Na comparação com o diesel de petróleo, o biodiesel possui significativas vantagens ambientais. Estudos conduzidos no National Biodiesel Board (associação que representa a indústria de biodiesel nos Estados Unidos) demonstraram que a queima de biodiesel pode emitir em média 48% menos monóxido de carbono; 47% menos material particulado (que penetra nos pulmões); 67% menos hidrocarbonetos. Nesse cenário, o biodiesel se destaca por se tratar de um biocombustível renovável, sendo uma evolução na tentativa de substituição do óleo diesel por biomassa renovável (ANP, 2015; RICO; SAUER, 2015; SOLOMON et al., 2014; LI et al., 2012)

Além da diminuição da dependência do diesel importado, o biodiesel traz outros efeitos indiretos de sua produção e uso, como o incremento às economias locais e regionais, tanto na etapa agrícola como na indústria de bens e serviços. Com a ampliação do mercado do biodiesel, milhares de famílias brasileiras são beneficiadas, principalmente os agricultores do semiárido brasileiro, com o aumento de renda proveniente do cultivo e comercialização das plantas oleaginosas utilizadas na produção do biodiesel (RICO; SAUER, 2015; SOLOMON et al., 2014).

O que faz do biodiesel um combustível renovável é o fato de que todo o CO₂, emitido na queima no motor, é sequestrado por meio da fotossíntese das plantas e utilizado por estas durante o seu crescimento. Tais plantas podem ser utilizadas mais tarde como fonte de biomassa para a produção de novos biocombustíveis, e por esse motivo, são chamados de energias renováveis (LAL, 2008).

2.4. Processos de obtenção de biodiesel

Os problemas críticos da utilização dos óleos e gorduras *in natura* estão diretamente relacionados com a sua elevada viscosidade, baixa volatilidade e caráter poli-insaturado. Em virtude desses inconvenientes vários métodos têm sido investigados para reduzir a elevada viscosidade das matérias-primas lipídicas e, assim, permitir o seu uso em

motores diesel sem problemas operacionais, como a formação de incrustações e depósitos (KNOTHE et al., 2006). A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), na Resolução ANP nº 45 de 25 de agosto de 2014, regulamentou apenas o uso de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos por meio dos métodos de transesterificação ou esterificação.

A *transesterificação* é considerada a melhor rota para a utilização dos óleos vegetais como alternativa ao diesel fóssil, pois confere ao produto (biodiesel) características como viscosidade e índice de cetano muito próximas das do diesel. Os óleos e gorduras quando submetidos ao processo de transesterificação sofrem quedas bruscas nos valores do ponto de névoa e viscosidade, podendo assim o combustível obtido ser queimado diretamente em motores diesel sem a necessidade de adaptação (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

A *esterificação* é a rota na qual um ácido graxo reage com um álcool de cadeia curta, também na presença de catalisador, dando origem a mono ésteres de ácidos graxos (SUAREZ; MENEGHETTI, 2007).

A *hidroesterificação* é um método alternativo conduzido em duas etapas consecutivas, consistindo da hidrólise total dos triacilgliceróis, produzindo ácidos graxos livres e glicerol, seguida da esterificação dos ácidos graxos livres com álcool. A hidroesterificação permite o uso de qualquer matéria-prima (gordura animal, óleo vegetal, óleo usado em cozinha, resíduos ácidos provenientes da produção de óleos vegetais, entre outros) independente do grau de acidez e conteúdo de água (KUSS et al., 2015). É uma rota de produção de biodiesel ainda pouco explorada, devido a necessidade de uma etapa intermediária de separação/purificação dos ácidos graxos livres obtidos na primeira etapa (hidrólise).

2.4.1. Síntese de biodiesel por transesterificação

Tradicionalmente, a produção de biodiesel em escala industrial ocorre pela transesterificação de óleos vegetais utilizando catalisadores homogêneos e metanol como agente acilante. Embora seja um processo simples, rápido e com alto rendimento, apresenta algumas desvantagens e limitações. Desta forma, a substituição da catálise homogênea pela heterogênea e a substituição do metanol por etanol surge como uma opção tecnológica interessante, pois atende a demanda por processos menos poluentes e mais seletivos (BRUNSCHWIG; MOUSSAVOU; BLIN, 2011; ENDALEW; KIROS; ZANZI, 2011; KISS; JOVANOVIĆ; BOSKOVIĆ, 2010; VIETEZ et al., 2010).

A reação geral de transesterificação é apresentada na Figura 2.2 e o mecanismo de reação (Figura 2.3) indica que o processo ocorre em três etapas consecutivas e reversíveis: na primeira etapa, os triacilgliceróis são convertidos para diacilgliceróis, os quais serão convertidos a monoacilgliceróis na etapa posterior e por último, os monoacilgliceróis em éster liberando glicerol como subproduto. Em cada etapa da reação, ocorre a liberação de uma molécula do éster de interesse (biodiesel). O biodiesel formado deve ser purificado antes de sua utilização em motores e a glicerina pode ser recuperada, uma vez que possui alto valor agregado, aumentando o lucro inerente ao processo (LOURINHO; BRITO, 2015; ADEWALE; DUMONTN; NGADI, 2015; BHUIYA et al., 2015; KNOTHE et al., 2006).

Figura 2.2. Representação esquemática da reação global de transesterificação

Fonte: Adaptado (LOURINHO; BRITO, 2015).

Figura 2.3. Representação esquemática das etapas envolvidas na transesterificação

Fonte: Adaptado (LOURINHO; BRITO, 2015).

2.5. Catalisadores

Atualmente, os catalisadores homogêneos alcalinos apresentam elevado rendimento na obtenção de biodiesel (tanto cineticamente, quanto economicamente) e são universalmente usados na indústria, apesar de ter algumas desvantagens importantes. Os catalisadores alcalinos mais usados são: hidróxidos de sódio (NaOH) ou potássio (KOH), seguidos dos alquilatos metálicos (metóxido ou etóxido de sódio), metais sódio e liga sódio-potássio. Os problemas típicos associados ao uso desses catalisadores são o alto consumo de energia, dificuldade na recuperação do produto, reações de saponificação e a geração de grandes quantidades de águas residuais durante a purificação do biodiesel (ADEWALE; DUMONTN; NGADI, 2015; PANNEERSELVAM et al., 2015; LOURINHO; BRITO, 2015).

Uma série de catalisadores químicos e bioquímicos com características de ação heterogênea vem sendo intensivamente pesquisada nos últimos anos, o que se reflete no número crescente de publicações e patentes na área. Na literatura podem ser encontrados diversos tipos de catalisadores heterogêneos que, em geral, podem ser classificados em três grandes grupos: catalisadores sólidos alcalinos, catalisadores sólidos ácidos e catalisadores sólidos bioquímicos (ZHAO et al., 2015; AVHAD; MARCHETTI, 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; MOUNGUENGUI et al., 2013).

Na Tabela 2.1 são apresentados exemplos de catalisadores homogêneos e heterogêneos, normalmente utilizados para síntese de biodiesel. Vantagens e desvantagens associadas ao uso desses catalisadores são também listadas.

O uso de catalisador heterogêneo minimiza os problemas relativos às etapas finais de purificação do biodiesel, permitindo a redução dos custos dos processos em virtude da diminuição do número de operações associadas (ADEWALE; DUMONTN; NGADI, 2015; PANNEERSELVAM et al., 2015; LOURINHO et al., 2014; HARISH; RAMAIAH; UPPULURI, 2015; BASUMATARY, 2013; KISS; JOVANOVIĆ; BOSKOVIĆ, 2010).

A potencialidade dos catalisadores heterogêneos químicos para a produção do biodiesel foi publicada numa ampla revisão bibliográfica por Cordeiro e colaboradores (2011), incluindo as seguintes classes: zeólitas, óxidos e sais inorgânicos, compostos de coordenação e líquidos iônicos, resinas trocadoras de íons, ácidos e bases orgânicos.

Alguns exemplos listados como eficientes e bastante aceitáveis em nível ambiental destacados por Suarez et al., 2007, são as resinas de troca iônica (Amberlyst 15, Smopex-101 e Purolite CT-175), zeólitas do tipo titanossilicato ou titano-aluminossilicado, como as comerciais ETS-4 e ETS-10, óxidos de alumínio dopados com hidróxido de sódio (Na/NaOH/ γ -alumina57) ou óxidos de estanho e zinco ((γ -Al₂O₃)X (SnO)Y(ZnO)Z), óxidos sulfatados e ácido nióbico (Nb₂O₅. nH₂O).

Tabela 2.1. Exemplos de catalisadores usados na produção de biodiesel

Tipo	Exemplo	Vantagens	Desvantagens
Alcalinos	Homogêneos NaOH, KOH Metóxidos	Alta atividade catalítica; baixo custo; cinética favorável, fáceis condições de operação	Requerem baixos níveis de ácidos graxos livres (AGL) e condições anidras; Formação de sabões e emulsões; Dificuldade na purificação da água residuária
	Heterogêneos CaO, CaTiO ₃ , KOH/NaY, zeolita, alumina/sílica	Não são corrosivos, ambientalmente favoráveis; reutilizáveis; fácil separação; alta seletividade; maior tempo de vida útil do catalisador	Requerem baixos níveis de AGL, condições anidras requer alta proporção molar de álcool e óleo; Limitação de difusão e alto custo
Ácidos	Homogêneos Ácido sulfúrico concentrado	Catalisa simultaneamente a esterificação/transesterificação; evita formação de sabão	Corrosão de equipamentos; Geração de resíduo da etapa de neutralização
	Heterogêneos Nb ₂ O ₅ , ZnO/I ₂ , ZrO ₂ /SO ₄ ²⁻ , TiO ₂ /SO ₄ ²⁻ , zircônia sulfatada, fosfato de vanádio, ácido nióbio	Catalisa simultaneamente a esterificação/transesterificação; Reutilizável ecofavoráveis.	Baixas concentrações locais de ácido; Baixa microporosidade; Requer alta temperatura e pressão de reação; Limitações de difusão; Alto custo
Enzimas	Lipases	Catalisa simultaneamente a esterificação/transesterificação Evita a formação de sabão; fácil purificação; não poluente; especificidade; reutilizável.	Custo elevado; Sensibilidade à desnaturação na presença de elevadas proporções de álcool, principalmente, metanol.

Fonte: Adaptada de (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

Entre os catalisadores heterogêneos bioquímicos, a lipase tem despertado grande interesse para uso na transesterificação de matérias-primas lipídicas, por se tratar de um catalisador eficiente, capaz de atuar em condições brandas de temperatura e pressão e também devido ao elevado rendimento reacional. Em função das vantagens oferecidas, a via enzimática tem sido a mais estudada e empregada em trabalhos de pesquisa nos últimos anos (ZHAO et al., 2015; AVHAD; MARCHETTI, 2015; LEE et al., 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; MOUNGUENGUI et al., 2013). No entanto, a produção do biodiesel em escala industrial utilizando lipases, é um processo ainda escasso. Du et al. (2008) relataram que existe um processo em escala industrial implantado na China, com uma capacidade de 20.000 toneladas de éster por ano, entretanto esta foi a única informação que os autores forneceram. O limitado uso do processo enzimático se deve ao elevado custo das lipases. Desta forma, é importante encontrar estratégias que reduzam o custo da produção das lipases e aumentem a eficiência de catálise.

2.6. Matérias-primas para a produção de biodiesel

2.6.1. Matérias-primas lipídicas

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água, de origem animal ou vegetal, formados predominantemente por ésteres de triacilgliceróis, produtos resultantes da esterificação entre o glicerol e ácidos graxos. Os ácidos graxos mais comuns encontrados naturalmente nos óleos e gorduras são láurico (12:0), palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1) e linoleico (18:2). Além da presença dos ácidos graxos os óleos também apresentam outros componentes adicionais, tais como fosfolipídios, carotenoides, tocoferóis e água (MARCHETT, 2012; ONG et al., 2013; PAPP et al., 2010).

A matéria-prima lipídica corresponde de 60 a 80 % do custo total de produção do biodiesel. Um dos grandes desafios dos processos de produção de biocombustíveis é dispor de matérias-primas capazes de atender às expectativas dos programas energéticos sem impactar de forma significativa a produção de alimentos. Portanto, se faz necessário o uso de uma ampla gama de matérias-primas alternativas aos óleos comestíveis, tais como os óleos não comestíveis, óleos residuais, gorduras animais e lipídios microbianos para diminuir o custo da produção de biodiesel em escala industrial (BHUIYA et al., 2015; RICO; SAUER, 2015; SOLOMON et al., 2014).

O biodiesel é caracterizado de acordo com a matéria-prima lipídica utilizada, em: biodiesel de primeira, de segunda e de terceira geração, conforme apresentado na Tabela 2.2. Mais de 70% das matérias-primas empregadas na produção do biodiesel provém de óleos vegetais comestíveis, uma vez que as propriedades dos seus derivados ésteres (biodiesel) atendem as especificações para serem utilizados como substituto ao óleo diesel e a cadeia de produção das fontes oleaginosas comestíveis é bem estabelecida. Entretanto, a utilização pode ocasionar alguns inconvenientes, como a possibilidade de competição entre a cadeia alimentícia e de biocombustíveis, o que implicaria na elevação do preço de ambos os produtos (LOURINHO; BRITO, 2015; SOLOMON et al., 2014; ONG et al., 2013; MARCHETT, 2012; AHMAD et al. 2011).

Tabela 2.2. Matérias-primas lipídicas utilizadas na produção de biodiesel

1ª Geração		2ª Geração		3ª Geração
Óleos Comestíveis	Óleos não comestíveis	Gordura animal	Óleos Residuais	Óleos de Alga
Amendoim	Café	Banha de porco	Óleos de fritura	<i>Cianobactéria</i>
Canola	Camelina	Gordura de frango		<i>Chlorella protothecoides</i>
Cevada	Crambe	Óleo de peixe		<i>Chlorella vulgaris</i>
Coco	Jojoba	Sebo bovino		<i>Scenedesmus</i> sp.
Farelo de arroz	Macaúba			<i>Nannochloropsis</i> sp.
Gergilim	Mamona			<i>Pithophora</i>
Girassol	Moringa			<i>Spirogyra</i>
Milho	Pinhão manso			<i>Isochrysis galbana</i>
Palma	Tabaco			<i>Microcystis</i>
Soja				

Fonte: Adaptado de (BHUIYA et al., 2015; KUMAR; SHARMA, 2015).

Culturas de soja, colza, palma e girassol são consideradas matérias-primas para a produção de biodiesel de primeira geração, porque foram as primeiras culturas utilizadas para produzir o biodiesel, no entanto, estas oleaginosas estão inseridas na cadeia alimentar. Deste modo, para reduzir a dependência do óleo comestível, matérias-primas não comestíveis, tais como pinhão-manso, jojoba, tabaco, óleo de peixe, sebo bovino, banha de porco, óleos e gorduras residuais, têm sido intensamente investigadas nos últimos anos

para a produção do biodiesel considerado de segunda geração. Estas matérias-primas não comestíveis apresentam elevado teor de óleo e são semelhantes às comestíveis, em termos de produção e qualidade do biodiesel formado (BHUIYA et al., 2015; KUMAR; SHARMA, 2015; AHMAD et al., 2011).

A fim de reduzir a demanda por óleos comestíveis na produção de biodiesel, as matérias-primas de terceira geração, como as derivadas de microrganismos fotossintéticos (microalgas e cianobactérias), têm emergido como uma das mais promissoras fontes lipídicas devido principalmente à elevada eficiência fotossintética de produção de biomassa, rápida taxa de crescimento e produtividade quando comparada à culturas convencionais. Além da rápida reprodução elas são mais fáceis de cultivar do que muitos outros tipos de plantas superiores e podem produzir um alto rendimento de óleo para a produção de biodiesel (BHUIYA et al., 2015; KUMAR; SHARMA, 2015; HADDAD; FAWAZ, 2013; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2013; DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011; AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011). No entanto, o cultivo de microrganismos fotossintéticos requer grandes áreas, iluminação artificial, longo período de fermentação o que eleva o custo desta técnica e a torna menos apreciável para a produção de biodiesel (CHEN et al., 2015; MILLEDGE; HEAVEN, 2013).

Uma alternativa aos óleos vegetais e aos lipídios de microalgas e cianobactérias são os óleos microbianos produzidos por leveduras, fungos e bactérias, pois estes microrganismos acumulam lipídios como um material de reserva durante seu crescimento em meios específicos e podem ser um novo recurso para a produção de biodiesel. Nos últimos anos, as pesquisas de novas espécies produtoras de óleos, permitiram um melhor entendimento das vias metabólicas para a produção de lipídio microbiano e a otimização de processos de cultivo utilizando como substratos vários tipos de biomassas residuais (SITEPU et al., 2015; LIANG; JIANG, 2015; MARTINEZ et al., 2015; FERREIRA et al., 2013).

2.6.2. Matérias-primas alcoólicas

As matérias-primas alcoólicas que podem ser usadas no processo de produção de biodiesel, incluem metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico. Dentre estes, o metanol e o etanol são os álcoois mais frequentemente usados. O metanol é especialmente usado devido ao seu baixo custo e vantagens físicas e químicas, pois pode reagir com triacilglicerois rapidamente, além de dissolver facilmente catalisadores alcalinos.

Entretanto, devido ao seu baixo ponto de ebulição, há grande risco de explosões relativo aos seus vapores, que são incolores e inodoros, tornando-se um material extremamente perigoso e que deve ser manipulado cuidadosamente (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). A Tabela 2.3 mostra as principais vantagens e desvantagens da utilização do etanol ou metanol como agente acilante na produção de biodiesel.

Tabela 2.3. Comparação das vantagens e desvantagens do etanol e metanol como agente acilante na obtenção de biodiesel

Etanol	Metanol
Origem renovável	Derivado do petróleo
Produto nacional	O país é importador do produto
Não tóxico	Tóxico
Processo complexo de separação da glicerina	Processo simples de separação da glicerina

Fonte: própria

A substituição do metanol por etanol é uma estratégia incentivada pelo governo brasileiro em função da disponibilidade deste álcool no país, o qual é produzido em larga escala para ser misturado à gasolina, além de ser um produto obtido de fontes renováveis, tornando o processo de obtenção de biodiesel totalmente independente do petróleo, promovendo, desta forma, a produção de combustível completamente por meio de fontes renováveis. Esta opção, quando associada ao uso de processos enzimáticos em substituição a via química tradicional pode tornar a produção de biodiesel um processo totalmente inserido nos conceitos de rotas ambientalmente favoráveis (ADEWALE; DUMONTN; NGADI, 2015; PANNEERSELVAM et al., 2015; LOURINHO et al., 2014).

Destaca-se ainda que biodiesel etílico possa reduzir a opacidade na fumaça que o biodiesel metílico emite, sua temperatura de combustão é menor, significando, entre outras vantagens, redução nas emissões de particulados (BRUNSCHWIG; MOUSSAVOU; BLIN, 2011).

Deste modo, a implementação do biodiesel de natureza etílica no mercado nacional vem se consolidando cada vez mais, devido ao interesse crescente das empresas em investirem em negócios sustentáveis do ponto de vista econômico, ambiental e social. Além disso, existe uma grande valorização dos produtos químicos produzidos a partir de

recursos renováveis e ao baixo custo do etanol brasileiro (FAROBIE; MATSUMARA; 2015; YUSOFF; XU; GUO, 2014).

2.7. Propriedades do biodiesel

O biodiesel pode ser utilizado como combustível puro, na forma de mistura, como complemento ao diesel extraído de petróleo, ou em baixas proporções como aditivo. Uma importante vantagem do biodiesel é sua adaptabilidade aos motores do ciclo diesel. Enquanto o uso de outros combustíveis limpos, como o gás natural ou biogás, requer adaptação dos motores, a combustão de biodiesel pode dispensá-la, configurando-se em uma alternativa técnica capaz de atender a frota movida a diesel (RAMOS et al., 2003; PINTO et al., 2005).

As propriedades dos ésteres de ácidos graxos que constituem o biodiesel determinam as propriedades finais do combustível. Estas propriedades são determinadas pelas características estruturais das moléculas de ácidos graxos e do agente acilante (álcool) que geram o éster. Algumas das características estruturais que influenciam nas propriedades do biocombustível são: o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações nas moléculas de ácidos graxos (KNOTHE et al., 2003). Sendo assim, para um bom funcionamento nos motores, é necessário analisar e conhecer as propriedades físicas e químicas do biodiesel. A padronização do biodiesel é estabelecida por normas, dentre as quais se destacam as mais utilizadas: ASTM D6751 (American Society for Testing and Materials - Estados Unidos), EN 14214 (European Norm - Europa) e ANP 255 (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - Brasil) (KNOTHE et al., 2006).

A análise destas características são fatores determinantes para a obtenção de um biocombustível de alta qualidade, sendo que as análises químicas e físicas são conduzidas por metodologias variadas, de modo a verificar a qualidade do biodiesel, tais como: número de cetano, calor de combustão, viscosidade, ponto de névoa, ponto de fluidez, entre outras (KNOTHE et al., 2006).

No Brasil, por meio da Portaria 255 de 15/09/03, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) estabeleceu as especificações iniciais para o biodiesel puro a ser adicionado no óleo diesel automotivo para testes em frotas cativas ou para uso em processo industrial específico nos termos da Portaria 240 de 25/08/03. Posteriormente, a especificação para o biodiesel foi publicada na Resolução ANP nº 42 de 24 de novembro de 2004.

Em 2010 foi promulgada a resolução ANP nº 4, de 2 de fevereiro de 2010, que alterou o parágrafo único do art. 1º, o item 2.1 Métodos ABNT e a tabela do Regulamento Técnico ANP nº 1/2008, todos dispositivos da Resolução ANP nº 7/08, que dispõe sobre a especificação do biodiesel.

Em 2012 foi promulgada a resolução ANP nº 14, de 11 de maio de 2012, na qual está atualizado o Regulamento Técnico nº 4/2012 de acordo com a nova especificação do biodiesel.

Atualmente a legislação vigente que estabelece a especificação do biodiesel e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional foi publicada na Resolução ANP Nº 45 de 25 de agosto de 2014.

A especificação brasileira é similar à europeia e americana, com alguma flexibilização para atender às características de matérias-primas nacionais. Sendo que, para alguns itens, a ANP não estabeleceu um valor máximo ou mínimo de referência. Por outro lado, algumas propriedades são mais criteriosas, como a viscosidade (realizada a 20°C) e o índice de iodo (indicador de ligações duplas e, portanto, do nível de insaturação do biodiesel). Isto visa não criar obstáculos à utilização de algumas matérias-primas, como a mamona (alta viscosidade) ou a soja e o girassol (alto teor de ácido linoleico, poli-insaturado e, portanto, com alto índice de iodo).

- Número de cetano: O número de cetano é um indicativo adimensional da qualidade de ignição de um combustível diesel. Esta propriedade é similar à octanagem, termo mais conhecido e usado para a gasolina e álcool. Um combustível com alta octanagem tende a ter baixo número de cetano, em outras palavras, a octanagem por definição indica a dificuldade de explosão, enquanto a cetanagem indica a facilidade dela.

O combustível de referência de alta qualidade para determinar o número de cetano é o hexadecano ($C_{16}H_{34}$), um hidrocarboneto de cadeia linear longa. O número de cetano de um combustível diesel é determinado pelo tempo de retardamento da ignição, isto é, pelo tempo que passa entre a injeção do combustível nos cilindros e a ocorrência da ignição. Valores fora de uma faixa adequada para combustíveis diesel ocasionam problemas no bom funcionamento do motor. Combustíveis com alto número de cetano, a combustão pode ocorrer antes do combustível e do ar estarem apropriadamente misturados, resultando na emissão de fumaça e uma combustão incompleta. Valores de número de

cetano muito baixo podem ocasionar trepidações no motor, falhas no funcionamento, aumento excessivo na temperatura do ar, aquecimento lento do motor na partida fria (1ª partida do dia) (KNOTHE et al., 2006).

É importante ressaltar que nem sempre é possível realizar testes para determinar o número de cetano devido ao alto custo dos combustíveis de referência e também por se tratar de uma análise que necessita de uma grande quantidade de amostra (o que dificulta pesquisas em escala de bancada). Assim, métodos alternativos foram desenvolvidos, visando estimar o número de cetano do biodiesel, a partir da mistura de ésteres alquílicos, tomando por base a utilização de equações empíricas (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014).

Sabe-se que o índice de cetano do biodiesel depende da matéria-prima utilizada para a sua produção. Quanto maior as cadeias carbônicas de ácidos graxos e mais saturados, maior será o número de cetano. É evidente que o número de cetano se encaixa de forma linear com o grau de insaturação. Portanto, existe uma faixa para o número de cetano de acordo com cada norma, que é recomendada para atender as especificações.

Segundo a norma europeia, o número de cetano deve ser no mínimo 51. Portanto, matérias-primas com elevado grau de insaturação não são capazes de atender ao padrão Europeu para o índice de cetano. Valores baixos de índice de cetano estão associados com os componentes altamente insaturados, tais como: ésteres de ácido linoleico (C18: 2) e linolênico (C18: 3). De acordo com Knothe et al. (2003), números de cetano elevados foram encontrados para os ésteres de ácidos graxos saturados tais como: ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), como é o caso do biodiesel de óleo de palma (matéria-prima rica nestes ácidos graxos), que resultou em elevado número de cetano. Resultados similares foram descritos por outros pesquisadores, observando um aumento do número de cetano com o aumento da percentagem de palmitato de metila em uma mistura (RAMOS et al., 2009).

A escala de cetano esclarece o porquê dos triacilgliceróis encontrados nos óleos e gorduras serem adequados para uma alternativa de combustível diesel. A cadeia longa, linear e não ramificada dos ácidos graxos, similar às existentes em *n*-alcanos dos combustíveis diesel tradicionais de boa qualidade, remetem a um alto número de cetano.

- Índice de iodo: O índice de iodo é uma medida da insaturação total dentro de uma mistura de ácidos graxos. É expressa em gramas de iodo que reagem com 100 g da amostra respectiva, refletindo na adição de iodo para as duplas ligações. O índice de iodo de um

óleo vegetal ou gordura animal é quase idêntica à dos ésteres alquílicos correspondentes (KNOTHE, 2005).

De acordo com a norma europeia (EN 14214) o índice de iodo é limitado a 120g I₂/100g. Esse limite exigido pelos padrões europeus exclui o biodiesel de várias fontes promissoras, tais como: soja e girassol. Na Espanha, o Real Decreto 61/2006 exige a inclusão da norma europeia para biodiesel, com exceção do valor de índice de iodo, que muda de 120 para 140. De acordo com este Real Decreto Espanhol, todos os óleos vegetais apresentam limites satisfatórios para o índice de iodo.

A limitação da quantidade de ácidos graxos insaturados é necessária devido ao fato de que aquecimentos elevados desses ácidos graxos resultam em polimerização dos triacilgliceróis. Isto pode levar à formação de depósitos, ou a deterioração do lubrificante no motor. A correlação entre o índice de iodo e do grau de insaturação (GI) resulta em um aumento linear, conforme o esperado: quanto maior a insaturação presente no óleo, maior será o valor de iodo.

- Estabilidade à oxidação: A estabilidade a oxidação do biodiesel é outro parâmetro importante para determinar por quanto tempo as características do produto final serão preservadas sob condições de armazenagem, calor, umidade, presença de traços de metais e a natureza do tanque de armazenamento. As razões para auto-oxidação do biodiesel estão relacionadas à presença de ligações duplas nas cadeias de várias substâncias graxas. Estas reações de oxidação ocorrem em diferentes velocidades, dependendo do número e da posição das duplas ligações (KUMAR; SHARMA, 2015; FREEDMAN; BAGBY, 1989). Estudos comprovaram que altas temperaturas, presença de metais, luz e ar facilitam o processo de oxidação, sendo a estrutura do ácido graxo o fator mais influente sobre a propriedade oxidativa do biodiesel (KUMAR; SHARMA, 2015; KNOTHE, 2005).

Quanto maior o conteúdo de ésteres alquílicos poli-insaturados nas amostras de biodiesel, mais suscetível a sofrer oxidação (KNOTHE, 2005). Uma solução viável para a resistência do biodiesel contra autooxidação é tratá-los com inibidores de oxidação (antioxidantes). A oxidação de compostos graxos insaturados depende do número e posição das duplas ligações. As posições das duplas ligações nos ácidos graxos linoleico e linolênico são mais suscetíveis a autooxidação. Taxas relativas de oxidação apresentadas na literatura são 1 para oleato de metila, 41 para linoleato de metila e 98 para linolenato de metila (KNOTHE, 2005; KNOTHE et al., 2006). Assim, matérias-primas ricas em ácidos

linoleico e linolênico, tais como: soja e girassol tendem a apresentar baixa estabilidade à oxidação, enquanto matérias-primas com baixo teor desses ácidos graxos, tais como: palma, azeite e óleo de amêndoas, geralmente apresentam melhor estabilidade (RAMOS et al., 2009).

Para melhorar essa estabilidade oxidativa do biodiesel alguns autores investigaram a influência de antioxidantes como o alfa-tocoferol, o butilato de hidroxianisole (BHA), o butilato de hidroxitolueno (BHT) para aumentar a estabilidade oxidativa do biocombustível (TANG et al., 2008). Os resultados obtidos revelaram que as amostras de biodiesel produzidas a partir de diferentes tipos de matérias-primas apresentam por sua vez, diferentes níveis de estabilidade oxidativa, bem como indicaram que a ação do antioxidante aumenta em função de sua concentração. Além disso, o local reservado para armazenagem do biodiesel é de crucial importância na manutenção das suas propriedades combustíveis por um maior período de tempo (TANG et al., 2008).

Para a análise desta propriedade existem vários métodos que remetem à qualidade do material. O índice de acidez apresenta uma boa alternativa para o acompanhamento da qualidade do combustível durante a armazenagem. Este índice revela o grau de oxidação do material e é expresso em miligramas de hidróxido de potássio para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em um grama de amostra. O índice de peróxido e o índice de iodo também estão relacionados com a estabilidade oxidativa do biodiesel. No entanto, os métodos para determinar desses índices requerem grandes quantidades de amostras e deste modo alguns autores têm proposto métodos alternativos, visando estimar a estabilidade oxidativa do biodiesel e dos óleos e gorduras, tomando por base a utilização de equações empíricas criadas por Knothe (2005) e validadas por Kumar e Sharma (2015).

- Ponto de entupimento do filtro a frio: Biocombustíveis destilados são capazes de desenvolver problemas de operabilidade, tais como: sedimentação de cera e entupimento de filtros e linhas de combustível, quando submetido a baixas temperaturas (-10 a -15 °C). Cada país pode especificar certos limites de temperatura para diferentes épocas do ano, dependendo das condições climáticas (KNOTHE et al., 2006).

Os ésteres metílicos de ácido esteárico e palmítico são os primeiros a precipitar e causar entupimento, portanto, biodiesel que apresenta quantidades elevadas desses constituintes são desfavoráveis para esta propriedade. O biodiesel de palma, por exemplo, rico nestes compostos, apresenta uma das mais elevadas temperaturas de POFF (ponto de obstrução do filtro a frio).

Biodiesel de amendoim é rico em ésteres derivados de ácidos graxos saturados de cadeia longa como C22:0 e C24:0, que resulta em valor ainda mais elevado de POFF (17 °C), ou seja, abaixo dessa temperatura pode causar problemas de entupimento e obstrução no motor. Quanto maior a cadeia carbônica presente no biodiesel, pior será as propriedades em baixas temperaturas. Neste sentido, o POFF das amostras de biodiesel está diretamente relacionado com a quantidade dos ésteres de ácidos graxos saturados de cadeia longa. Os ésteres insaturados não estão incluídos neste parâmetro porque os pontos de fusão destes compostos são muito mais baixos em comparação com a dos saturados (RAMOS et al., 2009).

- Viscosidade: A viscosidade pode ser definida como uma resistência à vazão, associada à fricção ou atrito interno de uma parte do fluido que escoa sobre a outra afetando com isso o funcionamento do motor. Quanto maior a viscosidade, maior a tendência de ocasionar tais problemas.

Apesar de ser favorável do ponto de vista energético, o uso de óleos *in natura* como alternativa aos combustíveis foi abandonado principalmente devido a elevada viscosidade dos óleos vegetais. Estudos efetuados revelaram que a combustão direta de óleos vegetais conduz à carbonização na cabeça do injetor, resistência à injeção nos segmentos dos êmbolos, diluição do óleo do cárter, contaminação do óleo lubrificante, entre outros problemas.

As causas destes problemas foram atribuídas à polimerização dos triacilgliceróis por meio de suas duplas ligações que conduzem à formação de depósitos, assim como à baixa volatilidade e a elevada viscosidade dos óleos vegetais que geram problemas na atomização do combustível. Desta forma, o processo de transesterificação possibilita a redução dessa viscosidade tornando o óleo ou gordura transesterificados uma alternativa viável para a utilização em motores do ciclo diesel (KNOTHE, 2005; RAMOS et al., 2003).

Referências

- ADEWALE, P.; DUMONTN, M-J.; NGADI, M. Recent trends of biodiesel production from animal fat wastes and associated production techniques. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 574–588, 2015.
- AHMAD, A. L.; MAT YASIN, N. H.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 584-593, 2011.
- AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3402-3410, 2011.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) Disponível em: <http://www.anp.gov.br/> Acesso em: 30 de agosto de 2015.
- AVHAD, M. R.; MARCHETTI J.M. A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 696-718, 2015.
- BALAT, M. Potencial alternatives to edible iols for biodiesel production: a review of current work. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 1479-1492, 2011.
- BASUMATARY, S. Transesterification with heterogeneous catalyst in production of biodiesel: a review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 1-7, 2013.
- BAUTISTA, S.; NARVAEZ, P.; CAMARGO, M.; CHERY, O.; MOREL, L. Biodiesel-TBL+: A new hierarchical sustainability assessment framework of PC&I for biodiesel production – Part I. **Ecological Indicators**, v. 60, p. 84-107, 2016.
- BHUIYA, M. M. K.; RASUL, M. G.; KHAN, M.M.K.; ASHWATH, N.; AZAD, A. K. Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel—Part:1 selection of feedstocks, oil extraction techniques and conversion technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.163i>
- BRUNSCHWIG, C.; MOUSSAVOU, W.; BLIN, J. Use of bioethanol for biodiesel production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 283-301, 2011.
- CHEN, C. L.; HUANG, C. C.; HO, K. C.; HSIAO, P. H.; WU, M. S.; CHANG, J. S. Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet extraction/transesterification and direct transesterification processes. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 179–186, 2015.
- CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H. C.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.
- CORDEIRO, C. S.; SILVA, F. R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v. 34, p. 477-486, 2011.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 163-170, 2011

DU, W.; LI, W.; SUN, T.; CHEN, X.; LIU, D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 331-337, 2008.

ENDALEW, A. K.; KIROS, Y.; ZANZI, R. Inorganic heterogeneous catalysts for biodiesel production from vegetable oils. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 3787- 3809, 2011.

FAROBIE, O.; MATSUMARA, Y. A comparative study of biodiesel production using methanol, ethanol, and tert-butyl methyl ether (MTBE) under supercritical conditions. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 306-311, 2015.

FERREIRA, J. A.; LENNARTSSON, P. R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 523-532, 2013.

FREEDMAN, B.; BAGBY, M. O. Heats of combustion of fatty esters and triglycerides. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 66, p. 1601-1605, 1989

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils - Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 405-416, 2001.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. Green fuel production: processes applied to microalgae. **Environmental Chemistry Letters**, v. 11, p. 315-324, 2013.

HADDAD, M.; FAWAZ, Z. Evaluation of microalgal alternative jet fuel using the AHP method with an emphasis on the environmental and economic criteria. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v.32, p. 721-733, 2013.

HARISH, B.S.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Bioengineering strategies on catalysis for the effective production of renewable and sustainable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 533-547, 2015.

KISS, F. E.; JOVANOVIĆ, M.; BOSKOVIĆ, G. C. Economic and ecological aspects of biodiesel production over homogeneous and heterogeneous catalysts. **Fuel Processing Technology**, v. 91, p. 1316-1320, 2010.

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

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do biodiesel**, São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KNOTHE, G.; MATHEAUS, A. C.; AND RYAN III, T. W. Cetane numbers of branched and straight chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel**, v. 82, p. 971-975, 2003.

KUMAR, M.; SHARMA, M. P. Assessment of potential of oils for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 814-823, 2015.

KUSS, V. V.; KUSS, A. V.; ROSA, R. G.; ARANDA, D. A. G.; CRUZ, Y. R. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon Renewable and Sustainable. **Energy Reviews**, v.50, p. 1013-1020, 2015.

LAL, R. Carbon sequestration. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 363, p. 815-830, 2008.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v.87, p. 1083-1095, 2010.

LI, J.; LI, L.; TONG, J.; WANG, Y.; CHEN, S. Research development on lipase-catalyzed biodiesel. **Energy Procedia**, v. 16, p. 1014-1021, 2012.

LIANG, Y-J.; JIANG, J-G. Characterization of malic enzyme and the regulation of its activity and metabolic engineering on lipid production. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 45558-45570, 2015.

LOURINHO, G.; BRITO, P. Advanced biodiesel production technologies: novel developments. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, p. 287-316, 2015.

MARCHETTI, J.M. A summary of the available technologies for biodiesel production based on a comparison of different feedstock's properties. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 90, p. 157-163, 2012.

MARTINEZ, E. J.; RAGHAVAN, V.; GONZALEZ-ANDRÉS, F.; GÓMEZ, X. New biofuel alternatives: integrating waste management and single cell oil production **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 9385-9405, 2015.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v.51, p. 60-79, 2008.

MILLEDGE, J.J.; HEAVEN, S. Methods of energy extraction from microalgal biomass: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.13, p. 301–320, 2014.

MOUNGUENGUI, R. W. M.; BRUNSCHWIG, C.; BARÉA, B.; VILLENEUVE, P.; BLIN, J. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 39, p. 441-456, 2013.

ONG, H. C.; SILITONGA, A. S.; MASJUKI, H. H.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; BOOSROH, M. H. Production and comparative fuel properties of biodiesel from non-edible oils: *Jatropha curcas*, *Sterculia foetida* and *Ceiba pentandra*. **Energy Conversion and Management**, v. 73, p. 245-255, 2013.

PANNEERSELVAM, N.; MURUGESAN, A.; VIJAYAKUMAR, C.; KUMARAVEL, A.; SUBRAMANIAM, D.; AVINASH, A. Effects of injection timing on bio-diesel fuelled engine characteristics: an overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 17-31, 2015.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; MICHELLE, J. C. R.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, B. A. Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p.1313-1330, 2005.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 261-268, 2009.

RICO, J.A.P.; SAUER, I.L. A review of Brazilian biodiesel experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 513-529, 2015.

SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D.; BLOCK, D. E.; GERMAN, J. B.; BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1336-1360, 2014.

SOLOMON, B. D.; BANERJEE, A.; ACEVEDO, A.; HALVORSEN, K. E., EASTMOND, A. Policies for the sustainable development of biofuels in the Pan American Region: A Review and synthesis of five countries. **Environmental Management**, p. 1-19, 2014.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70º Aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova**, v. 30, p. 2068-2071, 2007.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, p. 667-676, 2007.

TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. BiodieselAnalyzer[®]: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, v. 2, p. 55-57, 2014.

TANG, H.; WANG, A.; SALLEY, S. O.; SIMON, K. Y. N. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.85, p. 373-382, 2008.

VIEITEZ, I.; SILVA, C.; ALCKMIN, I.; BORGES, G. R.; CORAZZA, F. C.; OLIVEIRA, J. V.; GROMPONE, M. A.; JACHMANIÁN, I. Continuous catalyst-free methanolysis and ethanolysis of soybean oil under supercritical alcohol/water mixtures. **Renew Energy**, v. 35, p. 1976-1981, 2010.

YUSOFF, M. F.; XU, X.; GUO, Z. Comparison of fatty acid methyl and ethyl esters as biodiesel base stock: a review on processing and production requirements. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 525-531, 2014.

ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.44, p. 182-197, 2015.

Capítulo 3

Potencial do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* como fonte de lipase ligada ao micélio

3. POTENCIAL DO FUNGO FILAMENTOSO *Mucor circinelloides* COMO FONTE DE LIPASE LIGADA AO MICÉLIO

3.1. Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) fazem parte da classe das hidrolases que atuam na cadeia éster carboxílico e não requerem cofator. A função biológica primordial das lipases é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis (Figura 3.1), entretanto, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, a maioria é capaz de catalisar reações reversas como esterificação e transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), entre outras (ZHAO et al., 2015; BORNSCHEUER, 2002). Dependendo da sua origem, as lipases podem apresentar massa molecular variando de 19 a 75 kDa e atuar numa ampla faixa de pH (4-9) e de temperatura, a qual varia da ambiente até 70 °C (DE CASTRO et al., 2004).

Figura 3.1. Reação geral de hidrólise de triacilglicerol catalisada pela lipase

Fonte: Adaptado (LIMA, 2004).

As lipases cujas estruturas tridimensionais têm sido elucidadas são do tipo α/β hidrolase. Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β paralelas rodeado por porções em α -hélice. As fitas β têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90 °C entre si. Embora as lipases se diferenciem uma das outras em função do número de aminoácidos da sequência primária, todas elas apresentam um sítio ativo formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina (PISSILÃO, 2006; LIMA, 2004; BORNSCHEUER, 2002; JAEGER; REETZ, 1999; KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998).

A importância do uso de lipases em biocatálise tem se mostrado cada vez mais evidente, visto que essas enzimas apresentam algumas vantagens, tais como versatilidade

de reações catalisadas, condições brandas de reação, natureza regio-, quimio- e enantiosseletiva. Em termos de regioespecificidade, ou seja, a posição de quebra das ligações ésteres, as lipases são divididas em três tipos (ZHAO et al., 2015; POPPE et al., 2015; AVHAD; MARCHETTI, 2015; ANTCKAZ et al., 2009).

- *sn-1,3- específicas* (hidrólise das ligações ésteres nas posições R1 ou R3 do TAG);
- *sn-2-específica* (hidrólise da ligação éster na posição R2 do TAG);
- *não específica* (não distinguem a posição das ligações ésteres para realizar a clivagem).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de células animais, vegetais ou microbianas (bactérias, fungos e leveduras). Preferencialmente, as lipases, são obtidas a partir de microrganismos em virtude do seu curto período de geração, alto rendimento de produção de enzimas, condições de cultivos mais simples e também devido ao seu potencial já comprovado em outros segmentos de diversos setores industriais, como o de alimentos e o de produtos farmacêuticos (NARWAL; GUPTA 2013; RAVI et al., 2013; BAJAJ et al., 2010).

3.1.1. Lipases como biocatalisadores na síntese de biodiesel

A rota enzimática para a produção de biodiesel é atrativa, pois as enzimas são biodegradáveis e atendem aos apelos atuais da química verde, apresentam maior compatibilidade com as variações de qualidade das matérias-primas lipídicas, uma vez que toleram maiores teores de ácidos graxos livres e de água presentes no meio reacional. (ZHAO et al., 2015; POPPE et al., 2015; AVHAD; MARCHETTI, 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; MOUNGUENGUI et al., 2013; DE CASTRO et al., 2010; TAN et al., 2010).

Na síntese de biodiesel, existem quatro principais formas de biocatalisadores: Lipases solúveis, imobilizadas, preparação enzimática em estado sólido (SEP) e lipases ligadas ao micélio (células íntegras) (ALGUIEIRAS; OLIVEIRA; FREIRE, 2015; LOTTI et al., 2015; ZHAO et al., 2015; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009).

- Lipases solúveis

As lipases solúveis consistem em formulações de enzimas na forma líquida que contêm estabilizantes para evitar sua desnaturação (por exemplo, glicerol, sorbitol) e agentes antimicrobianos (por exemplo, benzoato) ou enzimas em pó obtidas por meio de liofilização.

Embora os custos de produção de lipases solúveis sejam significativamente menos onerosos do que os das lipases imobilizadas comerciais, seu uso industrial é limitado, visto que possuem baixa estabilidade térmica e apresentam dificuldade de recuperação. Entretanto, estudos recentes têm sugerido a possibilidade de aplicação de uma particular preparação de lipase comercializada pela Novozymes (Callera® Trans L) para produção de biodiesel visando reduzir os custos de produção industrial, no qual a enzima é utilizada em sua forma solúvel. A eficiência alcançada pela enzima na presença de água sugere a potencialidade deste biocatalisador para produção industrial de biodiesel enzimático (CESARINIA; DIAZ; NIELSEN, 2013).

- Lipases imobilizadas

Os biocatalisadores imobilizados são enzimas dispersas na superfície do suporte sólido, prevenindo a formação de deposições e consequentemente aumentando o número de sítios ativos disponíveis, quando se trabalha em meio orgânico. Outras vantagens da imobilização incluem: uma maior estabilidade térmica e a resistência a solventes. Além disso, as lipases imobilizadas são fáceis de recuperar, possibilitando a sua reutilização e o uso em processos contínuos (NARWAL; GUPTA, 2013; RAVI et al., 2013; BAJAJ et al., 2010).

As técnicas de imobilização de enzimas podem ser divididas em diferentes categorias baseadas no mecanismo empregado: adsorção em superfícies sólidas, fixação por ligação covalente, encapsulação e ligação cruzada (DE CASTRO et al., 2010). Revisões abrangentes sobre técnicas de imobilização de enzimas e particularmente de lipases são encontradas na literatura pertinente (ZHAO et al., 2015; HWANG et al., 2014; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; ADLERCREUTZ, 2013; HOMAEI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013; GUPTA; BHATTACHARYA; MURTHY, 2013) e não serão abordadas neste trabalho.

Dentre as lipases mais amplamente empregadas na síntese de biodiesel estão as lipases produzidas por leveduras, tais como a lipase de *Candida antarctica* (Lipase B-CALB; Lipase A-CALA), *Candida rugosa* (CRL) e *Candida* sp. e produzidas por fungos filamentosos, tais como a lipase de *Rhizomucor miehei* (RML), *Rhizopus oryzae* (ROL), *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Aspergillus niger* e *Penicillium expasum* (PEL). Muitas destas enzimas estão disponíveis comercialmente na forma imobilizada. A CALB, RML, e TLL são manufaturadas pela Novozymes e comercializadas sob a designação de “Novozym[®] 435” (imobilizada em resina acrílica macroporosa), “Lipozyme IM RM” (imobilizada em resina aniônica), e “Lipozyme TL IM” (imobilizada em gel de sílica), respectivamente (ALGUIERAS; OLIVEIRA; FREIRE, 2015; NARWAL; GUPTA, 2013; RAVI et al., 2013).

- Preparação enzimática em estado sólido (SEP)

A preparação enzimática em estado sólido (SPE) é uma forma alternativa de biocatalisador que vem sendo recentemente utilizado para a produção de biodiesel. A SPE é obtida por meio da fermentação em estado sólido (SSF).

Na SSF, as células microbianas crescem com concomitante imobilização em partículas do meio de fermentação sólida, e as lipases excretadas permanecem aderidas na matriz do sólido fermentado, que por sua vez é utilizada como biocatalisador. Este processo pode reduzir significativamente os custos do biocatalisador, uma vez que, os resíduos agroindustriais, tais como os da extração de óleos vegetais (tortas), que são baratos e abundantes em países como o Brasil, podem ser usados como substratos para o crescimento das células em SSF. Além disso, na produção de SEP, não são necessárias as etapas de extração, purificação e imobilização de enzimas após a fermentação, o que reduz os custos do biocatalisador (ALGUIERAS; OLIVEIRA; FREIRE, 2015; GUTARRA et al., 2009).

- Lipases ligadas ao micélio (células íntegras)

A catálise com células íntegras consiste em utilizar biomassa microbiana com elevada atividade catalítica como biocatalisador, é uma tecnologia que oferece como vantagens o baixo custo de produção e simplicidade do processo de utilização (ALGUIERAS; OLIVEIRA; FREIRE, 2015; YOSHIDA et al., 2012; SUBHASH; MOHAN, 2011).

Diversos estudos relatam o uso de células íntegras de microrganismos, tais como bactérias, leveduras e fungos, como biocatalisadores, na tentativa de melhorar a relação custo-eficácia dos processos de bioconversão, tendo em vista que evita os complexos procedimentos de isolamento, purificação e imobilização tradicional das preparações de lipase imobilizada (CARVALHO et al., 2015; ALGUEIRAS; OLIVEIRA; FREIRE, 2015; YUSOFF; XU; GUO, 2014; LIU et al., 2014; AARTHY et al., 2014; ANDRADE et al., 2014; ANDRADE et al., 2012).

Dentre os microrganismos amplamente estudados, as células íntegras de fungos filamentosos têm surgido como uma opção de catalisador mais robusto para aplicações industriais em virtude destes apresentarem uma parede celular mais resistente. (ABBASZADEH et al., 2012).

As células íntegras dos fungos filamentosos pertencentes às linhagens de *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus chinensis*, *Aspergillus niger* e *Mucor circinelloides* vêm sendo amplamente estudadas como biocatalisadores por vários grupos de pesquisa (WANG et al., 2008; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009; XIAO et al., 2010; YOSHIDA et al., 2012; ANDRADE et al., 2012; ARUMUGAM; PONNUSAMI, 2014). Entre as quais, as cepas de *Mucor circinelloides* (anteriormente denominada *Mucor javanicus*) (GARCIA-GALAN et al., 2013) têm recebido significativa atenção devido à sua elevada capacidade de produzir enzimas e outros metabólitos que preenchem os requisitos para serem utilizadas como catalisadores em biorrefinarias e no desenvolvimento de produtos sustentáveis (FERREIRA et al., 2013).

A utilização da lipase de *Mucor circinelloides* é reportada como eficiente biocatalisador para conduzir reações em meio orgânico, incluindo além de biodiesel, ésteres aromáticos e ésteres de açúcar (CARVALHO et al., 2015; ANDRADE et al., 2014; GARCIA – GALAN et al., 2013; ANDRADE et al., 2012; ANTCZAK et al., 2009).

3.1.2. Imobilização de células íntegras

A maioria dos processos fermentativos industriais convencionais utiliza células livres em suspensão, porém o uso de microrganismos imobilizados permite o aumento de produtividade devido a elevada concentração de células. A imobilização de células consiste no confinamento em uma região definida do espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua possibilitando a reutilização das mesmas (COZZIVI et al., 2007). Em geral, a imobilização de células oferece uma série

de vantagens, incluindo: (i) a utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo; (ii) possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; (iii) facilidade de separação do produto final; (iv) em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo: maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros; (v) facilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima, caso o processo seja descontínuo, ou ajuste do tempo de residência caso seja usado um reator contínuo. O uso de biomassa com elevada atividade lipolítica é uma alternativa para evitar os gastos advindos das etapas de purificação.

A Figura 3.2 mostra as possíveis técnicas de imobilização de células. A imobilização pode ocorrer pelo método natural, no qual as células são imobilizadas de forma espontânea por meio das interações eletrostáticas ou pelo método artificial, no qual as células são imobilizadas nas matrizes por ligações covalentes utilizando agente ligantes como o gluteraldeído ou carbodiimida. Em ambos os métodos as enzimas permanecem viáveis independentes dos possíveis danos causados às células pelo procedimento de imobilização (COZZIVI et al., 2007).

Figura 3.2. Diferentes métodos de imobilização celular de microrganismos: (A) imobilização na superfície do suporte; (B) Engaiolamento em matriz porosa; (C) Floculação celular (D) Barreiras de contenção mecânica.

Fonte: Adaptado de (COZZIVI et al., 2007).

A viabilidade econômica do processo de imobilização das células íntegras baseia-se na investigação de um suporte que seja estável, inerte e que possua boa aderência ao microrganismo. O emprego das células íntegras permite a redução dos custos de obtenção

do catalisador, em função da diminuição do número de operações associadas ao processo, uma vez que confere maior resistência às forças de cisalhamento e permite sua reutilização (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009).

3.1.2.1. Suportes de imobilização

A imobilização de células íntegras em suporte poroso ocorre concomitante ao crescimento celular e podem ser facilmente separadas do meio de cultivo (PARAWIRA, 2009). A estrutura celular age como uma matriz natural capaz de proteger as enzimas da ação de possíveis efeitos negativos de agentes externos, promovendo um efeito análogo ao empregado por matrizes comuns utilizadas na imobilização de enzimas.

A biomassa celular imobilizada obtida pode ser utilizada diretamente na reação de interesse e reutilizada diversas vezes. Esta estratégia tem apresentado resultados promissores empregando diferentes microrganismos produtores de lipase para mediar reações de hidrólise, esterificação e principalmente transesterificação de óleos vegetais visando à obtenção do biodiesel (ANDRADE et al., 2014; ANDRADE et al., 2012; SUBHASH; MOHAN, 2011).

Alguns estudos têm sido direcionados para a imobilização de células íntegras em diferentes matrizes, tais como materiais sol-gel (WALCARIUS; COLLINSON, 2009), resinas macroporosas (SUN et al., 2010), criogel de álcool-polivinílico (PVA-CRYOGEL) (ANTCZAK et al., 2002) e espumas de poliuretano (CARVALHO et al., 2015; ANDRADE et al., 2014; ANDRADE et al., 2012; TAMALAMPUDI et al., 2008).

No presente trabalho foram testados diferentes suportes sólidos para imobilizar células íntegras de *Mucor circinelloides* URM 4182 por meio da técnica de adsorção: palha de trigo, sabugo de milho, ágar-ágar, terra diatomácea (Celite), polihidroxibutirato (PHB) e espumas de poliuretano.

3.1.3. Localização e excreção da lipase a partir de células íntegras

A produção de lipase ligada ao micélio e sua retenção na membrana, citoplasma e parede celular das células é um fator crucial para o desenvolvimento de biocatalisadores de células íntegras imobilizadas e com alta atividade lipolítica, em reações de etanolise. Hama et al. (2006) imobilizaram as células de *Rhizopus oryzae* em partículas de suporte poroso (BSPs – Biomass Support Particles), caracterizaram as lipases produzidas no interior das células e verificaram que estes fungos produziam dois tipos de lipase com massas

moleculares de 34 e 31 kDa. Conforme ilustrado na Figura 3.3, a lipase de 34kDa (ROL 34) está ligada a parede celular, enquanto que a lipase de 31 kDa (ROL 31) está ligada a membrana. Estes mesmos autores, afirmaram que a localização exata das lipases responsáveis pela atividade lipolítica da biomassa permanece ainda desconhecida.

Figura 3.3. Diagrama esquemático da localização das lipases nas células de *Rhizopus oryzae*

Fonte: Adaptado de (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009)

Hama et al., (2006) constataram que, em cultivos nos quais o micélio foi imobilizado em partículas de suportes porosos, uma elevada quantidade de lipases fica retida no interior das células, mesmo após um longo período de cultivo. Os autores também verificaram que a adição de óleo de oliva auxilia na retenção da lipase nas células, o que contribui para a inibição da excreção de lipase para o meio, sugerindo que esse efeito de retenção de lipase na célula causa um aumento da atividade lipolítica da biomassa microbiana.

A localização da lipase foi verificada por meio da análise de Western blot e pela técnica de microscopia de imunofluorescência das hifas celulares. Embora a relação entre a morfologia celular e a excreção enzimática dependa da cepa fúngica e o tipo de enzima, a imobilização celular inibiu fortemente a excreção da ROL 31 para o meio de cultura na cepa testada. Esse estudo confirma a elevada atividade lipolítica da biomassa de *Rhizopus oryzae*.

3.1.4. Etanólise mediada por células íntegras

O processo de transesterificação mediado por células íntegras de microrganismos pode reduzir significativamente o custo operacional, em vez de utilizar lipase livres ou

imobilizadas que exigem etapas de purificação complexas. As células íntegras são biocatalisadores preparados simplesmente pelo cultivo, e as enzimas que estão presas no interior das células são consideradas imobilizadas (ENFREMEKO et al., 2011).

Uma comparação do processo de obtenção de biodiesel usando derivados imobilizados de lipase e derivados imobilizados de biomassa é apresentada na Figura 3.4, na qual pode ser claramente observado a redução considerável em custo e tempo, que pode ser obtido com o uso de biomassa com elevada atividade lipolítica como catalisador. Na literatura é possível encontrar relatos de processos promissores para a interesterificação industrial e etanólise de matérias-primas lipídicas utilizando células íntegras com elevada atividade lipolítica como biocatalisador.

A utilização de células imobilizadas como catalisadores industriais em processos contínuos ou descontínuos pode ser vantajosa quando comparada a procedimentos conduzidos com outros tipos de catalisadores.

Figura 3.4. Comparação das etapas envolvidas no processo de obtenção de biodiesel por via enzimática empregando: a) Lipase purificada imobilizada; b) células íntegras imobilizadas.

Fonte: Adaptado de (DU et al., 2008)

Prakash e Aulakh (2011) utilizaram uma cepa de *Aspergillus* sp. (MTCC 5436), como catalisador na transesterificação de diferentes óleos. Os autores observaram elevada atividade catalítica da biomassa celular para os óleos testados e obtiveram rendimentos superiores a 98% em ésteres etílicos.

Resultados satisfatórios também foram obtidos por Tamalampudi e colaboradores (2008), que realizaram um estudo comparativo entre as células imobilizadas de *Rhizopus oryzae* e a lipase comercial Novozym® 435 como biocatalisadores na produção de biodiesel utilizando óleo de pinhão manso e diferentes alcoóis. Os autores verificaram que as células íntegras imobilizadas em suportes sólidos porosos foram mais eficientes na transesterificação enzimática do óleo de pinhão manso, alcançando um rendimento de 80% em 60 h contra 76% após 90 h de reação utilizando Novozym® 435. Além disso, as células imobilizadas tiveram um incremento em sua atividade lipolítica na presença de 5% de água, ao contrário da Novozym® 435 que tem sua atividade inibida em presença de água, necessitando de um meio anidro para uma eficiente catálise.

A eficiência na utilização de células íntegras em sistemas contínuos foi relatada Yoshida et al. (2012), na produção de biodiesel. Hama et al. (2007) também utilizaram células íntegras imobilizadas na transesterificação do óleo de soja com álcool, alcançando rendimentos de até 90% na produção de biodiesel com metanol em fluxo contínuo.

Arumugam e Ponnusami (2014) utilizaram o óleo de *Callophyllum inophyllum* e metanol e células íntegras imobilizadas (*Rhizopus oryzae*) em espumas de poliuretano na síntese de biodiesel. Os resultados utilizando sistema contínuo alcançaram 92% em ésteres metílicos na razão molar 1:12 (óleo: álcool) a 35 °C. Jin et al. (2008), empregaram células íntegras imobilizadas de *Rhizopus oryzae* em sistema contínuo para avaliar a eficiência de reações de transesterificação de óleo de canola utilizando etanol. Os autores reportaram rendimentos de 66,1% em ésteres de etila.

O grupo polonês liderado pelo pesquisador Tadeusz Antczak e colaboradores (2000, 2002, 2004) pode ser considerado precursor na utilização de lipase ligada ao micélio de *M. circinelloides* para mediar reações de esterificação de alcoóis primários e secundários em meio orgânico, relatando atividade moderada de células de *M. circinelloides* aprisionada em matriz sílica pelo método sol-gel (ANTCZAK et al., 2000). Em seguida, vários outros artigos foram publicados usando a mesma linhagem do fungo imobilizado em diferentes matrizes, sendo observada maior estabilidade térmica e operacional em ciclos quando o micélio foi imobilizado em esferas de criogel obtidas a partir do álcool polivinílico por congelamento-descongelamento do sistema (ANTCZAK et al., 2002). O aprisionamento do micélio em polivinil pirrolidona contendo grânulos de quitosana foi considerado uma forma eficiente de imobilizar e estabilizar a enzima para posterior aplicação em meio orgânico (ANTCZAK et al., 2004).

No entanto, a literatura é ainda escassa sobre o uso de células íntegras do fungo *Mucor circinelloides* para mediar a síntese de biodiesel (GARCIA-GALAN et al., 2013) e provavelmente por esta razão os trabalhos desenvolvidos tenham direcionado esforços para estabelecer um sistema imobilizado eficiente do fungo *Mucor circinelloides* para catalisar reações de etanólise de óleos vegetais de baixo custo (ANDRADE et al., 2012; ANDRADE et al., 2014).

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizadas células íntegras do fungo *Mucor circinelloides* URM 4182, imobilizadas *in situ*, como biocatalisador para mediar a etanólise de diferentes óleos vegetais, tais como óleos de andiroba, coco, macaúba, palma e pinhão manso. Cabe ressaltar que esta particular linhagem de fungo foi selecionada anteriormente em trabalho de tese de doutoramento desenvolvido por Andrade (2012).

Os trabalhos reportados na literatura por Andrade e colaboradores, (2012) e Andrade e colaboradores, (2014), demonstraram que células íntegras de *Mucor circinelloides* URM 4182 imobilizada em poliuretano forneceram elevada atividade de transesterificação a partir de óleos vegetais láuricos. As condições reacionais da etanólise do óleo de babaçu foram determinadas por planejamento fatorial avaliando a influência das variáveis: razão molar (óleo/etanol) e temperatura. A análise estatística mostrou que *M. circinelloides* foi capaz de produzir ésteres de etila em todas as condições testadas, com um rendimento máximo (98,1%) à 35° C, razão molar 1:6 (óleo: etanol). Os resultados indicaram o potencial deste biocatalisador como uma alternativa de baixo custo para mediar reações de interesse industrial.

3.2. Óleos vegetais selecionados para a produção de biodiesel

No Brasil, 80,79% do biodiesel produzido em escala industrial utiliza óleo de soja como matéria-prima (ANP, 2015). Entretanto, o óleo de soja está inserido na cadeia alimentícia brasileira, fazendo-se necessário a busca por matérias-primas lipídicas alternativas. Neste contexto, em função da possibilidade de cultivo de diferentes oleaginosas no Brasil e sabendo *a priori*, que a qualidade do biodiesel depende das matérias-primas empregadas no processo de produção, foram selecionados além do óleo de babaçu, outros óleos vegetais de andiroba, coco, macaúba e pinhão manso para estudar o desempenho das células imobilizadas de *Mucor circinelloides* URM 4182 na síntese de biodiesel. Além disso, a cultura dessas oleaginosas está consolidada no território nacional e internacional como pode ser verificado na Tabela 3.1.

- Óleo de andiroba

A andiroba (*Carapa*) é composta por duas espécies *Carapa procera* e *Carapa guyanensis* que pertencem à mesma família que o mogno (*Meliaceae*). A espécie *Carapa procera* ocorre na África e América do Sul, enquanto que *C. guyanensis* ocorre da América Central até o norte da América do Sul (FERRARI et al., 2003). No Brasil ela ocorre em toda a Bacia Amazônica e registra-se a maior ocorrência nos estados do Pará, Amapá, Amazonas e Maranhão (BRASIL, 1998). Observa-se, portanto, que na Amazônia brasileira encontram-se sementes de andiroba o ano todo (LOUREIRO; SILVA; ALENCAR, 1979).

A andiroba pode chegar a 30 m, apresenta flores com odor e sabor característicos, e as castanhas de cor marrom, nas quais o óleo está contido. Inicia a frutificação 10 anos após o plantio, com cada fruto contendo de 4 a 6 sementes. Uma árvore de andiroba é capaz de produzir por ano de 180 a 200 kg de sementes que contêm aproximadamente 60 % de óleo em massa (AMBROZIN et al., 2006).

A extração do óleo pode ser realizada por dois métodos distintos, método artesanal e industrial. O óleo de andiroba tem coloração amarelo-clara, gosto extremamente amargo e aroma “*sui generis*”, solidifica em temperaturas inferiores a 25 °C, rancifica rapidamente após a extração de sementes, sendo considerado impróprio para alimentação, porém tais características variam de acordo com o processo de extração. É constituído basicamente dos ácidos graxos: palmítico, palmitolêico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico, araquídico, sendo o ácido oléico encontrado em maior quantidade ($\approx 52\%$) seguido pelo palmítico (28%) (CARVALHO, 2004).

Segundo dados da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2010) estima-se que no Brasil são consumidos cerca de 30 mil litros de óleo por ano, com exportação anual de 450 mil litros, em média. Na literatura são reportados trabalhos que descrevem a utilização do óleo de andiroba como matéria-prima na síntese de biodiesel (TIOSSO et al., 2014; MELO et al., 2014; CARVALHO et al., 2013).

- Óleo de coco

As plantações de coqueiro (*Cocos nucifera*) estão distribuídas por 93 países, sendo que cerca de 80% da área plantada com coqueiro situa-se na Ásia (Índia, Filipinas, Indonésia, Sri Lanka e Tailândia) (BOUAID; MARTÍNEZ; ARACIL, 2010). No Brasil as maiores plantações e produções se concentram na faixa litorânea do Nordeste e parte da região Norte. O cultivo mundial do coqueiro registrou acréscimo em termos de área de plantio e produção (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), em 1970, a produção mundial foi ao redor de 26 milhões de toneladas, numa área colhida de 6,7 milhões de hectares. Com o passar dos anos, ocorreu um incremento considerável, alcançando no ano de 2000 a produção de 51 milhões de toneladas numa área de 10 milhões de hectares. Atualmente, a produção está em torno de 60 milhões de toneladas em uma área colhida ao redor de 12 milhões de há. Embora se perceba o acréscimo na área cultivada, o que se evidencia principalmente a partir dos anos 90, é o incremento significativo em termos de produção de coco, resultante do aprimoramento tecnológico dos sistemas de cultivo refletindo no avanço da produtividade global (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014).

O fruto é uma dupra fibrosa que, quando em processo de desidratação, começa a formar a copra, uma camada resistente com apenas 7% de água e 34% de composição lipídica é passível de extração (ANDRADE et al., 2004).

A composição do óleo de coco extraído é predominantemente láurica (cerca de 42% a 46%), sendo 90% saturada (BOUAID; MARTÍNEZ; ARACIL, 2010). Essa composição apresenta vantagem considerável, visto que o processo oxidativo ocorre de maneira mais lenta em comparação com os óleos de ácidos graxos insaturados, fato esse que favorece a sua utilização para a produção de biocombustível. A oxidação acelerada do biodiesel compromete tanto a sua qualidade como combustível quanto a integridade do motor (FERRARI; SOUZA, 2009; KUMAR; SHARMA, 2015). Dessa forma o óleo de coco é uma matéria-prima em potencial para a produção de biodiesel, visto que apresenta composição satisfatória, possui valor de mercado acessível e não demonstra real importância no âmbito industrial atual.

- Óleo de macaúba

Macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira rústica, espinhosa, com mais de 16 m de altura e apresenta alta produtividade em cachos e em óleo. Distribui-se ao longo da América tropical e subtropical, desde o sul do México e Antilhas até o sul do Brasil, chegando ao Paraguai e à Argentina, sendo mais abundante na região do cerrado. No Brasil, no estado de Minas Gerais ocorrem grandes populações de macaúba, apontadas como economicamente promissoras (DUARTE et al., 2010).

A macaúba apresenta inflorescências amareladas e os cachos de frutos de tom marrom-amarelado. Os frutos são esféricos ou ligeiramente achatados, em forma de drupa globosa com diâmetro variando de 2,5 a 5,0 cm. As amêndoas são oleaginosas, comestíveis e revestidas de uma fina camada de tegumento. Cada fruto contém, geralmente, uma semente envolvida por endocarpo duro e escuro com aproximadamente 3 mm de espessura. A frutificação ocorre durante todo o ano e os frutos amadurecem, principalmente, entre os meses de setembro e janeiro (SCARIOT, 1998).

Os frutos da macaúba fornecem dois tipos de óleo economicamente importantes: o óleo da polpa e o óleo da amêndoa que apresentam grande potencial para produção de biodiesel. A amêndoa apresenta uma maior composição em ácido láurico C12 ($\pm 48\%$) seguido de oléico ($\pm 37\%$) e linoleico (15%), enquanto os óleos provenientes da casca e da polpa apresentam uma maior composição de ácido oleico ($\pm 58\%$) e linoleico ($\pm 16\%$). Essa composição em ácidos graxos é favorável do ponto de vista da estabilidade oxidativa do óleo para a produção de biodiesel.

Tabela 3.1. Características das culturas tropicais selecionadas para utilização no presente trabalho

Cultura	Região	Conteúdo de óleo (%)	Rendimento em óleo kg/ha/ano	Ciclo de vida da planta	Área de cultivo disponível
Andiroba (<i>Carapa guianensis</i>)	Ocidente da Índia, Antilhas, América Central, sul de Honduras, muitas partes da Amazônia e na Região tropical do Brasil e da África	43	1420	2–3 anos	Amazônia brasileira tem 25,7 árvores/ha na floresta de terra firme e 14,6 árvores/ha na floresta inundada.
Coco (<i>Cocos nucifera</i> L.)	80% da área plantada com coqueiro situa-se na Ásia (Índia, Filipinas, Srilanka e Tailândia). Nordeste e parte da região Norte do Brasil	30-34	1481	perene	11,8 milhões de ha distribuídos por 93 países
Macaúba (<i>Acrocomia aculeate</i>)	Encontrada principalmente no México, Argentina, Arábia Saudita e Turquia. No Brasil encontra-se em Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Ceará, Piauí.	23-35	4100 (polpa) 800 (amêndoa)	perene	Ocorrência estimada em 12 milhões de hectares plantados
Palma (<i>Elaeis</i> sp.)	80% das culturas estão localizadas na Malásia e na Indonésia. África Ocidental e em todas as áreas tropicais da América e do Sudeste Asiático.	30-60	5950	perene	2 milhões de hectares de área cultivada. O Brasil tem produção de óleo de palma da ordem de 1,292,713 toneladas em 108.919 hectares.
Pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)	México, América central, África, Índia, Brasil, Argentina e Paraguai	40-50	1892	perene	900.000 ha de área mundial de cultivo de <i>Jatropha</i> , dos quais 84,4% (760.000 ha) estão localizados na Ásia, 13,3% (120 mil ha) na África e 2,23% (20.000 ha) na América Latina.

Fonte: ATABANI et al, 2012; BERGMAN et al, 2013; KLIMAS et al, 2007; AZEVEDO FILHO et al, 2012; LOPES; NETO STEIDLE, 2011; MARTINS et al, 2014.

- Óleo de palma

A palmeira é originária do oeste da África, cresce em regiões tropicais da Ásia, África e América, mas é amplamente cultivada na Malásia e Indonésia. A palma (*Elaeis guinensis*) tem um cultivo perene, começa a produzir frutos a partir dos 3 anos, seu fruto é conhecido como dendê e seu óleo como azeite de dendê ou óleo de palma. A palmeira pode alcançar 15 m de altura, seus frutos são de cor alaranjada, a semente ocupa totalmente o fruto e a árvore possui um tempo de vida de 25 a 30 anos. O rendimento do óleo por hectare é maior que qualquer outra oleaginosa (GUNSTONE; HARDWOOD; PADLEY, 2007).

No sudoeste asiático, o rendimento em média do óleo de palma, é da ordem de 4 toneladas por hectare e em condições mais favoráveis são relatados rendimentos de 10 toneladas por hectare. Em contrapartida, a soja plantada nos Estados Unidos gera 2,5 toneladas de sementes por hectare e estas fornecem 0,5 toneladas de óleo. Além de requerer menor trabalho manual para colheita, a palma é também conhecida pelo alto rendimento de óleo vegetal. Um hectare de palma pode produzir aproximadamente cinco toneladas de óleo, comparado com outros óleos vegetais como canola e soja, os quais podem produzir uma tonelada e 375 kg cada um. Isto é, um rendimento de quase 5 vezes e 10 vezes mais elevado que a canola e a soja respectivamente, com a mesma área de terra cultivada. Além disso, o custo da produção do óleo de palma é o menor em relação às outras culturas oleaginosas (LIM; TEONG, 2010).

Segundo dados do IBGE, a produção brasileira é apenas a nona do mundo, contando com 105 mil hectares plantados. No entanto, em 2010 o governo federal lançou o Programa Nacional do Dendê, para incentivar o mercado dessa oleaginosa no país. A meta ambiciosa é alcançar 10 milhões de hectares plantados, para alçar o país à condição de principal produtor mundial de óleo de palma, ultrapassando os atuais líderes, Tailândia e Indonésia, responsáveis por 90% da produção mundial (IBGE, 2012).

O óleo de palma é extraído da polpa e apresenta proporções elevadas dos ácidos palmítico, oléico e linoleico. Em virtude de sua composição peculiar, rica em ácido palmítico (46,8%), destaca-se o comportamento do óleo nas transições e coexistências de fases sólidas e líquidas, que lhe confere uma consistência semissólida. O óleo de palma tem provado ser uma fonte eficiente de biodiesel. O rendimento médio de aproximadamente 6.000 L de óleo de 27 palma/ ha pode produzir 4.800 litros de biodiesel (KARMAKAR; KARMAKAR; MUKHERJEE, 2010).

No Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, existe uma ampla produção de óleo de palma a baixo custo, em localidades carentes de fontes de energia, o que estimula a realização de pesquisas nesta área, visando a diminuição dos custos de produção do biodiesel de óleo de palma e procurando benefícios ambientais, energéticos e econômicos. Destaca-se ainda que o biodiesel originário de palmáceas apresenta qualidade superior às das demais oleaginosas, devido ao maior teor de ácidos graxos de baixa massa molecular e com alto nível de saturação (CARVALHO et al, 2013).

- Óleo de pinhão manso

O pinhão manso (*Jatropha curcas*) é provavelmente originário do Brasil, tendo sido introduzido por navegadores portugueses nas Ilhas do Arquipélago Cabo Verde e Guiné, de onde foi disseminado pelo continente Africano (ARRUDA et al., 2004). Pode ser cultivado em terras não aráveis, crescem numa ampla variedade de condições climáticas, sem qualquer possibilidade de competir com a produção de alimentos, além de fornecer óleos para a substituição do diesel, o crescimento da árvore contribui efetivamente para reduzir as concentrações de CO₂ da atmosfera (KARMAKAR; KARMAKAR; MUKHERJEE, 2010).

O gênero *Jatropha* possui mais de 70 espécies de arbustos de crescimento rápido, como *Jatropha pohliana*, *Jatropha gossypifolia* e *Jatropha curcas*, que pode atingir 3 a 5 metros de altura, com diâmetro de tronco de 20 cm e produzir sementes contendo óleo de excelente qualidade (SHAH; SHARMA; GUPTA, 2005).

O óleo é o produto de maior valor agregado da cultura de pinhão manso e apresenta propriedades como: maior estabilidade oxidativa que o óleo de soja; menor viscosidade quando comparada ao da mamona e melhores propriedades a frio que o óleo de palma. A semente de pinhão manso possui em torno de 50% de óleo, principalmente triacilgliceróis com 0,4% de material insaponificável.

O óleo é rico em ácido palmítico (16%), oleico (51%) e linoleico (23%) (GUNSTONE; HARDWOOD; PADLEY, 2007). O pinhão manso é considerado como uma das mais promissoras fontes de óleo com potencial para a produção de biodiesel na Ásia, Europa e África.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Cultura de microrganismo

Todos os experimentos foram realizados empregando a linhagem do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* f. *griseo-cyanus* URM 4182 adquirida da coleção de culturas da Micoteca URM (CCB/Universidade Federal de Pernambuco) (Figura 3.5). As células previamente crescidas em meio BDA (Batata Dextrose Agar – Difco), a 30 °C por 72h ou até atingirem seu melhor estado de esporulação foram lavadas com 10 mL de água destilada estéril para desprendimento dos esporos da cultura, obtendo assim, uma suspensão esporos em condições assépticas.

Figura 3.5. Fungo *Mucor circinelloides* URM 4182: cultivo e produção de esporos em meio sólido

Fonte: Própria

3.3.2. Suportes de imobilização

Foram utilizados suportes com diferentes características para a imobilização das células de *M. circinelloides* URM 4182: Polihidroxibutirato (PHB), Celite[®] Bio-Catalyst Carrier R-630 (Manville), palha de trigo, sabugo de milho, ágar-ágar e espumas de poliuretano comercial (Scotch-Brite^{MR}) cortadas em cubos de 6 mm³ com densidade aparente de 0,02 ± 0,01 g/cm³ e diâmetro médio de poros de 0,36 ± 0,14 mm.

Dependendo do tipo de suporte diferentes tratamentos foram efetuados. Os suportes de origem vegetal (palha de trigo e bagaço de milho) foram triturados em moinho, classificados, lavados com água e submetidos a secagem em estufa a 80 °C (Figura 3.6. a,b). O suporte baseado em ágar-gar foi preparado a partir da dissolução de 40% de ágar-gar em água destilada e após solidificação, o ágar foi cortado em quadrados de 1 cm²

(Figura 3.6. c). Os suportes Celite[®] (Figura 3.6. d) e PHB (Figura 3.6. e) foram imersos em solução aquosa de etanol 50% por 30 min a fim de retirar o ar contido dentro das partículas. Em seguida, foram filtrados e submetidos a secagem a 60 °C até atingirem umidade inferior a 5%. As espumas de Scotch-Brite^{MR} (Figura 3.6. f) tiveram sua manta abrasiva de fibra sintética removida (fração verde) e a parte de poliuretano (fração amarela) foi cortada em cubos de 6 mm³ e em seguida imersas numa solução aquosa de ácido nítrico 0,1 mol/L por 24 horas para a retirada de agentes bactericidas, e logo após foram lavadas em água corrente até atingirem pH 7,0 e submetidas a secagem a temperatura ambiente.

Figura 3.6. Suporte para imobilização de fungos: a) palha de trigo; b) bagaço de milho; c) ágar-ágar; d) Celite[®]; e) PHB; f) espumas de poliuretano

Fonte: própria

3.3.3. Materiais de partida

Como materiais de partida na síntese de biodiesel foram utilizados: etanol anidro Cromoline 99,8%, (São Paulo, SP), amostras de óleo de andiroba fornecidas gentilmente pela BASF (Jacareí, São Paulo), amostras de óleo de coco refinado fornecidas pela FRESCOCO (São Paulo-SP); amostras de óleo de macaúba adquiridas da Associação dos Pequenos Produtores Rurais de Riacho D'Antas e Adjacências- Fazenda Riacho D'Antas (Minas Gerais), amostras de óleo de palma fornecidas pela AGROPALMA (Belém, Pará, Brasil) e amostras de óleo de pinhão manso fornecida pelo Instituto Agrônomo do Paraná –IAPAR (Londrina-PR, Brasil).

3.3.4. Outros reagentes

Os demais reagentes utilizados foram: Solvente terc-butanol (Cromoline), etanol hidratado (96%, Cromoline), acetona (Cromoline), KOH (85% de pureza; Cromoline), indicador ácido-base (fenolftaleína - Coleman), ácido nítrico (65% pureza; Cromoline), óleo de oliva virgem com acidez baixa (Carbonell), glicose (Sigma-Vetec), frutose (Sigma-Vetec), glicerol (Merck) e goma arábica em pó pura (Synth). Os padrões cromatográficos foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.3.5. Equipamentos utilizados

Os principais equipamentos utilizados nesta etapa do trabalho estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/Fabricante
Crescimento celular	Shaker (incubadora refrigerada)	MA-830 (Marconi ^{MR})
Teor de umidade	Balança analítica	ID 50, Marte (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda.)
Dosagem de ésteres etílicos (biodiesel)	Cromatógrafo a gás	Modelo GC-3800, Varian (Varian Inc. Corp)
Dosagem de ésteres etílicos (biodiesel)	Espectrofotômetro RMN ¹ H	Varian, modelo Mercury-300 MHz.
Dosagem de monoacilgliceróis e diacilgliceróis	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	Agilent 1200 Series (Agilent Technologies)
Densidade	Densímetro	Modelo DMA 35N EX (Anton Paar)
Viscosidade	Viscosímetro	Modelo LVDVIII-CP 520, (Brookfield)

3.3.6. Procedimentos

3.3.6.1. Esterilização dos meios e equipamentos

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, os meios de cultura, bem como os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Para descarte dos meios de cultura e materiais contaminados, o período de esterilização se estendia até 30 min.

3.3.6.2. Seleção da fonte de carbono na produção de lipase ligada ao micélio

O estudo dos aspectos inerentes à morfologia e capacidade de adaptação do microrganismo, bem como do seu potencial na produção de biomassa com elevada atividade lipolítica foi verificado por meio de cultivos em diferentes fontes de carbono como glicose, frutose, glicerol e azeite de oliva. Para tanto, uma suspensão de esporos de *M. circinelloides* URM 4182 (1×10^6) foi inoculada em frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 100 mL de meio de cultura, como descrito na Tabela 3.3, e incubados a 30 °C durante 72h sob agitação orbital em shaker (170 rpm).

A biomassa celular foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com água e acetona e seca em bomba de alto vácuo. A atividade lipolítica da biomassa celular e do filtrado foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (ANDRADE et al, 2014) e a umidade da biomassa por secagem em estufa acoplada com infravermelho (3.3.8.1).

Tabela 3.3. Composição do meio de cultura para o crescimento de biomassa de *M. circinelloides* URM 4182

Nutriente	Quantidade
Fonte de carbono	3 g
Peptona de soja (Himedia)	7 g
K ₂ HPO ₄ (Vetec)	0,1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Vetec)	0,05 g
NaNO ₃ (Vetec)	0,1 g
Água destilada	100 mL

Fonte: própria

3.3.6.3. Imobilização das células íntegras dos fungos

O crescimento das células concomitante à imobilização em suportes sólidos procedeu-se a 30 °C durante 72h sob agitação orbital em shaker (170 rpm). Para tanto, uma suspensão de esporos de 1×10^6 foi adicionada em frascos Erlemeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio de cultura e o suporte (100 cubos de poliuretano, 5 g de Celite[®], 10 g de PHB, 5 g de sabugo de milho, 3 g de farelo de trigo, 10 cubos de 1 cm² de ágar-ágar) previamente esterilizados.

A biomassa imobilizada foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com água e acetona e seca em bomba de alto vácuo. Ao final do processo, a atividade lipolítica da biomassa celular e do filtrado foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (ANDRADE et al., 2014) e a umidade da biomassa por secagem em estufa acoplada com infravermelho.

3.3.6.4. Síntese e purificação de ésteres etílicos

A etanólise dos óleos vegetais foi realizada em frascos Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, fechados com rolhas, contendo 30 gramas de meio reacional composto de matéria-prima lipídica (óleos de andiroba, coco, macaúba, palma e pinhão manso) e etanol numa razão molar fixa de 1:8 óleo/etanol, 30 gramas de solvente terc-butanol e 20% de catalisador em relação à massa do óleo utilizada. Os experimentos foram conduzidos a 35 °C por um período máximo de 120 h sob agitação orbital de 170 rpm, com amostragens periódicas a cada 24 h.

Ao término das reações o biocatalisador (células íntegras imobilizadas) foi separado do meio reacional e a fase orgânica lavada com água para remoção do glicerol. A fase composta pelos ésteres etílicos foi submetida à centrifugação (1570 g/15 min) e a evaporação em rota-evaporador para a remoção da água e etanol, sendo a água residual retirada pela adição de sulfato de sódio anidro (CARVALHO et al., 2013).

3.3.7. Métodos de Análise

3.3.7.1 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica das células íntegras foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Andrade et al., (2014). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 mL de azeite de oliva e 90 mL de goma arábica a 3% (m/v).

Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 0,3 g de biomassa celular (massa seca).

Os frascos foram incubados a 37 °C por 10 min, em banho termostatizado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona, etanol e água destilada (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,025 mol/L, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela Equação 3.1 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em µmoles/g.min (U/g).

$$Atividade \ (\mu mol / g \cdot min) = \frac{(V_A - V_B) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (3.1)$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_B = volume do KOH gasto na titulação do branco (mL), M = molaridade da solução de KOH (mol. L⁻¹), t = tempo de reação em min, m = massa em gramas.

3.3.7.2 Caracterização das propriedades dos óleos vegetais

Os óleos vegetais foram caracterizados quanto aos índices de acidez, iodo, saponificação e peróxido, adotando normas estabelecidas pela AOCS (2004). O índice de acidez foi determinado de acordo com a Norma Cd 3d-63 e o resultado calculado pela relação entre a massa de hidróxido de potássio consumida (mg) por grama de amostra analisada. Para determinação do índice de iodo, foi utilizado o Método Cd 1b-87, expressando o resultado em quantidade de iodo reagido em 100 g de gordura ou óleo. O índice de saponificação foi determinado de acordo com método Ti Ia-64, sendo o resultado calculado pela quantidade de álcali em miligramas necessária para saponificar um grama de amostra. Na determinação do índice de peróxido foi utilizado o método oficial Cd 8b-90, tendo como resultado a quantidade, em miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra.

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia em fase gasosa segundo norma descrita pelo AOCS (2004) empregando cromatógrafo a gás (CGC Agilent 68650 Series GG System), equipado com coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropil-methylpolysiloxane, dimensões 60 m, diâmetro interno: 0,25 mm, 0,25 µm filme) operando nas seguintes condições: fluxo coluna = 1,00 mL.min⁻¹, velocidade linear = 24 cm.sec⁻¹,

temperatura do detector = 280 °C; temperatura do injetor = 250 °C; temperatura do forno = 110 °C, mantendo-se constante por 5 min e em seguida sendo elevada a 215 °C numa taxa de 5°C. min⁻¹, mantendo-se constante por 24 min; como gás de arraste foi utilizado hélio.

3.3.7.3 Qualidade do biodiesel obtido

A viscosidade do biodiesel purificado foi medida em viscosímetro Brookfield, modelo LVDVII e a densidade em densímetro Anton Paar, modelo DMA 35N (CARVALHO et al., 2013).

As amostras purificadas de biodiesel obtidas foram analisadas quanto ao teor de ésteres de etila (Tabela 3.4) em cromatógrafo a gás (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de chama ionizante e coluna capilar de sílica fundida do tipo BPX70-70% de Cianopropil com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Nitrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo de 37,2 mL/min. A coluna foi submetida a uma rampa de temperatura de 110 °C (3 min), 110 °C a 160 °C (8 °C/ min) e 160 °C à 230 °C (3,5 °C/ min). A coleta de dados foi realizada utilizando o software Varian Star Data System version 6. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL em *n*-heptano e padrão interno (C:23). A quantificação foi realizada pela calibração interna, conforme estabelecido por Visentainer e Franco (2006).

Tabela 3.4. Condições de operação para a determinação dos ésteres etílicos purificados

Programa de Temperatura	110 °C/ 3 min, 160 °C e 230 °C	
Taxa de aquecimento	8 °C/ min, 3,5 °C/ min	
Gás de arraste	Nitrogênio	
Preparo da amostra	0,02 g de amostra em balão volumétrico (100 mL) aferido com <i>n</i> -heptano	
Amostra para injeção	1 mL: 0,2 mL	
		minutos
Tempos de retenção dos Monoésteres de etila	C8 EtOH	5,38
	C10 EtOH	7,42
	C12 EtOH	9,73
	C14 EtOH	12,23
	C16 EtOH	15,02
	C18 EtOH	18,04
	C18:1 EtOH	18,59
	C18:2 EtOH	19,56
	C20 EtOH	21,16
	C21 EtOH	22,72
	C22 EtOH	24,26
	C23 EtOH	25,87

- *Análise do teor de éster pela técnica de RMN ¹H*

O teor de ésteres de etila foi confirmado tomando por base os dados gerados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN¹H) utilizando em espectrômetro Varian, modelo Mercury-300 MHz e a conversão em ésteres foi determinada de acordo com a equação validada por Paiva et al., (2013). As amostras purificadas foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl₃). Este método permite a identificação de moléculas de éster obtidas durante a transesterificação, presentes na região de 4,05-4,35 ppm. De acordo com a Equação 3.2, a porcentagem de ésteres etílicos formados pode ser calculada.

$$\% EE = [(Ac4 \times 8) / (Add + ee)] \times 100 \quad (3.2)$$

Em que: Ac4 = área do pico quarto componente (quarteto); Add + ee = área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05 ppm; % EE = rendimento de ésteres etílicos.

Nesta equação, a Ac4 foi obtida a partir de integração do pico localizado em 4,08 ppm. A área corresponde a 1/8 da área total da etoxi-carbono hidrogênio (-OCH₂), cujo sinal é apresentado na região variando 4,05-4,20 ppm. A região perto de 4,08 ppm é a única região onde o pico de ressonância não apresenta sobreposição com nenhum outro sinal de mono-, di- ou triacilgliceróis, e este sinal integrado pode ser atribuído aos ésteres etílicos.

- *Quantificação de mono-, di- e triacilgliceróis*

Os monoacilgliceróis e diacilgliceróis residuais da síntese de biodiesel foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Inc. SP, Brasil), com detector evaporativo de espalhamento de luz e coluna de aço inoxidável Fenomenex Gemini C18 110 A (150x 4,6 mm) (Allcrom, Ltd., SP, Brasil), nas seguintes condições: temperatura da coluna de 40 °C e do detector de 70 °C. Todos os solventes utilizados eram de grau de HPLC (JT Baker, Performance Materials Avantor TM, Xalostoc, Edo. De Mex. México). As fases móveis utilizadas foram: acetonitrila (A) e metanol (B). A mistura de solventes empregada foi: 80% A e 20% B por 35 min. A taxa de fluxo de 1 mL/min foi mantida durante 6 min, 1,5

mL/min durante 30 min e 3,0 mL/min durante 35 min. Todas as amostras foram dissolvidas em acetato de etilo-hexano (1:1, v / v) e os volumes de injeção foram de 10 µL.

Os padrões utilizados foram a monolaurina, monomiristina, monopalmitina, monoestearina, monooleína, dilaurina, dipalmitina, dimiristina, diestearina, dioleína. Os teores de monoacilglicerois e diacilglicerois foram calculados nas amostras de biodiesel purificadas (ANDRADE et al., 2014).

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Propriedades dos óleos vegetais

O estudo de diferentes matérias-primas lipídicas para a produção de biodiesel é de grande relevância visto que a estrutura molecular dos ésteres alquílicos obtidos pela transesterificação depende das características estruturais dos ácidos graxos da matéria-prima precursora. No presente trabalho foram utilizadas como matérias-primas lipídicas os óleos de andiroba, coco, macaúba, palma e pinhão manso. A motivação do uso dessas matérias-primas está no fato de apresentarem um forte potencial para a produção de óleo combustível, tendo em vista que são de baixo custo e abundantes em localidades carentes de fontes de energia, o que estimula a realização de pesquisas nesta área, procurando benefícios ambientais, energéticos e econômicos.

As amostras dos óleos vegetais foram caracterizadas quanto aos teores de interesse para controle de qualidade, incluindo índices de acidez, iodo, peróxido, saponificação e composição em ácidos graxos. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 3.5.

Os índices de acidez e peróxido indicam a deterioração do material lipídico em termos de rancidez hidrolítica (pelo índice de acidez) a partir da concentração de ácidos graxos livres e rancidez oxidativa (pelo índice de peróxido). O índice de saponificação é útil para verificar a massa molecular média e a possível adulteração por outros óleos com índices de saponificação muito diferentes. O índice de iodo revela o grau de insaturação da matéria-prima.

Os valores determinados para o índice de acidez variaram de 0,09 a 16,11mg KOH/g de óleo, sendo o valor mais elevado observado para o óleo de macaúba (16,11 mg KOH/g), provavelmente devido às condições inadequadas de manuseio das sementes de macaúba, incluindo colheita, refrigeração, armazenamento ou técnicas de extração dos óleos das sementes (artesanal e industrial). Tais condições podem favorecer a degradação oxidativa e a hidrólise dos triacilgliceróis contidos nos óleos, alterando de forma significativa as características físico-químicas dos mesmos.

O índice de Iodo das matérias-primas lipídicas variou entre 25 a 101 g I₂/100g, satisfazendo uma importante característica para ser usado como matéria-prima para obtenção de biocombustível. Estudos efetuados por Knothe (2002) mostraram que valores

superiores a 120g I₂/100g, indicam menor estabilidade oxidativa dos óleos, que prejudica sua aplicação industrial.

O índice de peróxido variou de 0,36 a 4,23 meq g/Kg atendendo o limite estabelecido pela legislação para óleos comestíveis (BRASIL, 1999), no qual o máximo permitido é da ordem de 10 meq g/Kg. Entretanto, para utilização como matéria-prima em reações enzimáticas o valor máximo recomendado é da ordem de 5 meq/Kg. A polimerização das lipases ocorre devido a presença de hidroperóxidos, os quais levam a desativação da lipase. Valores de peróxido superiores a 5 meq/Kg foram designados como inibidores da atividade enzimática, enquanto que em outros estudos, produtos da oxidação secundária levaram a efeitos mais acentuados, que os produtos da oxidação primária, na estabilidade das enzimas (IBRAHIM et al., 2007).

Os ácidos graxos são caracterizados de acordo com o seu comprimento da cadeia de carbono e seu número de ligações duplas (nível de insaturação). As propriedades físicas e químicas do biodiesel basicamente dependem da composição em ácidos graxos do triacilgliceróis utilizado na produção. A composição dos ácidos graxos dos óleos vegetais utilizados nesse estudo (Tabela 3.5) indicam uma composição bastante diversificada, que permite verificar o desempenho do biocatalisador em termos de seletividade da reação.

De acordo com a Tabela 3.5 é possível observar que os óleos de macaúba e de coco, mostraram perfil semelhante apresentando uma composição predominantemente láurica. Esta característica é importante, uma vez que os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que podem interagir mais facilmente com o agente acilante e com o catalisador provendo a reação de transesterificação. É possível também verificar que o óleo de coco possui 93% de ácidos graxos saturados apresentando assim um perfil antagônico ao óleo de pinhão-mansão que tem em sua composição 81% de ácidos graxos insaturados.

O tamanho e o número de insaturações da cadeia de carbono é também um fator decisivo para algumas propriedades do biodiesel. Como exemplo, observa-se que a elevação do número de cetano, calor de combustão (medida de conteúdo energético) e dos pontos de fusão e ebulição do combustível são reflexos do aumento do comprimento da cadeia carbônica dos ésteres.

Tabela 3.5. Propriedades físico-químicas e composição em ácidos graxos dos óleos vegetais utilizados para a produção de biodiesel

Propriedade	Óleo vegetal				
	Andiroba	Coco	Macaúba	Palma	Pinhão manso
Viscosidade Cinemática 40 °C (mm ² /s)	38,72	29,0	29,80	36,80	34,53
Índice de Acidez (mg KOH/g de óleo)	0,09	0,41	16,11	0,33	0,30
Índice de Saponificação (mg KOH/ g óleo)	200	238	223	198	141
Índice de Iodo (g I ₂ / 100 g de óleo)	69	25,0	28	98	101
Índice de Peróxido (meq/ kg de óleo)	1,70	0,36	3,96	2,05	4,23
Composição em ácidos graxos (%m/m)					
Caprílico C8	-	8,90	5,39	-	-
Cáprico C10	-	6,20	3,96	-	-
Láurico C12	0,05	47,10	36,09	0,10	0,02
Mirístico C14	0,06	18,80	10,19	1,20	0,07
Palmítico C16	29,01	7,80	8,65	46,80	12,90
Esteárico C18	9,95	2,58	3,58	3,80	5,63
Oleico C18:1	46,90	6,10	27,70	37,60	39,73
Linoleico C18:2	10,74	1,60	3,39	10,50	40,00
Outros	2,19	0,95	0,4	-	0,58
Saturados (%m/m)	40,91	92,2	68,14	51,9	18,62
Monoinsaturados (%m/m)	47	6,19	27,82	37,60	39,8
Polinsaturados (2,3) (%m/m)	10,99	1,6	3,39	10,50	40,22
Grau de insaturação (%)	68,98	9,39	34,60	58,6	120,24

Fonte: própria

3.4.2. Produção e imobilização de células íntegras de *M.circinelloides* URM 4182

Diversos trabalhos têm reportado que os óleos vegetais são excelentes indutores na produção de lipase em diferentes tipos de microrganismos. Em especial, o óleo de oliva tem sido descrito como o principal indutor na produção de lipases em células de *Rhizopus oryzae* (BAN et al., 2001). A fim de investigar o crescimento da biomassa celular com elevado potencial lipolítico, foram testados glicerol, glicose, frutose e azeite de oliva como fontes de carbono e agentes indutores de lipases no cultivo de *M. circinelloides* URM 4182 (Figura 3.7).

Figura 3.7. Produção de células de *M. circinelloides* URM 4182: a) caldo fermentativo; b) biomassa celular

Fonte: própria

As diferentes fontes de carbono foram usadas numa concentração fixa de 30 g/L, e o cultivo foi realizado nas condições descritas na seção 3.3.6.2. A Tabela 3.6 mostra os resultados referentes à atividade hidrolítica da biomassa obtida após 72 h de cultivo.

Tabela 3.6. Atividade lipolítica em células íntegras de *M. circinelloides* URM 4182

Fonte de Carbono	Atividade enzimática (U/g)
Glicerol	72,4
Frutose	97,4
Glicose	121,1
Azeite de oliva	185,7

Fonte: própria

Conforme esperado, o óleo de oliva foi a melhor fonte de carbono para a produção de biomassa lipolítica de *M.circinelloides* URM 4182, alcançando uma atividade

hidrolítica de 185,7 U/g. As atividades hidrolíticas obtidas na biomassa na presença de outras fontes de carbono foram inferiores e variaram de 72 a 121 U/g.

Definida a fonte de carbono adequada para o cultivo das células e indução de lipase do *M.circinelloides* URM 4182, o estudo foi direcionado para seleção do suporte mais apropriado para imobilização das células íntegras.

Neste trabalho foi utilizada a técnica bastante elucidada na literatura de imobilização de células íntegras por adsorção (seção 3.1.2) para imobilização “*in situ*” das células do *M. circinelloides* URM 4182 nos suportes testados. Cada tipo de suporte empregado foi submetido a um tratamento específico como descrito na seção 3.3.2 para garantir uma melhor adesão das células (COVIZZI, 2007).

A técnica de adsorção permitiu formar um bom sistema de imobilizado mantendo a atividade lipolítica da biomassa. A Figura 3.8 mostra a microscopia óptica dos diferentes sistemas de imobilização e é possível observar a boa aderência das células do *M. circinelloides* URM 4182 em todos os suportes testados.

Figura 3.8. Crescimento da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182 com concomitante imobilização em: a) Celite®; b) PHB; c) sabugo de milho; d) ágar-ágar; e) palha de trigo

Fonte: própria

Os valores mais elevados de atividade hidrolítica (176,64 U/g) foram obtidos para as células imobilizadas em suporte de espumas de poliuretano (PU), conforme apresentado na Tabela 3.7. Os demais sistemas imobilizados apresentaram valores mais baixos de

atividade entre 53,2 e 161,7 U/g, sendo que o sistema imobilizado em Celite® exibiu o pior desempenho. As células imobilizadas em ágar-ágar apresentaram boa atividade lipolítica, no entanto, este suporte tem baixa coesão, o que dificulta sua estabilidade no meio reacional.

Tabela 3.7. Atividade lipolítica em células de *M. circinelloides* URM 4182 imobilizadas em diferentes suportes

Suporte	Atividade enzimática (U/g)
PHB	78,75
Celite®	53,25
Ágar-ágar	161,70
Sabugo de milho	127,35
Farelo de trigo	107,94
PU (6x6x6 mm ³)	176,64

Fonte: própria

Desta forma selecionou-se o suporte PU para imobilização da biomassa celular e posterior aplicação na produção de biodiesel a partir da transesterificação dos óleos vegetais. A Figura 3.5 mostra a microscopia eletrônica de varredura (MEV) de um corte transversal da PU na qual é possível visualizar os poros, nos quais as células microbianas foram aderidas durante o cultivo. Na Figura 3.4 é possível visualizar as células imobilizadas em PU e pode-se notar uma mudança na morfologia quando comparadas as células cultivadas em meio sólido ágar batata BDA (Batata Dextrose Agar – Difco) (Figura 3.4.).

Esse comportamento celular também foi relatado em diferentes trabalhos descritos na literatura, demonstrando que o cultivo de células com concomitante imobilização espontânea em PU é uma técnica potencial que permite obter um sistema de células íntegras imobilizadas que garante forte adesão das células às matrizes impedindo seu desprendimento para o meio reacional mesmo sob agitação vigorosa.

Figura 3.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): a) seção transversal da espuma de poliuretano; b) seção transversal das células imobilizadas em espumas de poliuretano.

Fonte: própria

Andrade et al. 2012, pesquisaram a imobilização da biomassa de diferentes fungos com alta atividade lipolítica em suporte de poliuretano e constataram que as alterações morfológicas das células livres e imobilizadas em poliuretano afetam diretamente na atividade catalítica das enzimas ligadas ao micélio. Resultados semelhantes foram também reportados por Chen e McGill (1992), que elucidaram diferenças nas atividades lipolíticas entre as células cultivadas livremente e as imobilizadas em poliuretano comprovando ainda que alterações nos valores de atividade podem ser em virtude das alterações morfológicas causadas pela diferença de cultivo.

Oda e colaboradores (2005) estudaram a estabilidade e durabilidade das células de *Rhizopus oryzae* livres e imobilizadas em poliuretano, como catalisadores em processos consecutivos de metanólise. Os mesmos autores constataram que a utilização de células microbianas com elevada atividade lipolítica, quando imobilizadas em partículas de suporte de poliuretano, são eficientes como biocatalisadores. Além disso, os custos operacionais são reduzidos uma vez que a imobilização pode ser alcançada espontaneamente durante o cultivo das células e nenhum processo de purificação da lipase foi necessário.

3.4.3. Etanólise dos óleos vegetais

O desempenho das células íntegras de *M. circinelloides* URM 4182 imobilizadas em espumas de poliuretano (atividade hidrolítica= $192 \pm 5,2$ U/g) foi testado na reação de transesterificação de diferentes óleos vegetais utilizando etanol como agente acilante. Nesta série de ensaios, as reações foram conduzidas conforme metodologia descrita na seção 3.3.6.4, utilizando uma quantidade de 20% em massa de biocatalisador, com relação aos reagentes de partida, óleo e etanol.

O monitoramento das reações foi efetuado em termos de ésteres de etila formados em função do tempo de reação, conforme mostrado na Figura 3.6, para todos os óleos testados. Os rendimentos de transesterificação (Tabela 3.8 e 3.9) foram calculados com base nos dados de cromatografia gasosa e confirmados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H). No produto purificado foram também quantificados os valores de viscosidade, densidade e teores residuais de monoacilgliceróis e diacilgliceróis (Tabela 3.9). O progresso das reações de etanólise em termos de rendimento em ésteres mostrado na Figura 3.10, indica que o biocatalisador foi capaz de transesterificar todos os óleos vegetais testados, entretanto tanto a velocidade de reação como a formação dos ésteres foi dependente da fonte do óleo vegetal.

Os valores mais elevados foram obtidos em 96 h para os óleos de coco (97%) e macaúba (95%) que apresentam elevada proporção de ácido graxo saturado (>70%). Para os óleos vegetais com teores mais elevados de ácidos insaturados em sua composição uma redução do valor de rendimento de transesterificação foi verificada, sendo obtido em 120 h valores de 90% para o óleo de pinhão manso que contem em sua composição 81% de ácidos graxos insaturados. Verifica-se ainda uma correlação entre a composição dos ésteres de etila e os ácidos graxos presentes nas matérias-primas (Tabela 3.5).

Como esperado, o laurato de etila foi o principal éster produzido na reação dos óleos de coco e macaúba, que apresentam composições similares em ácidos graxos, ou seja, composição predominantemente láurica. Por outro lado, a etanólise dos óleos de andiroba e pinhão manso produziram níveis mais elevados de ésteres insaturados, tais como o oleato de etila e linoleato de etila, também em conformidade com a composição e o perfil dos ácidos graxos presentes nos óleos correspondentes.

Figura 3.10. Rendimento em éster de etila na reação de etanólise de diferentes óleos vegetais: (□) óleo de andiroba, (●) óleo de coco, (○) óleo de macaúba, (■) óleo de palma e (▲) óleo de pinhão manso.

Fonte: própria

Esses resultados indicam que a composição em ésteres de etila do biodiesel está diretamente relacionada à composição de ácidos graxos da matéria-prima precursora, sugerindo que a lipase de *M. circinelloides* URM 4182 tem maior especificidade para catalisar a clivagem de ácidos graxos saturados de cadeia curta, tais como aqueles encontrados nos óleos de coco e macaúba.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão conformidade com aqueles reportados por Andrade e colaboradores (2014) referentes à síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu mediada por células integras desta mesma linhagem de *Mucor circinelloides*.

Esse comportamento também é consistente com o observado por Song e colaboradores (2008) na avaliação da especificidade de diferentes lipases fúngicas na hidrólise de ésteres. Esses pesquisadores determinaram que a lipase de *Mucor racemosus* tem maior especificidade para hidrolisar ésteres de metila saturado, como laurato e octanoato. Desta forma, os melhores rendimentos reportados foram obtidos quando cepas com diferentes especificidades foram usadas como biocatalisadores na transesterificação de óleos vegetais poli-insaturados.

Tamalampudi e colaboradores (2008) avaliaram o desempenho de células íntegras de *Rhizopus oryzae* imobilizada na metanólise do óleo de pinhão manso e verificaram rendimentos de 80% após 60 h de reação. Xiao e colaboradores (2010) otimizaram a

metanólise do óleo de palma catalisada por células de *Aspergillus niger* imobilizada e relataram rendimentos de 87% a 40° C, após 72 h de reação.

Esse desempenho promissor do biocatalisador foi confirmado pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN ^1H) (Figura 3.11 a-e), que comprovou a elevada conversão dos óleos vegetais em ésteres etílicos, uma vez que todos os espectros apresentaram o quarteto em 4,1 ppm referente ao desdobramento do pico correspondente ao hidrogênio metilênico presente na estrutura dos ésteres etílicos (PAIVA et al., 2013).

Figura 3.11. Espectro RMN ^1H integrado dos ésteres etílicos obtidos a partir da etanólise dos óleos: a) andiroba, b) coco, c) macaúba, d) palma, e) pinhão manso catalisada por células integras de *M. circinelloides* URM 4182 imobilizada em poliuretano

Fonte: própria

A Tabela 3.8 mostra as áreas dos sinais correspondentes para os ésteres de etila, e a conversão de porcentagem de óleos baseado em espectro RMN¹H alcançado em outras amostras de biodiesel. Estes resultados confirmam que rendimentos elevados em ésteres de etila foram alcançados na transesterificação de diferentes óleos vegetais por células íntegras imobilizadas em espumas de poliuretano e são consistentes com os resultados obtidos por cromatografia de fase gasosa.

Tabela 3.8 - Área de integração dos sinais nos espectros e conversão porcentual dos óleos vegetais em ésteres de etila determinados por RMN¹H

Biodiesel	Área Ac4	Área Add+ee	Conversão (%)
Andiroba	0,16	1,37	93
Coco	0,16	1,34	96
Macaúba	0,17	1,44	94
Palma	0,19	1,66	92
Pinhão manso	0,14	1,26	88

Fonte: própria

A aplicação da técnica RMN ¹H, apesar de ser plenamente aceita como uma metodologia precisa apresenta ainda limitações como ferramenta útil na quantificação do teor de ésteres no biodiesel. Esclarecimentos de vários questionamentos foram reportados por Rosset e colaboradores (2011) que aplicaram a técnica de RMN ¹H (Figura 3.12 a, b) no monitoramento da reação de transesterificação de óleo vegetal com etanol e constataram que a região entre 4,00 e 4,40 ppm do espectro é a área padrão de biodiesel, pois exhibe sinais gerados por átomos de hidrogênio associados com os grupos metilênico dos ésteres etílicos representado no espectro por um quarteto representado pelo símbolo a". Além disso, os autores analisaram o espectro de RMN ¹H de uma amostra de óleo vegetal que apresentou um duplo quarteto referente aos triacilgliceróis representados no espectro pelos símbolos (a') e (a).

Na Figura 3.11 (a) os espectros de RMN ¹H apresentam sinais na região 4,00-4,40 ppm, associados com os hidrogênios metilênicos de ésteres etílicos de cadeia longa (biodiesel) e os triacilgliceróis do óleo. Os espectros mostram também quintetos nas regiões entre 3,69 e 3,86 ppm e entre 4,86 e 5,15 ppm que são atribuídos aos hidrogênios metilênicos dos monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG).

Figura 3.12. a) Espectro RMN ^1H integrado do biodiesel e triglicerídeo

Fonte: Adaptado de (ROSSET et al., 2011).

Figura 3.12. b) Espectro RMN ^1H integrado das regiões de formação de mono-, di-, triglicerídeo e ésteres etílicos

Fonte: Adaptado de (ROSSET et al., 2011).

Avaliando a Figura (3.11 a-e) é possível observar que os sinais correspondentes a formação de MAG e DAG estão também presentes em baixas concentrações quando comparados a concentração de ésteres etílicos representados pelos sinais que compõem o quarteto na região entre 4,00 e 4,40 ppm.

Esses resultados foram comprovados com a análise realizada em CLAE (Tabela 3.9), sendo detectados teores entre 3 a 10% (MAG+DAG). A quantificação de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis no produto da etanólise de óleos vegetais é importante uma vez que uma elevada quantidade desses resíduos lipídicos, torna o biodiesel turvo e aumenta a viscosidade, diminuindo sua qualidade e consequentemente tornando-o incompatível para ser utilizado como combustível.

Quanto aos teores de monoacilgliceróis e diacilgliceróis nenhuma amostra atendeu os limites mínimos estabelecidos pela ANP que são de 0,80 e 0,20 % m/m respectivamente (ANP 2015). No entanto, todas as amostras foram isentas de triacilgliceróis mostrando a eficiência do biocatalisador na reação.

Tabela 3.9. Propriedades dos ésteres de etila obtidos na etanólise dos óleos vegetais mediada por células íntegras de *Mucor circinelloides* URM 4182

Propriedade	Óleo vegetal				Pinhão manso
	Andiroba	Coco	Macaúba	Palma	
Densidade (kg/m)	892	897	892	890	892
Viscosidade (mm ² /s)	7,9	5,8	6,4	7,1	8,9
Esteres de etila (Total %)	92	97	95	93	90
Octanoato de etila (C8)	-	7,5	5,4	-	-
Decanoato de etila (C10)	-	5,9	3,7	-	-
Laurato de etila (C12)	-	48,3	37,3	-	-
Miristato de etila (C14)	-	14,8	8,8	-	-
Palmitato de etila (C16)	33,6	6,9	7,8	49,3	13,8
Estearato de etila (C18)	6,7	2,0	2,7	4,3	5,6
Oleato de etila (C18:1)	38,9	8,4	24,9	35,7	38,5
Linoleato de etila (C18:2)	13,4	1,9	3,0	6,0	34,3
Monoacilgliceróis (%)	6,4	2,0	3,6	4,0	7,9
Diacilgliceróis (%)	1,6	1,0	1,4	3,0	2,1

Fonte: própria

Os resultados apresentados na Tabela 3.9 mostram também os rendimentos em ésteres etílicos bem como as propriedades das amostras de biodiesel, com relação aos valores de viscosidade e densidade. Os teores de ésteres variaram de 90 a 97%, deste modo é possível constatar que apenas o produto obtido da transesterificação do óleo de coco está de acordo com a especificação da ANP de maio de 2012 que instituiu um limite mínimo de 96% m/m de ésteres etílicos (ANP, 2015).

A viscosidade é uma propriedade importante de biodiesel porque afeta fluidez de combustível e o funcionamento dos injetores de combustível. Viscosidade elevada conduz pouca atomização de combustível e menor desempenho dos injetores de combustível (KNOTHE, 2005). A análise de viscosidade pode também ser usada como um controle da qualidade da reação de transesterificação, confirmando a formação de ésteres de óleos vegetais por meio da redução da viscosidade da matéria-prima (CARVALHO et al., 2013).

Todas as amostras purificadas mostraram redução acentuada na viscosidade em comparação aos valores das viscosidades dos óleos originais em média 29 mm²/s. Os menores valores de viscosidade foram 5,8 e 6,4 mm²/s para amostras de biodiesel dos óleos de coco e macaúba, respectivamente. Os valores de viscosidade mais elevados foram obtidos para os produtos da etanolise dos óleos de andiroba, palma e pinhão manso que são as matérias-primas com maior teor de ácidos graxos insaturados, comprovando a especificidade das enzimas ligadas ao micélio de *M. circinelloides* URM 4182 para ácidos graxos saturados de cadeia curta. Desta forma, apenas a amostra de biodiesel proveniente do óleo de coco satisfaz os limites impostos pelas normas vigentes nos EUA (ASTM D6715), União Europeia (EN 14214) e Brasil (ANP/ 45).

3.4.4. Influência da lipase e do solvente na especificidade da catalise enzimática

A especificidade das lipases refere-se a sua regiospecificidade e especificidade em relação ao comprimento da cadeia de carbono do ácido graxo. Os elevados rendimentos em éster de etila observados para os óleos de coco e de macaúba em comparação com os outros óleos vegetais sugerem que a lipase de *Mucor circinelloides* URM 4182 tem alta especificidade para ácidos graxos saturados (Tabela 3.9).

A alcoólise dos triacilgliceróis (TGA) é realizada em três reações sucessivas: TGA a diacilglicerol (DAG), DAG a monoacilglicerol (MAG) e MAG em éster alquílico gerando glicerol como coproduto, sendo que cada etapa de reação libera uma molécula de interesse (éster alquílicos). A clivagem enzimática inicial do TAG para DAG pela lipase parece ser a etapa limitante das três reações reversíveis, porque a clivagem do DAG é mais

rápida que a reação anterior. A migração do grupo acila de 1,2-DAG para 1,3-DAG e 2-MAG para 1-MAG, que precedem a reação, promovem um rendimento elevado de biodiesel (Figura 3.13).

As lipases *sn*-1,3-específicas, tais como *Rhizopus oryzae* (BAN et al., 2002) e *Mucor miehei* (GOH; YEONG; WANG, 1993), catalisam eficientemente a transesterificação do óleo vegetal para ésteres de etila com rendimentos superiores a 90%. Este elevado rendimento de transesterificação enzimática resulta da migração de resíduos acila para posições específicas na molécula de glicerol, pois mesmo sendo enzimas *sn*-1,3-específica estas lipases parecem ser eficientes para clivar ácidos graxos de TAG, visto que ao clivarem os ácidos graxos nas posições *sn*-1,3 promovem a migração de resíduos acila da posição *sn*-2 para posições terminais (*sn*-1 e *sn*-3) no glicerol (ANTCZAK et al., 2009).

Por outro lado, a migração de grupo acila pode ser influenciada pela polaridade do solvente usado na reação de transesterificação. De acordo com Li et al. (2010), a redução da polaridade do solvente aumenta as constantes de velocidade de migração do grupo acila devido à influência favorável da dispersão da carga sobre o estado de transição, conduzindo a rendimentos variados de biodiesel.

Figura 3.13. Esquema da transesterificação de TGA catalisada por lipase 1,3-específica com a migração do grupo acila.

Fonte: Adaptado de (LI et al., 2010)

Apesar de atingir elevados rendimentos em ésteres, provavelmente devido à regiospecificidade da lipase de *Mucor circinelloides*, quantidades consideráveis de MAG e DAG foram detectadas no final do processo de transesterificação (Tabela 3.9). Este fato sugere que a taxa de migração do grupo acila e polaridade do solvente representam importantes fatores que influenciam a produção de biodiesel, quando células íntegras de *Mucor circinelloides* são usadas como biocatalisador.

Estes resultados são consistentes com aqueles relatados por Li e colaboradores (2010) para reações de metanólise mediadas por células íntegras de *Rhizopus oryzae*, nas quais elevadas concentrações de MAG e DAG e baixos rendimentos em ésteres de metila foram obtidos na presença de *tert*-butanol como solvente. Estes autores também relataram efeitos de diferentes concentrações de MAG e DAG e posições na molécula de glicerol, em função do tempo de reação.

Os resultados mostraram o acúmulo inicial de 1,2-DAG e 2-MAG revelando a especificidade posicional da lipase na 1,3-posição do triacilglicerol e no acilglicerois parciais. Os 1,2-DAG e 2-MAG acumulados foram gradualmente convertidos em 1,3-DAG e 1-MAG, o que indica a migração do grupo acila durante o processo de reação. No entanto, a taxa de migração do grupo acila parece ser mais lenta em meio contendo *tert*-butanol. Estudos adicionais são ainda necessários para esclarecer a influência de vários solventes sobre o processo de migração do grupo acila. Estudos adicionais são ainda necessários para esclarecer a influência de vários solventes sobre o processo de migração do grupo acila. Tais estudos podem esclarecer se um rendimento elevado de transesterificação está associado com a taxa de migração do grupo acila durante etanólise.

3.5. Conclusões

O desempenho catalítico de células íntegras de *Mucor circinelloides* URM 4182 imobilizadas em partículas de espuma de poliuretano foi avaliado na etanólise de diferentes óleos vegetais, incluindo a andiroba (*Carapa guianensis*), coco (*Cocos nucifera*), macauba (*Acromia aculeata*), palma (*Elaeis guineensis*) e pinhão-manso (*Jatropha curcas*). As reações foram efetuadas em condições fixas utilizando células imobilizadas na catálise de uma mistura de óleo vegetal/ etanol na razão molar de 1:8 usando *tert*-butanol como solvente. Nas condições testadas, o biocatalisador mostrou seletividade consistente na formação do éster correspondente de cada ácido graxo. Os rendimentos mais elevados foram obtidos na etanólise do óleo de coco (97%) e óleo de macaúba (95%) cujos perfis de

ácidos graxos mostraram predominantes concentrações de ácido láurico. Estes resultados sugerem elevada especificidade da lipase de *Mucor circinelloides* para converter ácidos graxos saturados em seus respectivos ésteres.

O conjunto de dados obtidos sugere que a formação de ésteres de etila a partir dos óleos vegetais testados é viável utilizando como biocatalisador, células íntegras de *Mucor circinelloides* URM 4182, com elevada atividade lipolítica, imobilizada em poliuretano. Apesar da atuação eficiente na conversão dos ácidos graxos presentes nos óleos em ésteres de etila correspondentes, os produtos obtidos não atenderam todos os parâmetros de estabelecidos pela ANP (Resolução nº 45/2014) para uso como biocombustível. Deste modo, para superar essa limitação é necessário aprofundar os estudos utilizando métodos não convencionais de aquecimento, como por exemplo, irradiação de micro-ondas e ultrassom nas reações de transesterificação.

Referências

- AARTHY, M.; SARAVANAN, P.; GOWTHAMANMK, R. C.; KAMINI, N. R. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: an overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, p.1591-1601, 2014.
- ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. R.; NAJAFI, G. Current biodiesel production technologies: a comparative review. **Energy Conversion Management**, v. 138-148, 2012.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Review**, v.42, p. 6406-6436, 2013.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; OLIVEIRA, E. D. C.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67, 2015.
- AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; SILVA, M. F.G.F.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JÚNIOR, M. Limonoids from andiroba oil and *Cedrella fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n.3, p. 542-547, 2006.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th ed. Champaign: AOCS, 2004.
- ANDRADE, G. S. S. **Produção de biodiesel a partir de óleos vegetais usando células íntegras imobilizadas de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica (Glicerol éster hidrolase – EC 3.1.1.3)**. 2012. 158f. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2012.
- ANDRADE, G. S. S.; CARVALHO, A. K. F.; ROMERO, C. M.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 37, p. 2539-2548, 2014.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Screening immobilization and utilization of whole cell biocatalyst to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183– 188, 2012.
- ANDRADE, A. M., PASSOS, P. R. A.; MARUQUES, L. G. C.; OLIVEIRA, L. B.; VIDAURRE, G. B.; ROCHA, J. D. S. Pirólise de resíduos do coco-da-baía (*Cocos nucifera* Linn) e análise do carvão vegetal. **Revista. Árvore**, Viçosa, v. 28, p. 707-714, 2004.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Boletim mensal do Biodiesel. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?pg=77873&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1445516412470> Acesso em: 08 de agosto de 2015.
- ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; BIELECKI, S. Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 261–268, 2002.

ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; MODRZEJEWSKA, Z.; PATURA, J.; KALINOWSKA, H.; BIELECKI, S. Stabilization of an intracellular *Mucor circinelloides* lipase for application in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 163-171, 2004.

ANTCZAK, T.; HILER, D.; KRYSTYNOWICZ, A.; SZCZSNA, M.; BIELECKI, S.; GALAS, E. Activity of immobilised in situ intracellular lipases from *Mucor circinelloides* and *Mucor racemosus* in the synthesis of sucrose esters. **Food Biotechnology**, v. 17, p. 221-227, 2000.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Review: enzymatic biodiesel synthesis – key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista de Oleoginosas e Fibrosas**, v. 8, p. 789-799, 2004.

ARUMUGAM, A.; PONNUSAMI, V. Biodiesel production from *Calophyllum inophyllum* oil using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within reticulated foams. **Renewable Energy**, v. 64, p. 276-282, 2014.

ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2070-2093, 2012.

AVHAD, M. R.; MARCHETTI J.M. A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 696-718, 2015.

AZEVEDO FILHO, J. A.; COLOMBO, C. A.; BERTON, L. H. C. Macaúba: palmeira nativa como opção bioenergética. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 9, p. 1-10, 2012.

BAJAJ, A.; LOHAN, P. N. J.; JHA, P.N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p.9-14, 2010.

BAN, K.; HAMA, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 39-43, 2001.

BAN, K.; HAMA, S.; NISHIZUKA, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 157-165, 2002.

BERGMANN, J. C., TUPINAMBA, D. D.; COSTA, O.Y.A.; ALMEIDA, J.R.M. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411-420, 2013.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p.73-81, 2002.

BOUAID, A.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Biorefinery approach for coconut oil valorisation: A statistical study. **Journal of Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4006-4012, 2010.

BRASIL-ANVISA. Resolução nº. 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, v. 196, 13 out. 1999. Seção I, p. 82-87.

BRASIL-MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Produtos potenciais da Amazônia: Andiroba**. Brasília: MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA, p.36, 1998.

CARVALHO, A. K. F.; DA RÓS, P. C. M.; TEIXEIRA, L. F.; ANDRADE, G. S. S.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 485–493, 2013.

CARVALHO, A. K. F.; FARIA, E. L. P.; RIVALDI, J. D.; ANDRADE, G. S. S.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Performance of whole-cells lipase derived from *Mucor circinelloides* as a catalyst in the ethanolysis of non-edible vegetable oils under batch and continuous run conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 287-294, 2015.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos antiinflamatórios**, (aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas). São Paulo: Tecmedd Editora, 1ª ed., 2004, v. 1, p. 480.

CESARINIA, S.; DIAZA, P.; NIELSEN, P.M. Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. **Process Biochemistry** v. 48, p. 484–487, 2013.

CHEN, J. P.; MCGILL, S. D. Enzymatic hydrolysis of triglycerides by *Rhizopus delemar* immobilized on biomass support particles. **Food Biotechnology**, v. 6, p. 1-18, 1992.

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H. C.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, p. 143-160, 2007.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C. Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. (Org.). **Biocatálise e Biotransformação: fundamentos e aplicação**. Salto-SP: Schoba, 2010. v. 1, p. 275-317.

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

DU, W.; LI, W.; SUN, T.; CHEN, X.; LIU, D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 331-337, 2008.

DUARTE, I. D.; ROGÉRIO, J. B.; ANTONIASSE, R.; BIZZO, H. R.; JUNQUEIRA, N. T.V. Variação da composição de ácidos graxos dos óleos de polpa e amêndoa de macaúba. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRO DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL 4º, Belo Horizonte-MG. **Anais...**, 2010, v.1, 63-64.

ENFREMEKO, E. N.; STEPANOV, N. A.; NIKOLSKAYA, A. B.; SENKO, O. V.; SPIRICHEVA, O. V.; VARFOLOMEEV, S. D. Biocatalysts based on immobilized cells of microorganisms in the production of bioethanol and biobutanol. **Catalysis in Industry**, v. 3, p. 41-46, 2011.

FERRARI, M.; MONTEIRO, L. C. L.; NETZ, D. J. A.; ROCHA FILHO, P. A. Identifying cosmetic forms and crystalline phases from ternary systems. **Cosmetics and Toiletries**, v. 118, n. 8, p.61-70, 2003.

FERRARI, R. A.; SOUZA, W. L. de. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p.106-111, 2009.

FERREIRA, J. A.; LENNARTSSON, P. R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Zygomycetes-based biorefinery: present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 523-532, 2013.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 2-12, 2009.

GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C. FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 34-43, 2013.

GOH, S. H.; YEONG, S. K.; WANG, C. W. Transesterification of cocoa butter by fungal lipases: effect of solvent on 1,3-specificity. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, p. 567-570, 1993.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. **The lipid handbook**. Londres: Chapman and Hall, 2007. 896p.

GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C. N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: techniques, factors and prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 171-190, 2013.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, M. G.; CASTILHO, L. R., Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5249-5254, 2009.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; MIURA, K.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 328-333, 2006.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 273-278, 2007.

HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Journal Chemical Biology**, v. 6, p. 185-205, 2013.

HWANG, H. T.; QI, F.; YUAN, C.; ZHAO, X.; RAMKRISHNA, D.; LIU, D.; VARMA, A. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: protein engineering and lipase production. **Biotechnology Bioengineering**, v. 111, p. 639-653, 2014.

IBGE - FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Informações estatísticas e geocientíficas**. [Informações on-line]. Acesso em <URL:http://www.ibge.gov.br> Acesso em: 14 de agosto de 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida e valor da produção da lavoura perma-nente: dendê**. 2012

IBRAHIM, N.A.; NIELSEN, S.T.; WIGNEWARAN, V.; ZHANG, H.; XU, X. Online pre purification for the continuous enzymatic interestification of bulk fats containing omega-3 oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 85, p. 95-98, 2007.

JAEGER, K.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, threedimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v.53, p. 315-351, 1999.

JIN, G.; BIERMA, T. J.; HAMAKER, C. G.; RHYKERD, R.; LOFTUS, L.A. Producing biodiesel using whole-cell biocatalysts in separate hydrolysis and methanolysis reactions. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 43, p. 589-595, 2008.

KARMAKAR, A.; KARMAKAR, S.; MUKHERJEE, S. Properties of various plants and animal feedstocks for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7201-7210, 2010.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformation with Lipases. In: A Multi Volume Comprehensive Treatise in Biotechnology, (ed.) Rehm, H.J., Pihler G., Stadler, A., Kelly, P. J.W. New York: Wiley VCH Verlag, 1998. v. 8, p. 37-192.

KLIMAS, C. A.; KAINER, K. A.; WADT, L. H. O. Population structure of *Carapa guianensis* in two forest types in the southwestern Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, v. 250, p. 256- 265, 2007.

KNOTHE, G. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 79, p. 847-854, 2002.

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

KUMAR, M.; SHARMA, M. P. Assessment of potential of oils for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 814-823, 2015.

LI, W.; DU, W.; LI, Q.; LI, R.-W.; LIU, D. Dependence on the properties of organic solvent: study on acyl migration kinetics of partial glycerides. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5737-5742, 2010.

LIM, L.; TEONG, K. Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: an overview Steven. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 938-954, 2010.

LIMA, V. M. G. **Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* CCOCP2637 e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos**, 2004. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, 2004.

LIU, Y.; Zhang, R.; Liana, Z.; Wang, S.; Wright, A. T. Yeast cell surface display for lipase whole cell catalyst and its applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 106, p. 17-25, 2014.

LOPES, D. C.; NETO STEIDLE, A. J. Potential crops for biodiesel production in Brazil: a review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 7, p. 206-217, 2011.

LOTTI, M.; PLEISS, J.; VALERO, F.; FERRER, P. Effects of methanol on lipases: molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. **Biotechnology Journal**, v. 10, p. 22-30, 2015.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F.; ALENCAR, J. C. **Essências madeireiras da Amazônia**. Manaus: INPA/SUFRAMA, 1979, v. 2, p.245.

MARTINS, C. R.; JESUS JÚNIOR, L. A. **Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio Internacional**: Panorama 2014. 51 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517- 1329; 184). Disponível em <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/> Acesso em: 12 de agosto de 2015.

MELO, M. A. M. F.; MELO, M. A. R.; PONTES, A. S. G. C.; FARIAS, A. F. F.; DANTAS, M. B.; CALIXTO, C. D.; SOUZA, A. G.; CARVALHO FILHO, J. R. Non-conventional oils for biodiesel production: a study of thermal and oxidative stability. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 117, p. 845-849, 2014.

MOUNGUENGUI, R. W. M.; BRUNSCHWIG, C.; BARÉA, B.; VILLENEUVE, P.; BLIN, J. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 39, p. 441-456, 2013.

NARWAL, S. K.; GUPTA. R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 479-490, 2013.

ODA, M.; KAIEDA, S.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; IZUMOTOC, E.; FUKUDA, H. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 45-51, 2005.

PAIVA, E. J. M.; DA SILVA, M. L. C. P.; BARBOZA, J. C. S.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANI, D. S. Non-edible babassu oil as a new source for energy production: a feasibility transesterification survey assisted by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 833-838, 2013.

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

PISSILÃO, C. **Aminólise enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila e síntese do acetato de geranoíla mediada por lipases**, 2006. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 511-525, 2015.

PRAKASH, R.; AULAKH, S. Transesterification of used edible and non edible oils to alkyl esters by *Aspergillus sp.* As a whole cell catalyst. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, p. 607-613, 2011.

RAVI, B.; MEHROTRA, S.; MEHROTRA, R. Advances in heterogeneous and enzymatic catalysis for the industrial production of biodiesel by transesterification: an overview. **Current Chemical Biology**, v. 7, p. 104-113, 2013.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; MURCIA, A. B.; TORRES, R.; LAFUENTE, R. F. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2013.

ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, p. 136-142, 2011.

SCARIOT, A. Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata*. **Principes**, Brasília, v.42, p.5-8, 1998.

SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Extraction of oil from *Jatropha curcas* L seed kernels by enzyme assisted three phase partitioning. **Industrial Crops and Production**, v. 20, p. 275-279, 2005.

SONG, X.; QI, X.; HAO, B.; QU, Y. Studies of substrate specificities of lipases from different sources. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p. 1095-1101, 2008.

SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus sp.* using corncob waste liquor as a substrate. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9286-9290, 2011.

SUN, T.; DU, W.; LIU, D.; DAI, L. Improved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1192-1195, 2010.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H.; Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 185–189, 2008.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TIOSSO, P. C.; CARVALHO, A. K. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Utilization of immobilized lipases as catalysts in the transesterification of non-edible vegetable oils with ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 839 - 847, 2014.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos graxos em óleos e gorduras: Identificação e quantificação**, São Paulo: Varela, 2006, p. 120.

WALCARIUS, A.; COLLINSON, M. M. Analytical chemistry with silica sol-gels: traditional routes o new materials for chemical analysis. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 2, p. 121 – 143, 2009.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 30–37, 2008.

XIAO, M.; MATHEW, S.; OBBARD, P. A newly isolated fungal strain used as whole cell biocatalyst for biodiesel production from palm oil. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 2, p. 45-51, 2010.

YOSHIDA, A.; HAMA, S.; TAMADANI, N.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improved performance of a packed-bed reactor for biodiesel production through whole-cell biocatalysis employing a high-lipase-expression system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 76–80, 2012.

YUSOFF, M. F.; XU, X.; GUO, Z. Comparison of fatty acid methyl and ethyl esters as biodiesel base stock: a review on processing and production requirements. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 525-531, 2014.

ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.44, p. 182-197, 2015.

Capítulo 4

Produção de Biodiesel de Óleo Microbiano (Single Cell Oil)

4. PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE ÓLEO MICROBIANO (*Single Cell Oil*)

O termo *single cell oil* (SCO) foi cunhado para denominar os óleos provenientes de fontes microbianas e é utilizado em paralelo à terminologia *single cell protein* (SCP) (VAMVAKAKI et al., 2010; RATLEDGE, 1982). Os microrganismos capazes de produzir e acumular mais de 20% de sua biomassa em lipídios são denominados oleaginosos (RATLEDGE, 1993). Estes microrganismos são encontrados entre bactérias, leveduras, fungos e algas (LEMAN, 1997).

O interesse na produção de SCOs não é recente, podendo ser identificado no século XX no final da década de 70, com estudos relacionados à bioquímica do metabolismo de lipídios produzidos por microrganismos oleaginosos (BOTHAM; RATLEDGE, 1978; BOTHAM; RATLEDGE, 1979; GILL et al, 1977; RATLEDGE; HALL, 1977).

Ratledge (1982) pesquisou a habilidade de diferentes microrganismos (algas, leveduras, bactérias e fungos filamentosos) de produzir biomassa com elevado teor de lipídios, tendo constatado que os lipídios microbianos podem ser facilmente extraídos, apresentam elevados teores de triacilgliceróis em sua composição (~ 90%), não possuem níveis tóxicos de ácidos graxos deletérios e apresentam entre 20 a 40% de ácidos graxos saturados e 60% de poli-insaturados.

Na década 90, muitos grupos de pesquisadores investigaram o uso de SCO como substituto da manteiga de cacau (DAVIES; HOLDSWORTH, 1992; DAVIES et al, 1990; YKEMA et al, 1990). Mais tarde, Papanikolaou e seus colaboradores (2001) demonstraram a capacidade da levedura *Yarrowia lipolytica* em acumular lipídios com características adequadas para substituição da manteiga de cacau. Ainda na década de 90, muitos investigadores focaram no estudo do potencial de produção de ácidos graxos poli-insaturados, tais como o *n*-6 e *n*-3, por bactérias, fungos ou algas, ampliando o escopo dos trabalhos para obtenção de lipídios com composições em ácidos graxos diferentes daqueles presentes na manteiga de cacau. Entre estes compostos podem ser citados o ácido γ -linoleico (GLA), ácido araquidônico (ARA), ácido docosaenoico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA) (RATLEDGE, 1993).

Durante as duas últimas décadas, houve um avanço considerável na compreensão do metabolismo de lipídios, principalmente com relação aos mecanismos bioquímicos de acúmulo de lipídios em células microbianas (TANG et al., 2015; HEGDE et al., 2015; LIANG; JIANG, 2015; RATLEDGE, 2004).

De um modo geral, diante da propulsão dos estudos relativos ao uso de SCO, acredita-se que futuramente as pesquisas estarão concentradas em tecnologias que permitam a substituição de refinarias à base de petróleo por biorrefinarias que utilizam matérias-primas renováveis como SCO. O sucesso da biorrefinaria de SCO depende da seleção da matéria-prima, do pré-tratamento, do microrganismo oleaginoso, da configuração do processo, do método de recuperação dos lipídios e dos coprodutos gerados (JIN et al., 2015; FERREIRA et al., 2013).

4.1. Lipídios microbianos

Muitos microrganismos são capazes de acumular lipídio durante o seu crescimento, visto que os lipídios são essenciais para o funcionamento das membranas e das estruturas celulares (LIANG; JIANG, 2015). A ocorrência de triacilgliceróis como um composto de reserva é difundido em organismos eucariotos (fungos, plantas, algas e animais) e desempenha um papel essencial no armazenamento de energia intracelular (YEN; YANG; YU et al., 2012; MENG et al., 2009).

Para ser considerado um bom produtor de lipídio, o microrganismo deve fornecer elevado conteúdo lipídico (não menos que 20 % com base na matéria seca) com composição lipídica majoritária em triacilgliceróis, além de fornecer elevada produtividade (MARTINEZ et al., 2015; LIANG; JIANG, 2015; MENG et al., 2009).

Os lipídios microbianos são produzidos por algumas estirpes oleaginosas de microalgas, cianobactérias, leveduras, fungos e bactérias (QUINTANA et al., 2011; PYLE et al., 2008;). Os avanços das pesquisas neste campo mostram que a síntese de lipídios nestes organismos é conhecida e controlada, como ilustrado pela via bioquímica (Figura 4.2) de obtenção dos lipídios.

O acúmulo de lipídios em microrganismos oleaginosos ocorre durante seu crescimento, na presença de quantidades elevadas de açúcar e condições limitadas de nitrogênio (SUBHASH; MOHAN, 2014).

O mecanismo da biossíntese do ácido graxo em microrganismos oleaginosos tem sido extensivamente estudado. No entanto, o mecanismo molecular para o acúmulo de lipídios das diferentes espécies de microrganismos oleaginosos, tais como *Yarrowia lipolytica*, *Mucor circinelloides*, *Mortierella alpina* e *Rhodospiridium toruloides*, entre outros, ainda não está completamente elucidado e nenhum mecanismo definitivo foi ainda estabelecido para explicar a variação no conteúdo de lipídios entre espécies relacionadas,

em virtude das suas diferentes características fisiológicas e bioquímicas (HUANG et al., 2013).

Figura 4.2. Via bioquímica para a produção de lipídio

Fonte: Adaptado de (CHRISTOPHE et al., 2012).

A via metabólica (Figura 4.3) para a síntese de lipídios não difere muito entre os organismos procariotos e eucariotos, sendo importantes os mecanismos de regulação e do fornecimento de precursores (acetil-CoA; malonil-CoA e gliceraldeído-3-fosfato) e NADPH (ROSSI et al., 2011).

O processo de acúmulo de lipídios pode ser dividido em duas partes: a primeira é referente à produção de acetil-CoA e a segunda envolve a conversão de acetil-CoA em lipídios. Durante a lipogênese ocorre a elongação e dessaturação dos ácidos graxos no retículo endoplasmático. As enzimas chaves para acumulação de lipídios pelos microrganismos são: isocitrato deidrogenase, ATP: citrato liase e enzima málica (LIAN; JIANG, 2015; RATLEGDE, 2014; VONGSANGNAK et al., 2013; CHRISTOPHE et al., 2012).

Muitos organismos são capazes de acumular lipídios (Tabela 4.1) quando submetidos a condições especiais de cultivo e um grande número dessas espécies apresentam métodos de obtenção e extração bem estabelecidos (HEGD et al., 2015; JIN et al., 2015; LIANG; GIANG, 2015; KUMAR; SHARMA, 2015; BALASUBRAMANIAN et al., 2012; MARTA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Tabela 4.1. Produção de lipídios por alguns microrganismos oleaginosos

Microrganismo	Teor de óleo (%)
Microalga	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Chlorella vulgaris</i>	40-60
Bactéria	
<i>Arthrobacter</i> sp.	>40
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-72
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24
<i>Gordonia</i> sp.	80
Levedura	
<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	66-76
<i>Yarrowia lipolytica</i>	43
<i>Lipomyces starkey</i>	61
<i>Cryptococcus curvatus</i>	52
Fungo	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Mortierella isabellina</i>	51-86
<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Mortierella vinacea</i>	66
<i>Cunninghamella echinulata</i>	40-57
<i>Mucor circinelloides</i>	20-60
<i>Mucor mucedo</i>	62

Fonte: MARTIZEZ et al., 2015; XU et al., 2012; GOUDA et al., 2012; VICENTE et al., 2010 MENG et al., 2009; LI; DU; LIU, 2008.

Particularmente, as microalgas têm atraído investimentos para a produção de biocombustíveis devido à elevada produtividade em óleo e crescimento mais rápido em comparação com culturas energéticas convencionais (SING et al., 2013; KANG et al.,

2011; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009). Contudo, estes microrganismos fotossintéticos apresentam problemas associados com o seu crescimento em sistemas de biorreator devido à necessidade do fornecimento de luz e grandes áreas para o cultivo (SONG et al., 2015; CHEN et al., 2015; KUMAR; SHARMA, 2014; BALASUBRAMANIAN et al., 2012; MARTA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Nos últimos anos, as pesquisas relacionadas com a produção de biodiesel a partir de óleo microbiano têm investigado, preferencialmente, a utilização de lipídios provenientes de leveduras e fungos. Em comparação com as microalgas, o crescimento destes microrganismos pode ser realizado em biorreatores microbianos convencionais, acarretando melhor rendimento de biomassa e menor custo de produção do óleo (LADESMA-AMARO, 2015; SITEPU et al., 2014; PINZI et al., 2014; LEESING; BAOJUNGHARN, 2011).

- Lipídios produzidos por microalgas

No que se referem às microalgas, os níveis de óleo mais comumente encontrados estão na faixa de 20-50% (BRENNAN; OWENDE, 2010). As microalgas usadas para produção de lipídios podem ser divididas em duas categorias (LV et al., 2010): a primeira produz alto conteúdo de lipídio, porém baixa produtividade celular, como a *Botryococcus braunii*, que pode produzir um teor de lipídio de 50%, porém, com baixa produtividade de biomassa: 28 mg/L/dia (DAYANANDA et al., 2007), e a segunda produz alto conteúdo de células, porém baixo teor de lipídios, como a microalga *Chlorella vulgaris*, que requer um tempo menor de cultivo, entretanto produz quantidade inferior a 20% de óleo (GRIFFITHS; HARRISON, 2009).

Ambas as fontes de carbono: inorgânico (CO_2 e Na_2CO_3) e orgânico (glicose, acetato, entre outras) podem ser utilizados por microalgas para induzir a produção de lipídios. Os componentes e conteúdo de lipídios nas células de microalgas podem variar de espécie para espécie. As classes de lipídios encontradas são: lipídios neutros (triacylgliceróis) e lipídios polares (fosfolipídios). Os triacylgliceróis são os principais para serem utilizados na produção de biodiesel. A rota de síntese de triacylgliceróis em microalgas ocorre de acordo com as seguintes etapas: formação de acetil coenzima A no citoplasma; alongamento e insaturação da cadeia carbônica de ácidos graxos e biossíntese de triacylgliceróis (HUANG et al., 2010).

- Lipídios produzidos por bactérias

Algumas espécies de bactérias, como *Mycobacterium*, *Streptomyces* e *Rhodococcus* podem acumular elevados teores de triacilgliceróis (TAG) como material reserva. A composição e estrutura dos TAG variam de acordo com a espécie e a fonte de carbono. O lipídio produzido por bactérias possui fosfolipídios (30-60%) e galactolipídios diferente dos microrganismos eucarióticos, nos quais o principal componente lipídico são os triacilgliceróis (PINZI et al., 2014; PARSONS; ROCK, 2012).

As bactérias pertencentes ao grupo Actinomiceto são capazes de acumular teores de TAG superiores a 70% em relação a massa seca de biomassa, usando uma fonte de carbono simples (glicose) em condições de crescimento limitado. Além disso, muitas expressões de genes de síntese de ácidos graxos já são conhecidas em bactérias, o que se torna vantajoso perante outros microrganismos (PINZI et al., 2014; PARSONS; ROCK, 2012), tornando relativamente mais fácil o uso da tecnologia de engenharia genética para modificar bactérias e melhorar seu desempenho para acumular lipídios (LIU; VORA; KHOSLA, 2010; LI et al., 2008).

Somente algumas bactérias podem produzir óleos que podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel (LI; DU; LIU, 2008). Gouda; Omar; Aouad (2008) verificaram que em condições especiais de cultivo a bactéria *Gordonia* sp é capaz de acumular cerca de 80% de lipídios com base na matéria seca.

- Lipídios produzidos por leveduras

Leveduras também apresentam a capacidade de acumular triacilgliceróis ricos em PUFA_s incluindo ácidos oleico e linoleico (PINZI et al., 2014; KANG et al., 2011). Existem cerca de 600 espécies diferentes de levedura, mas apenas 25 são capazes de acumular mais do que 20% de lipídio. Entre as espécies de leveduras, as que apresentam potencial para a produção de lipídios são as representantes dos gêneros *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* (YEN; YANG; YU et al., 2012).

Sob certas condições de cultivo, as leveduras são capazes de acumular de 50-76% de lipídios com base na matéria seca. Os principais ácidos graxos encontrados nos lipídios produzidos por leveduras são na maioria os ácidos: palmítico (C16), oleico (C18:1) e linoleico C (18:2) e é a partir desses ácidos graxos que os triacilgliceróis são formados. O teor de lipídios de *Lipomyces starkeyi* se assemelha, em conteúdo, ao óleo de palma e *Lipomyces lipofer* apresenta composição similar à manteiga de cacau (YEN; YANG; YU et

al., 2012; FEOFILOVA; SERGEEVA; IVASSHECHKIN, 2010; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

De acordo com Wu e colaboradores (2010) a levedura *Rhodospiridium toruloides* Y4 apresentou valores de rendimento de lipídeos de 0,20 g/g glicose (valores experimentais variaram de 0,15 a 0,23 g/g substrato). Além disso, o cultivo nas condições testadas por esses autores, aumentou o conteúdo de lipídeos neutros e diminuiu o conteúdo de lipídeos polares, o que é interessante, pois lipídeos polares são indesejáveis no óleo para fins comestíveis ou para produção de biodiesel (WU et al., 2010).

- Lipídios produzidos por fungos

A utilização de fungos filamentosos como produtores de lipídios foi proposta no início do século passado. No período da Primeira Guerra Mundial, as companhias alemãs Zellstoff-Fabrik World Mannheim Waldhof e Henkel und Co realizaram vários experimentos, visando obter lipídio a partir da biomassa de fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*. Nos anos 80 na extinta União Soviética, leveduras e fungos filamentosos começaram a ser usados como produtores de lipídios em processos biotecnológicos, como por exemplo, a produção de lipídio neutro- β -caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora* (FEOFILOVA; SERGEEVA; IVASSHECHKIN, 2010).

Das 60.000 espécies de fungos existentes, menos de 50 são capazes de acumular mais do que 25% de lipídios. O conteúdo de lipídios em células fúngicas pode atingir até 80% com base na matéria seca e a composição de ácidos graxos irá depender da taxonomia, estágio de desenvolvimento e das condições de crescimento e cultivo dos fungos produtores. Do ponto de vista biotecnológico os fungos são potenciais produtores de lipídios, que estão presentes nas células fúngicas principalmente na forma de monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis, esteróides e ácidos graxos livres, similarmente as células dos vegetais oleaginosos (PINZI et al., 2014; MENG et al., 2009; RATLEDEG, 1982).

Nos últimos anos, têm sido estudadas diferentes espécies de fungos capazes de acumular lipídios, incluindo *Aspergillus oryzae*, *Mortierella isabellina*, *Humicola lanuginosa*, *Mortierella vinacea* e *Mucor circinelloides*. Materiais renováveis podem ser utilizados como substrato para crescimento de fungos com concomitante produção de lipídio. Por exemplo, *Mortierella isabellina* quando submetida à fermentação em estado semissólido utilizando sorgo como substrato forneceu uma taxa de crescimento de 0,115 g/

L / h e produção de 11% de óleo, enquanto que o *Aspergillus oryzae* A-4 atingiu um teor de lipídios da ordem de 18,15% em massa quando crescido em fermentação em estado sólido utilizando palha de trigo. Geralmente, os fungos filamentosos podem sintetizar ácidos graxos saturados e insaturados, tais como, os ácidos: palmítico C16:0, oleico C18:1 e o linoleico C18:2 (PINZI et al., 2014).

As principais vantagens do uso de fungos filamentosos como produtores de lipídios são: elevada capacidade de acúmulo de biomassa desses microrganismos; maior facilidade de cultivo quando comparado às algas e a possibilidade de cultivo em grande escala; possibilidade de variar a composição do lipídio a partir de mudanças no meio de cultivo e outros fatores como a temperatura, presença de indutores do crescimento e proporção de carbono e nitrogênio no meio. Além disso, esses microrganismos possuem maior velocidade de crescimento resultando em grande acúmulo de biomassa (FERREIRA et al., 2013; PAPANIKOLAOU et al., 2011; FEOFILOVA; SERGEEVA; IVASSHECHKIN, 2010).

De acordo com a literatura os fungos pertencentes à classe dos Zigomicetos e da ordem *Mucorales* em particular, possuem elevada capacidade de acumular lipídios e entre 80 a 90% desses lipídios são triacilgliceróis (PINZI et al., 2014; VONGSANGNAK et al., 2013; FERREIRA et al., 2012; BELLOU et al., 2012; VANVAKAKI et al., 2010; CERTIK; SHIMIZU, 1999; BOTHA et al., 1997).

4.1.1. Gênero *Mucor*

Os Zigomicetos vêm demonstrando capacidade de produzir macromoléculas, tais como lipídios. Esses microrganismos podem produzir ácidos graxos, dentre eles, palmítico, oleico e linolênico em maior proporção. A síntese de ácidos graxos por fungos é influenciada pelas condições de cultivo como fontes de carbono e nitrogênio, temperatura e pH. Estes fatores quando controlados podem acarretar maior acréscimo de lipídios na biomassa fúngica (MOUSTOGIANNI et al., 2015; FERREIRA et al., 2012; VAMVAKAKI et al., 2010).

O gênero *Mucor* tem grande importância biotecnológica, visto que possui capacidade de acumular elevados níveis de carotenoides e lipídios em seu micélio. Entre os organismos pertencentes ao gênero *Mucor*, a espécie de *Mucor circinelloides* tem sido considerada um modelo de organismo oleaginoso de interesse industrial, devido à sua capacidade para produzir elevado teor de lipídios na forma de triacilgliceróis (TANG et al.,

2015; VONGSANGNAK et al., 2013; BELLOU et al., 2012; VICENTE et al., 2010; XIA et al., 2011; PAPP et al., 2010).

Esta espécie apresenta muitas características relevantes que favorecem a sua utilização para a produção de biodiesel, incluindo um alto conteúdo de lipídios no micélio (cerca de 25% de massa seca em estirpes do tipo selvagem), boa produção de biomassa durante o cultivo submersos descontínuos em biorreatores utilizando uma ampla gama de fontes de carbono (TANG et al., 2015). Mais significativamente, a regulação do acúmulo de lipídios neste fungo tem sido extensivamente estudada, e os principais genes que podem ser manipulados foram identificados utilizando um grande número de ferramentas moleculares já disponíveis, incluindo a técnica de “silenciamento do gene” (RNAi). Com base no seu uso potencial para a produção de biocombustíveis, o Departamento de Energia dos Estados Unidos (DOE) selecionou este fungo para sequenciar seu genoma por meio do programa de bioenergia no Joint Genome Institute (FERREIRA et al., 2013; VICENTE et al., 2009).

O *Mucor circinelloides* foi o primeiro microrganismo a ser usado comercialmente para produzir um óleo rico em ácido Gama Linoleico GLA (TANG et al., 2015). O processo em escala comercial para produção de SCO a partir do cultivo de *Mucor circinelloides* (anteriormente classificado como *Mucor javanicus*) foi implementado em 1985, pela empresa JE Sturge no Reino Unido (ARJUNA, 2014; RATLEDGE, 1992). Esta espécie de fungo filamentoso é promissora para a produção de lipídios, visto que apresenta elevada produtividade de biomassa e também devido a elevada produção de acetil-CoA e de NADPH durante o seu crescimento, que são os elementos essenciais para a biossíntese lipídios, o que torna essa espécie uma fonte alternativa de oleaginosas para a produção de biodiesel (LIAN; JIANG, 2015; LIAN; JIANG, 2015; RATLEGDE, 2014; VONGSANGNAK et al., 2013; CHRISTOPHE et al., 2012).

Tang e colaboradores (2015) efetuaram um estudo comparativo do mecanismo de acúmulo de lipídios entre duas linhagens de *M. circinelloides* e constataram que a linhagem de *M. circinelloides* WJ11 forneceu 36% de lipídios (m/m). Esse valor foi mais elevado que o obtido pela linhagem de *M. circinelloides* CBS 277.49 (15% de lipídios, m/m). A interpretação dos resultados foi baseada na investigação das principais vias bioquímicas envolvidas no metabolismo lipídico sendo verificado que as vias metabólicas da linhagem de *M. circinelloides* WJ11 produziram mais acetil-CoA, e mais NADPH. Esse

fenômeno tornou o processo de produção de ácidos graxos, altamente atrativo para sintetizar lipídios.

A Tabela 4.2 mostra uma ampla gama de estudos descritos na literatura referentes à produção de lipídios por *Mucor circinelloides*.

Tabela 4.2. Produção de lipídio a partir do cultivo de *Mucor circinelloides*

Linhagem <i>Mucor circinelloides</i>	Observação	% Lipídio	Referência
<i>M. circinelloides</i> W11	Estudo comparativo entre os mecanismos de acúmulo de lipídios a partir das vias metabólicas de duas linhagens de <i>M. circinelloides</i>	36	TANG et al., 2015
<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49		15	
<i>M. circinelloides</i> ATCC-1216B	Neste estudo o fungo <i>M. circinelloides</i> foi cultivado sob a forma de pellets para a produção de lipídios, o que facilitou a recuperação das células do meio permitindo uma melhoria no tempo de extração de óleo.	13-29	REIS; ZHANG; HU, 2014 XIA et al., 2011
<i>M. circinelloides</i> CCF-2617	Foram estudadas quatro espécies de <i>Mucor</i> visando selecionar a estirpe com maior potencial para o acúmulo de GLA-C18:3 e β -caroteno quando cultivadas em meio contendo amido como substrato. Os resultados mostraram que o <i>M. circinelloides</i> foi a estirpe que apresentou melhor potencial para a produção GLA-C18:3 e β -caroteno.	****	CERTÍK; ADAMECHOVÁ, GUOTHOVÁ, 2013
<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49	A fisiologia do <i>M. circinelloides</i> foi investigada utilizando ferramentas de biologia molecular e bioinformática. Foram verificadas as vias metabólicas de síntese de ácidos graxos e acúmulo de lipídios.	****	VONGANHNAK et al., 2013
<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49	Este estudo destacou o potencial do fungo <i>Mucor circinelloides</i> em assimilar vinhaça como fonte de carbono e nutrientes para a produção de lipídios e biomassa fúngica rica em proteína.	52	MITRA et al., 2012
**** dados não reportados			(continua)

Tabela 4.2. (Continuação) Produção de lipídio a partir do cultivo de *Mucor circinelloides*

Linhagem <i>Mucor circinelloides</i>	Observação	% Lipídio	Referência
<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49	A estirpe de <i>M. circinelloides</i> geneticamente modificada foi estudada, visando elucidar os mecanismos de biossíntese e de acúmulo de lipídios dessa espécie.	5-28	RODRÍGUEZ-FRÓMETA et al., 2012
<i>M. circinelloides</i> MU241	Este trabalho teve como objetivo caracterizar os lipídios acumulados nos micélios <i>M. circinelloides</i> cultivados em culturas submersas visando sua posterior aplicação na metanólise direta da biomassa rica em lipídios para a produção de biodiesel por meio de catálise ácida, sem a prévia extração desses lipídios.	22,9	VICENTE et al., 2010
<i>M. circinelloides</i> MU241	Neste estudo foi investigada a produção de biodiesel a partir do lipídio de <i>M. circinelloides</i> , sendo constatado que a mistura de ésteres obtidos atendeu aos parâmetros de qualidade americanos e europeus para uso como combustível.	15-20	VICENTE et al., 2009
<i>M. circinelloides</i>	Diferentes fontes de carbono foram testadas para o cultivo de <i>M. circinelloides</i> , a fim de avaliar a capacidade do fungo em assimilar fontes de carbono presentes resíduos agroindustriais	30-42	TAUK-TORNISIELO et al., 2009
<i>M. circinelloides</i> INMI	Determinação das atividades das enzimas-chave do ciclo do ácido tricarboxílico e glioxálico (NAD-isocitrato desidrogenase dependente e isocitrato liase, respectivamente) na produção de lipídios por <i>M. circinelloides</i> .	****	MYSYAKINO; FUNTIKOVA, 2008

**** dados não reportados

(continua)

Tabela 4.2. (Continuação) Produção de lipídio a partir do cultivo de *Mucor circinelloides*

Linhagem <i>Mucor circinelloides</i>	Observação	% Lipídio	Referência
<i>M. circinelloides</i>	Foram testados diferentes meios de cultura visando determinar as atividades lipolíticas das lipases ligadas ao micélio e extracelular, correlação entre a biossíntese de lipases intracelulares e o acúmulo de lipídios, estimativa do conteúdo de lipídios e lipase ligada à membrana, bem como caracterização da composição lipídica.	70-80	ANTCZACK et al., 2006
<i>M. circinelloides</i> CBS108.16	O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da enzima málica no processo de acúmulo de lipídio pelo <i>M. circinelloides</i> .	25-38	SONG et al., 2001
<i>M. circinelloides</i> CBS108.16	Os autores estudaram os mecanismos bioquímicos responsáveis pela iniciação da acumulação de lipídios em <i>M. circinelloides</i>	****	WYNN et al., 2001
<i>M. circinelloides</i> (Dundee University, UK)	O objetivo do trabalho foi realizar um estudo a respeito da biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados em C18 por <i>M. circinelloides</i> .	****	JACKSON et al., 1998 a
<i>M. circinelloides</i> (Dundee University, UK)	Neste artigo foi realizado um estudo das enzimas envolvidas no processo bioquímico de obtenção dos triacilgliceróis produzidos por <i>M. circinelloides</i> .	****	JACKSON et al., 1998 b
<i>M. circinelloides</i> CBS108.16	O objetivo deste estudo foi determinar a influência de 40 diferentes fontes de carbono no crescimento e na composição em ácidos graxos do lipídio produzido por <i>M. circinelloides</i> .	****	BOTHA et al., 1997

**** dados não reportados

(continua)

Tabela 4.2. (conclusão) Produção de lipídio a partir do cultivo de *Mucor circinelloides*

Linhagem <i>Mucor circinelloides</i>	Observação	%Lipídio	Referência
<i>M. circinelloides</i> CCF127	Este estudo verificou a capacidade dos fungos filamentosos produzirem lipídios quando crescidos em meio contendo óleo de girassol como fonte de carbono.	42,7	CERTIK; BALTESZOVA; SAJBIDOR, 1997
<i>M. circinelloides</i> CBS108.16 e CBS203.28	O objetivo do estudo foi avaliar cepas do gênero <i>Mucor</i> em termos de crescimento e produção de ácidos graxos gama-linolênico (GLA-C18:3).	28	PREEZ; IMMELMAN; KILIAN, 1996;
<i>M. circinelloides</i> CBS172.27	Os autores desenvolveram um modelo matemático que representa a produção de lipídio por <i>M. circinelloides</i>	****	AGELLIS et al., 1995
<i>M. circinelloides</i> CBS203.28	Os autores avaliaram a capacidade de produção de GLA-C18:3 pelas estirpes do gênero <i>Mucor</i> cultivadas em meio contendo ácido acético como fonte de carbono.	24-31	PREEZ et al., 1995
<i>M. circinelloides</i> CBS108.16 <i>M. circinelloides</i> CBS119.08 <i>M. circinelloides</i> CBS203.28 <i>M. circinelloides</i> UOFS100	A produção de lipídio e o teor de ácidos gama-linolênico (GLA-C18:3) e lipídios neutros foram estudadas em 28 estirpes do gênero <i>Mucor</i> cultivadas em meio contendo glicose como fonte de carbono.	14 15 17 47,7	ROUX et al., 1994
<i>M. circinelloides</i> CBS108.16	O processo de dessaturação dos ácidos graxos produzidos por <i>Mucor circinelloides</i> foi estudado visando esclarecer a formação de PUFA.	40	KENDRICK; RATLEDGE, 1992

**** dados não reportados

4.1.2. Métodos de extração de lipídio microbiano

A tecnologia das fermentações possibilita um elevado rendimento de produção de biomassa de microrganismos oleaginosos e os lipídios extraídos dessa biomassa poderão ser comercializados em futuro próximo, surgindo então a necessidade de estabelecer métodos eficazes de extração. Os óleos microbianos podem ser extraídos em escala laboratorial por meio de procedimentos similares aos utilizados para a extração de lipídios de fontes vegetais e animais (ZHANG et al., 2014; RUAN et al., 2012; CERTIK et al., 1996). Entretanto, para aumentar a competitividade dos processos de produção de lipídios, se faz necessário o uso de técnicas extrativas mais eficientes e ambientalmente seguras que contribuam para a redução dos custos globais de produção (CHEMAT et al., 2012).

Além da extração por solvente que é o método mais comumente utilizado, outros métodos investigados incluem: a extração combinada prensagem e solvente, que apresenta elevada temperatura e pressão de extração, extração em meio supercrítico, extração assistida por ultrassom ou micro-ondas e extração utilizando líquido iônico como cosolvente (ZHANG et al., 2014; RUAN et al., 2012; CERTIK et al., 1996).

A secagem da biomassa antecede a extração dos lipídios e é considerada importante para a maioria dos métodos de extração. Existem vários métodos de secagem de biomassa descritos na literatura, dentre os quais a secagem ao sol é o método de menor custo, porém, mais lento para a desidratação da biomassa microbiana. Os métodos de secagem mais eficientes apresentam elevado custo e envolvem diferentes tecnologias, tais como, secagem a tambor, secagem a jato, liofilização e desidratação. Existem também diferentes métodos para extrair lipídios a partir de biomassa microbiana hidratada, tais como extração assistida por ultrassom, micro-ondas, choque osmótico e extração com dióxido de carbono supercrítico (MUBARAK et al., 2015; QV et al., 2014; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; GONG; JIANG, 2011). Os principais processos de extração de lipídios são:

Extração com solvente- Há duas etapas principais para a extração de lipídios microbianos, em primeiro lugar, a extração exaustiva e solubilização dos lipídios em solventes orgânicos e, segundo, a remoção de contaminantes não lipídicos. Além disso, a recuperação dos solventes usados também influencia o ritmo do progresso do processo de extração de lipídios. Os tipos de solventes têm desempenhado um papel fundamental na eficiência de recuperação de lipídios e também na sua recuperação.

Os lipídios microbianos estão associados a outros constituintes celulares, como as membranas celulares e lipoproteínas. Portanto, na escolha do solvente é necessário analisar algumas propriedades, tais como polaridade e o comprimento da cadeia das moléculas. Escolhido o solvente adequado um procedimento de extração que tenha melhores rendimentos deve ser escolhido.

O procedimento de extração mais utilizado é o método de Folch e colaboradores (1957), no qual pode ser utilizado um solvente único ou uma mistura para melhor extração de lipídios de células microbianas, como por exemplo, metanol e clorofórmio.

Extração assistida por ultrassom – A extração utilizando solventes assistida por ultrassom é bastante eficiente. Nessa técnica diferentes campos de onda são usados para auxiliar o processo de extração de lipídios de células microbianas. O mecanismo das ondas ultrassônicas em solvente de extração inclui cavitação ou a formação de bolhas microscópicas. O processo é uma reação rápida, uma vez que a cavitação pode criar uma grande energia causando rápida transferência de massa e penetração do solvente para dentro da célula, promovendo a absorção do conteúdo das células no solvente, ao mesmo tempo. Essa técnica tem demonstrado melhorias nos processos de extração de lipídios de células microbianas (WANG et al. 2012).

Extração assistida por micro-ondas- O uso de micro-ondas para extração de lipídios apresenta como vantagens a utilização de um procedimento de execução rápida, segura, de baixo custo e elimina a necessidade de secagem prévia das amostras. A viabilidade de irradiação de micro-ondas para extração de lipídios foi relatada pela primeira vez em meados da década de 80. O método do forno de micro-ondas foi identificado como o mais simples e eficaz para a extração de lipídios a partir de microrganismos em comparação aos métodos que utilizam ondas sonoras, aquecimento convencional e soluções químicas básicas, uma vez que a técnica de extração por micro-ondas já está consolidada para extração de compostos orgânicos em alimentos (GANZLER et al., 1989). Entretanto, são poucos ainda os exemplos reportados na literatura que descrevem estudos relativos à extração de lipídios microbianos por radiação de micro-ondas. No entanto, a disseminação dessa técnica para extrair lipídios pode ser considerada promissora e poderá ser tornar muito aceitável em futuro próximo devido sua crescente utilização para o isolamento de compostos orgânicos e vantagens significativas (WANG et al., 2012).

A extração com etanol assistida por micro-ondas vem sendo utilizada para a obtenção de óleos essenciais de vegetais, sendo possível sua utilização para a extração de lipídios microbianos. Este processo se fundamenta na absorção de energia eletromagnética por solventes e tecidos, e sua transformação em calor, sendo uma das principais vantagens à alta recuperação de lipídios, menor tempo de extração e menor volume de solvente (MERCER, ARMENTA, 2011; RATLEDGE, 2004).

4.1.3. Produção de biodiesel a partir de lipídio microbiano

Atualmente, as pesquisas de produção de biodiesel têm sido direcionadas para a seleção de matérias-primas lipídicas renováveis que não concorram com a cadeia de abastecimento alimentar (BAUTISTA et al., 2016; HARISH et al., 2015; CHEN et al., 2015; PINZI et al., 2014).

O alto custo de matérias-primas para a produção de biodiesel é o maior obstáculo na comercialização do produto. Mais de 95% dos lipídios envolvidos na atual produção de biodiesel são advindos de óleos comerciais comestíveis, pois proporcionam a formação de um biocombustível de propriedades mais adequadas à substituição do diesel, além de que tais óleos têm produção difundida e bem conhecida em muitas regiões do mundo. Entretanto, a utilização de óleos comestíveis apresenta desvantagens, como o aumento da relação entre procura e oferta desta matéria-prima e os elevados custos para aplicação na produção do biocombustível, o que destaca a importância de óleos não comestíveis e de comercialização pouco estabelecida neste cenário (BORUGADDA; GOUD, 2012).

Na produção do biodiesel estima-se que a matéria-prima lipídica seja responsável por 70 a 80% do custo total de processo. No entanto, mesmo quando a disponibilidade de óleos vegetais seja alta o suficiente, a cultura de plantas oleaginosas para a produção de biodiesel pode acarretar conflitos sobre o melhor uso das terras aráveis (GHAZALI et al., 2015).

Desta forma, nos últimos anos, tornou-se evidente que a produção de biocombustíveis deve depender de culturas não alimentares, que não competem com a produção de alimentos, dentre os quais se destacam os óleos microbianos (BAUTISTA et al., 2016; HARISH et al., 2015; CHEN et al., 2015; PINZI et al., 2014; KOUTINAS et al., 2014). Por conseguinte, a produção de lipídio a partir de microrganismos oleaginosos é considerada como um substituto para plantas oleaginosas convencionais na produção de biodiesel (Tabela 4.3) (HEGDE et al., 2015; LADESMA-AMARO, 2015).

Tabela 4.3. Fontes de óleos microbianos exploradas na produção de biodiesel

Microalgas	Leveduras	Bacterias	Fungos
<i>Botryococcus braunii</i>	<i>Candida curvata</i>	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Neochloris oleoabundans</i>	<i>Lipomyces staekeyi</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Mucor circinelloides</i>
<i>Micractinium pusillum</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Bacillus alcallophilus</i>	<i>Mortirella isabellina</i>
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Lipomyces</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Cunninghamella echinulata</i>
<i>Chlorella</i> sp.	<i>Yarrowia lipolitica</i>	<i>Rhodococcus opacus</i>	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Rhodospirillum toruloides</i>	<i>Micobacterium</i> sp.	
	<i>Trichosporon</i>		

Fonte: Adaptado de (SINGH;SINGH, 2009).

Comparado com óleos vegetais, a produção de óleo microbiano não é afetada pela localização, estação ou clima, alcançando rendimentos e produtividades elevados devido à alta velocidade de crescimento e acúmulo de lipídios, facilidade de automatização e aumento de escala do processo produtivo (SANI et al., 2013). Adicionalmente, baseados no conceito de biorrefinarias, os produtos de elevado valor agregado como biopolímeros, proteínas, pigmentos, carboidratos e ração animal, podem ser coproduzidos com o óleo microbiano, contribuindo desta forma para a redução do custo global da produção de biodiesel (JIN et al., 2015).

O biodiesel produzido a partir de óleos microbianos é uma mistura de ésteres de ácidos graxos, e por isso as suas principais propriedades são determinadas pelo teor de ácidos graxos que variam de acordo com o organismo produtor. O perfil de ácidos graxos compreende desde ácidos graxos saturados como láurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16) e esteárico (C18) a ácidos graxos insaturados como oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolênico (C18:3) e docosaenoico (C22:6) (LADESMA-AMARO, 2015; SITEPU et al., 2014).

A Figura 4.4 mostra as etapas do processo de produção de biodiesel a partir de lipídios de microrganismos oleaginosos, iniciando pela seleção adequada da espécie do

microrganismo, estabelecimento das etapas de cultivo dos microrganismos oleaginosos, procedimentos de colheita das células, secagem das células e extração dos lipídios, concluindo com determinação das condições de obtenção do biodiesel por catálise homogênea ou heterogênea (WANG et al., 2012).

Figura 4.4. Etapas básicas envolvidas no processo de obtenção de biodiesel a partir de microrganismos oleaginosos

Fonte: própria

Devido ao elevado grau de acidez dos óleos microbianos (DA ROS et al., 2014; VICENTE et al., 2009), o processo de obtenção de biodiesel, normalmente adotado faz uso de catalisadores que não sofrem influência dos ácidos graxos livres presentes nos óleos microbianos, processando simultaneamente as reações de esterificação e transesterificação, conforme ilustrado na Figura 4.5. (CARRERO et al., 2015; CARRERO et al., 2011; LAM; LEE; MOHAMED, 2010; VICENTE et al., 2010).

Os problemas típicos associados ao uso dos catalisadores homogêneos de caráter ácido (BF_3 , HCl , H_2SO_4) incluem: corrosão dos equipamentos, dificuldade na recuperação do produto e geração de resíduo da etapa de neutralização (vide tabela 2.1, capítulo 2). Desta forma, a utilização de catalisadores heterogêneos químicos (ácidos) ou bioquímicos (lipase) oferece vantagens que propiciam um aumento considerável nas perspectivas de sustentabilidade ambiental de todo o processo de produção (CORDEIRO et al., 2011). Além disso, lipases e catalisadores ácidos podem promover simultaneamente esterificação de ácidos graxos e transesterificação de triacilgliceróis, de modo que estes catalisadores são recomendados quando o teor de ácidos graxos no óleo é elevado (> 3% em massa), tal como no óleo microbiano (CARRERO et al., 2015; HASSAN et al., 2015; LI; XU; WU, 2007).

Figura 4.5. Esquemas das reações simultâneas de esterificação e transesterificação de material lipídico contendo elevado grau de acidez mediadas por catalisadores heterogêneos: a) transesterificação direta da biomassa (catalisador químico de caráter ácido); b) transesterificação do lipídio (catalisador bioquímico-lipase imobilizada)

Fonte: própria

Alternativamente, a produção de biodiesel pode ser processada diretamente a partir da biomassa dos microrganismos oleaginosos sem a prévia extração do lipídio (CHEN et al., 2015; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2013; SHI et al., 2011; VICENTE et al., 2009). Neste contexto, propõe-se no presente trabalho a produção de biodiesel a partir dos lipídios produzidos pela linhagem de *Mucor circinelloides* URM 4182 (óleo e micélio), utilizando catalisadores heterogêneos químicos e bioquímicos.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Microrganismo

Todos os experimentos foram realizados empregando a linhagem do fungo filamentosso *Mucor circinelloides* f. *griseo-cyanus* URM 4182 adquirida da coleção de culturas da Micoteca URM (CCB/Universidade Federal de Pernambuco). A cepa foi repicada em meio BDA (Batata Dextrose Agar – Difco) e incubada a 30 °C por 72 h ou até atingir seu melhor estado de esporulação, não ultrapassando 10 dias de incubação. Após o crescimento foi adicionado óleo mineral estéril até cerca de 1 cm do topo da rampa, os tubos foram fechados e selados com parafilm e as culturas foram acondicionadas em posição vertical na geladeira a 4 °C para sua conservação.

4.2.2. Matérias-primas

Como matérias-primas lipídicas na síntese de biodiesel foram utilizadas biomassa microbiana e óleo extraído da biomassa de *Mucor circinelloides* URM 4182.

4.2.3. Catalisadores

As reações de síntese de biodiesel foram efetuadas empregando catalisador bioquímico: preparação comercial de lipase de *Candida antarctica* na forma imobilizada em suporte acrílico (Novozym 435) manufaturada pela Novozymes e adquirida da Sigma – Aldrich e catalisador heterogêneo químico: alumina impregnada de $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ preparado pelo método *Incipient Wetness Impregnation* de acordo com metodologia descrita por Enriquez et al., 2013.

4.2.4. Outros reagentes

Os reagentes utilizados foram: clorofórmio (Cromoline), Hexano (Cromoline), metanol anidro (Vetec), 2-Etoxietanol (Synth), Glicose (Vetec-Sigma), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), KH_2PO_4 (Vetec), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma), Tiamina (Sigma), Ácido nicotínico (Synth), Ácido glutâmico (Sigma), Extrato de levedura (Sigma), Milhocina (Ingredion Brazil Ltda.). A composição da milhocina é apresentada no Anexo 1. Iso-octano (Cromoline), etanol 99% (Cromoline), sulfato de sódio anidro (Cromoline), todos os padrões cromatográficos foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

4.2.5. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados foram: cromatógrafo de alto desempenho (HPLC, Agilent); viscosímetro (Modelo Brookfield LV-DV-II), reator de micro-ondas (Modelo Discover/University-Wave, Cem Corporation), reator de micro-ondas (Titan MPSTTM Perkin Elmer®), processador ultrassônico (Modelo UP2005 Hielscher), rota evaporador (Modelo 801, Fisatom), centrífuga (Modelo 206 BL, Excelsa II, Fanem), liofilizador (Modelo LT1000, Terroni), forno mufla (Modelo SP-1200, SPLABOR), espectrofotômetro de UV-visível (Modelo Cary 50 Conc (Varian), biorreator modelo BioFlo®/ CelliGen® 115 Fermentor/Bioreactor (Eppendorf) com capacidade de 1L, reator pressurizado (Parr Series 5000 Multiple Reactor System).

4.2.6. Procedimento experimental

4.2.6.1. Preparo da suspensão de esporos

A cepa de *Mucor circinelloides* URM 4182 conservada em geladeira foi repicada em meio BDA (Batata Dextrose Agar Difco) e incubada a 30 °C por um período de 72h ou até atingir seu melhor estado de esporulação, para sua ativação. Após o crescimento das células, as células foram lavadas com 10 mL de água destilada estéril até desprendimento dos esporos da cultura, obtendo assim, uma suspensão de esporos em condições assépticas. Em todos os experimentos foram utilizados 1×10^5 esporos/ mL.

4.2.6.2. Preparo dos meios de cultivo para produção de lipídio por *M. circinelloides* URM 4182

Foram testados diferentes meios de cultivo tomando por base as formulações descritas na literatura por Vicente et al, 2010 e Xia et al, 2011, codificados como meios A, B, C, D, E e F, conforme descrito na Tabela 4.4. A fonte de carbono utilizada, preferencialmente foi glicose em duas concentrações (20 e 40 g/L), entretanto outras fontes de carbono foram também testadas, tais como, xilose, sacarose, frutose, amido, glicerol, etanol e este meio está codificado como meio F (outras fontes). O controle do pH do meio de cultivo foi um parâmetro crucial e foi controlado por meio de adição de NaOH 1mol/L ou H₂SO₄ 1 mol/L. Os nutrientes propostos por Vicente et al, 2010 (meios A,D) foram substituídos pela adição de milhocina numa proporção de 0,5g/L nos meios C e E, tendo em vista sua rica composição em sais minerais e aminoácidos essenciais.

Tabela 4.4. Composição dos diferentes meios de culturas e condições de cultivo para produção de lipídios por *M. circinelloides* URM 4182

Composição (g/L)	Codificação dos meios					
	A	B	C	D	E	F
Fonte de carbono	Glicose	Glicose	Glicose	Glicose	Glicose	Outras
Concentração da fonte de carbono	20	20	20	40	40	20
Milhocina	Ausente	Ausente	0,5	Ausente	0,5	Ausente
(NH₄)₂SO₄	1,5			1,5		1,5
Ácido glutâmico	1,5			1,5		1,5
Ácido nicotínico	0,001			0,001		0,001
Tiamina	0,001			0,001		0,001
Extrato de levedura	0,5	1,0		0,5		0,5
NH₄Cl		1,5				
KH₂PO₄		6,0				
MgSO₄ 7 H₂O		1,2				
Condições de cultivo						
Controle de pH	NaOH	CaCO ₃	NaOH	NaOH	NaOH	NaOH
Temperatura (°C)	26	27	26	26	26	26
Agitação (rpm)	250	180	250	250	250	250
Referência	Vicente et al., 2010	Xia et al., 2011	Proposto neste trabalho	Vicente et al., 2010	Proposto neste trabalho	

Fonte: própria

4.2.6.3. Cultivos de *M. circinelloides* URM4182 em shaker orbital

Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo adequado (A, C, D, E e F), conforme codificação descrita na Tabela 4.4 foram inoculados com uma suspensão 1×10^5 esporos/mL e incubados em shaker orbital (250 rpm) a 26 °C por um período máximo de 120 h. O pH do cultivo foi medido e ajustado manualmente para 4,5, por meio da adição de NaOH 1 mol/L. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

Em períodos pré-determinados dois Erlenmeyers (Figura 4.6) eram retirados do shaker e o meio de cultura separado das células por filtração a vácuo (com auxílio de funil de Buchner acoplado em Kitazato contendo papel de filtro Whatman n° 1). Na biomassa celular foi determinada a concentração de biomassa e teor de lipídios e no meio de cultura foi quantificada a concentração residual de glicose.

Figura 4.6. Cultivo de *M. circinelloides* em shaker com agitação orbital

Fonte: própria

4.2.6.4. Cultivo do *M. circinelloides* URM 4182 em biorreator

Cultivos foram efetuados em Biorreator modelo BioFlo®/CelliGen® 115, com capacidade para 1 L, do tipo agitado por pás e equipado com sensores para controle de pH, oxigênio dissolvido (DO), temperatura e aeração (Figura 4.7).

No biorreator foram realizados cultivos utilizando os meios “A”, “C”, “D” e “E” (Tabela 4.4). Em todos os casos, o biorreator contendo um volume de 700 mL de meio foi inoculado com uma suspensão de esporos de 1×10^5 esporos/mL e o cultivo foi conduzido aerobicamente (por meio do fornecimento de oxigênio a 1,5 vvm e agitação de 250 rpm), em pH 4,5, a 26 °C por 120 h.

O pH do cultivo foi monitorado por meio de um medidor de pH (eletrodo pH sensor, Ingold, gel filled; Mettler Toledo) e controlado pela adição automática de NaOH 1 mol. L⁻¹ ou H₂SO₄ 1 mol. L⁻¹ ao cultivo por meio de bombas peristálticas. O oxigênio dissolvido foi monitorado por meio de uma sonda de oxigênio (InPro®6800 Series O₂ Sensors; Mettler Toledo).

Durante o cultivo, amostras de meio de cultura foram retiradas periodicamente para a determinação quantitativa da glicose residual. Após o período de crescimento do fungo (120 h), o meio de cultura foi separado das células por centrifugação a 1570 g por 15 min, em seguida foram determinadas as concentrações de biomassa e lipídio.

Figura 4.7. Cultivo de *Mucor circinelloides* em biorreator

Fonte: Própria

4.2.6.5. Determinação do kLa

A determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi feita pelo método estático, proposto por Wise (1951). A sonda de oxigênio foi calibrada à pressão atmosférica, definindo-se o zero e a saturação (100%), no meio de cultivo saturado com nitrogênio e ar atmosférico, respectivamente. Em cada ensaio o kLa foi determinado antes de realizar a inoculação nas condições previamente estabelecidas. Após ser removido todo o oxigênio do meio de cultivo pela introdução de nitrogênio, foram retomadas as condições de agitação e aeração estabelecidas para o ensaio, sendo monitoradas a variação da porcentagem de oxigênio dissolvido em função do tempo, utilizando os dados gerados para calcular o valor kLa por meio da forma integrada da equação proposta por Stanbury, Whitaker e Hall (1995), em que o valor de $-kLa$ é igual a inclinação resultante da representação linear de $\ln(C^* - CL)$ versus tempo.

4.2.6.6. Síntese de biodiesel

*-Produção de ésteres etílicos a partir do óleo microbiano de *M. circinelloides* por via enzimática (aquecimento convencional)*

A síntese de ésteres etílicos a partir do lipídio extraído da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182 foi realizada em reatores de vidro cilíndrico de 50 mL encamisados, acoplados a um condensador de refluxo, contendo 20 g de meio reacional na razão molar óleo microbiano/etanol anidro de 1:12; 25% de Novozym 435 em relação à massa de meio reacional e utilizando como solvente da reação iso-octano na proporção 1:1 em relação ao meio reacional (Figura 4.8). A transesterificação foi conduzida sob agitação magnética de 150 rpm a 60 °C por um período máximo de 96 h.

Figura 4.8. Aparato experimental utilizado na etanólise enzimática do óleo microbiano

Fonte: própria

*-Produção de ésteres etílicos a partir do óleo microbiano de *M. circinelloides* por via enzimática (aquecimento por irradiação de micro-ondas)*

As reações foram realizadas em reator de micro-ondas (Modelo Discover/ University-Wave, Cem Corporation) constituído de uma câmara interna cilíndrica de 75 mm de diâmetro e 100 mm de altura.

Um reator de vidro esférico (50 mL) contendo 10 g de meio reacional composto por óleo microbiano e etanol numa razão molar (1:12) e iso-octano como solvente na proporção 1:1 em relação ao meio reacional, acoplado com condensador de refluxo, foi inserido na câmara de micro-ondas do reator, sendo irradiada determinada potência de micro-ondas para manter a temperatura adequada do meio reacional praticamente constante durante todo o experimento (50 °C) (Figura 4.9). A mistura óleo e etanol foi incubada com 25% de Novozym 435 em relação à massa de meio reacional. As reações foram conduzidas por um período máximo de 14 h, sob agitação magnética.

Figura 4.9. Reator de micro-ondas operando durante a reação de biodiesel

Fonte: própria

- Síntese de biodiesel por catálise heterogênea química

A síntese de biodiesel por catálise heterogênea química foi realizada a partir da transformação direta da biomassa (5 gramas base seca) em ésteres etílicos sem a prévia extração dos lipídios.

O catalisador da reação $\text{H}_3\text{PMo}/\text{Al}_2\text{O}_3$ previamente sintetizado foi ativado em mufla a 150 °C por 2 h. Em seguida, o meio reacional contendo biomassa (40% de lipídio): etanol 99%, foi incubada com 10% de catalisador em relação à massa de material lipídico em reator pressurizado (Parr Series 5000 Multiple Reactor System) a 300 rpm a 200 °C por 4 h. A razão molar do meio reacional (óleo microbiano: etanol 99%) da ordem de 1:120, foi em relação a quantidade de óleo presente na biomassa. A montagem experimental utilizada pode ser visualizada na Figura 4.10.

Figura 4.10. Aparato experimental utilizado na etanólise química heterogênea da biomassa microbiana

Fonte: própria

4.2.6.7. Etapa de purificação dos ésteres etílicos

Ao final das reações de transesterificação, os catalisadores foram separados do meio reacional por centrifugação 1570 g por 15 min. A mistura foi transferida para um funil de decantação, efetuando-se uma agitação e deixando em repouso por 30 min para a separação das fases.

O volume do sobrenadante foi medido e, em seguida, adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação, efetuando-se uma agitação vigorosa e deixando a mistura em repouso até total separação de fases. A fase inferior composta por glicerol e água de lavagem foi descartada e a fase superior composta

pelos ésteres de etila (biodiesel) foi submetida à centrifugação (1570 g por 15 min) e em seguida a evaporação em rota-evaporador sob vácuo para a retirada de etanol e água remanescentes. Posteriormente, foram adicionadas pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro para finalizar a etapa de secagem. As amostras de biodiesel purificadas foram submetidas à análise dos parâmetros de interesse do trabalho.

4.2.7. Métodos Analíticos

4.2.7.1 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi estimada pelo método de ácido dinitrosalicílico (DNS) mediante curva de calibração que correlaciona a absorbância a 540 nm e a concentração em g/L (SUMMER, 1924; MILLER, 1959). Foram pipetados 1000 µL de cada diluição das amostras em tubos de ensaio e adicionados 1 mL do reagente DNS a cada tubo. Os tubos foram aquecidos em banho-maria durante 5 minutos e resfriados a temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas as leituras de absorbância em 540 nm em espectrofotômetro de UV-visível (Modelo Cary 50 Conc (Varian)). As absorbâncias obtidas foram utilizadas para a construção da curva padrão de glicose: $y=0,9857x - 0,0504$; $R^2=0,9997$.

4.2.7.2. Extração de lipídios da biomassa microbiana

A fim de estabelecer o método mais adequado para extração dos lipídios da biomassa celular foram testadas cinco metodologias, incluindo métodos clássicos como extração à solvente em Soxhlet, Folch et al (1957) assistido por ultrassom, Bligh & Dyer (1959) adaptado, extração com 2-Etoxietanol (SILVA et al., 2014) e extração com etanol assistida por micro-ondas.

Os testes foram feitos com a biomassa de *M. circinelloides* URM 4182 cultivada segundo metodologia descrita na seção 4.3.1.1. Após o período de crescimento, as células foram separadas do meio de cultivo por centrifugação a 1570 g por 15 min e a biomassa liofilizada ou úmida foi submetida a diferentes tratamentos para extração de lipídios. Após o período de incubação, a biomassa foi filtrada e o extrato lipídico obtido foi seco em rota-evaporador para remoção do solvente e em seguida transferido para estufa (60 °C) até obtenção de massa constante. A quantificação da massa total dos lipídios foi determinada pelo percentual de lipídios em g.100g^{-1} de biomassa. O critério de seleção do método de extração foi baseado no maior teor lipídico obtido (%).

- Método “Bligh and Dyer” modificado

Os lipídios foram extraídos das células previamente liofilizadas utilizando metodologia modificada descrita por Bligh & Dyer, 1959 (Figura 4.11). Inicialmente foi adicionado solvente à biomassa na seguinte ordem: clorofórmio, metanol, água 1: 2: 0,8 (v/v/v). As amostras foram agitadas por alguns minutos até completa homogeneização dos solventes. Na sequência, manteve-se em agitação branda por 18 h. A separação das fases foi realizada em funil de separação adicionando-se clorofórmio e água para obtenção de separação da fase apolar (lipídica) e polar.

Figura 4.11. Extração de lipídio pelo método “Bligh & Dyer” modificado

Fonte: própria

- Método Folch empregando ultrassom de sonda

Os lipídios foram extraídos das células previamente liofilizadas empregando-se a metodologia de Folch e colaboradores (1957), com algumas modificações. As extrações foram realizadas em Ultrassom (Modelo-UP200S/UP400S, Hielscher-Ultrasound Technology) com processadores ultrassônicos que emitem potência entre 200 W e 400 W. O procedimento teve início adicionando-se uma mistura de clorofórmio–metanol (2:1) em relação à massa seca das células, juntamente com um terço do volume de clorofórmio para completa homogeneização da biomassa no solvente. Na sequência, a amostra foi centrifugada por alguns minutos de modo a separar o conteúdo celular extrato contendo óleo e solvente. O sobrenadante recolhido foi misturado a uma solução de KCl 0,88% (m/v) (1/4 em relação ao volume da amostra) a fim de remover os componentes não lipídicos. A fase inferior foi transferida a um funil de separação, adicionando-se uma mistura de metanol-água (2:1). Após a separação das fases, o extrato lipídico obtido foi

seco em rota-evaporador para remoção do solvente e em seguida transferido para estufa (60 °C) até obtenção de massa constante.

Figura 4.12. Extração de lipídio pelo método Folch empregando ultrassom de sonda

Fonte: própria

- Método empregando extrator Soxhlet

Amostras de aproximadamente 11 g de biomassa liofilizada foram adicionadas ao cartucho de celulose. A extração foi feita por 8 horas, em aparelho Soxhlet com 200 mL de solvente (clorofórmio: metanol (2:1), etanol e hexano). Após a extração, o solvente foi evaporado em rota evaporador e a fração lipídica foi seca até obtenção de massa constante em estufa. Essa metodologia é baseada em D'oca et al. (2011). Os procedimentos desse método foram feitos em duplicata.

- Método empregando agitação magnética/ 2-Etoxietanol

Em um Becker de 100 mL foi colocado a biomassa com umidade de aproximadamente 20% (0,5g biomassa seca) suspensa em 25 mL de 2-Etoxietanol (Etilglicol). A extração foi conduzida em 3 ciclos a 60 °C por 30 min sob agitação magnética contínua trocando o solvente a cada ciclo. O extrato foi recolhido a cada ciclo por filtração e a biomassa foi novamente submetida à extração até completarem os três ciclos. Ao final, o extrato obtido foi levado ao rota-evaporador para esgotamento do solvente (SILVA et al., 2014).

- Método empregando micro-ondas/etanol

Os lipídios foram extraídos das células com umidade entre 70-85% e a extração foi realizada utilizando 0,05 g de biomassa fúngica (base seca) suspensa em 25 mL de etanol 96% utilizado como solvente, em um reator de micro-ondas comercial (modelo Discover/University-Wave, Cem Corporation), constituído por uma câmara cilíndrica interna com 75 mm de diâmetro e 100 mm de altura, com agitador magnético e controle de temperatura por fluxo de ar comprimido (Figura 4.13a), baseando-se na metodologia descrita por Cravotto et al. (2008). A temperatura dentro da câmara foi controlada mediante variação automática da potência de micro-ondas sendo a máxima de 200 W. Foi avaliada a concentração de lipídios (% m/m) obtida em tratamentos extrativos independentes de 10, 30 ou 60 min cada tratamento e temperatura de 50 ou 60 °C.

Neste trabalho também foram realizadas extrações conduzidas em três ciclos de 1 hora cada, a 60 °C em sistema de digestão de amostras com radiação na região das micro-ondas (Titan MPS™ PerkinElmer®) com uma plataforma giratória com capacidade para 16 frascos TFM (com volume de 75 mL e que suportam uma pressão de 40 bar), com controle de temperatura direto dentro da câmara (DTC™), controle de pressão (DPC™) e tela para programação (Figura 4.13b). Cada vaso continha biomassa (1,0 g seca) com umidade entre 70-85% e 50 mL de etanol 96%. Este último método não apresentou diferença quanto aos rendimentos de extração em relação ao método utilizando o reator de micro-ondas comercial modelo Discover/University-Wave, Cem Corporation.

Figura 4.13. Extração de lipídio pelo método empregando micro-ondas/etanol

a)

b)

Fonte: própria

4.2.8 Caracterização das propriedades da biomassa celular e do óleo microbiano

4.2.8.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da biomassa

As mudanças conformacionais, tais como deformação na biomassa microbiana após extração de lipídios com etanol sob a irradiação de micro-ondas, foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias das superfícies biomassa de *Mucor circinelloides* após processo de extração foram obtidas utilizando microscópio eletrônico de varredura LEO1450VP com EDS acoplado (Schott Zeiss do Brasil, SP, Brasil).

4.2.8.2. Índice acidez do óleo microbiano

O índice de acidez do óleo microbiano de *M. circinelloides* foi determinado de acordo com a Norma Cd 3d-63 e o resultado calculado pela relação entre a massa de hidróxido de potássio consumida (mg) por grama de amostra analisada.

4.2.8.3. Determinação do perfil em ácidos graxos do óleo microbiano

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa, segundo metodologia da AOCS (2004), empregando cromatógrafo de fase gasosa (CGC Agilent 6850 Series GC System), equipado com coluna capilar do tipo DB-23 Agilent (50% cianopropil – metilpolisiloxano, dimensões 60 m, Ø int: 0,25 mm, 0,25 µm filme), operando com rampa de aquecimento de 110 °C (5 min), 110 – 215 °C (5 °C/min) e 215 °C – 24 min e hélio como gás de arraste. Os padrões de ácidos graxos utilizados foram os ácidos capróico (C6:0); caprílico (C8:0); cáprico (C10:0); láurico (C12:0); mirístico (C14:0); miristoléico (C14:1); pentadecanóico (C15:0); palmítico (C16:0); palmitoléico (C16:1); margárico (C17:0); cis-10-heptadecenóico (C17:1); esteárico (C18:0); oleico (C18:1); linoleico (C18:2); α – linolênico (C18:3 n-3); araquídico (C20:0); eicosenóico (C20:1); beênico (C22:0); erúcico (C22:1); lignocérico (C24:0) e nervônico (C24:1).

4.2.8.4. Estudo reológico do óleo microbiano

Os valores de viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 52. As medidas foram feitas em duplicata a 50°C, empregando 1mL de amostra. Os dados obtidos (viscosidade, taxa de deformação e tensão de cisalhamento) foram ajustados de acordo com a lei de potência (Equação 4.1), conforme

descrito por Freitas et al. (1998), para verificação de possíveis desvios do comportamento Newtoniano.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (4.1)$$

Em que: τ é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação aplicada, n é o índice do comportamento de escoamento (valor do coeficiente angular) e K é o índice de consistência.

4.2.8.5. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de óleo e biodiesel foram submetidas à análise de espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . O Espectrômetro utilizado foi modelo Spectrum GX, Perkin Elmer. 4.7.

4.2.9. Análise dos produtos da transesterificação

O teor de ésteres de etila foi determinado tomando por base os dados gerados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN^1H) utilizando espectrômetro Varian, modelo Mercury-300 MHz de acordo com metodologia validada por Paiva et al. (2013). Mono- e diacilgliceróis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Agilent 1200 Series, com detector evaporativo de espalhamento de luz e coluna de aço inoxidável Fenomenex Gemini C18 110 A (150 x 4,6 mm) (Allcrom Ltda., SP, Brasil) (ver capítulo 3; seção 3.3.7.3)

4.2.10. Cálculos

4.2.10.1. Determinação dos parâmetros bioquímicos de cultivo e análise dos resultados

A eficiência da produção de lipídios microbianos foi calculada com base nos resultados de concentração de biomassa (CB), concentração de lipídio (CL) e o rendimento de lipídio (%L) obtidos nos cultivos do *M. circinelloides* 4182 efetuados nos diversos meios (A, B, C, D e E), conforme equações 4.2, 4.3 e 4.4, respectivamente.

$$CB = \frac{\text{massa seca da biomassa celular (g)}}{\text{volume do caldo de fermentação (L)}} \quad (4.2)$$

$$CL = \frac{\text{Lipídio (g)}}{\text{volume do caldo de fermentação (L)}} \quad (4.3)$$

$$\%L = \frac{\text{massa de lipídio (g)}}{\text{massa da biomassa celular}} \times 100 \quad (4.4)$$

Os resultados dos diferentes cultivos também foram analisados considerando os seguintes parâmetros: fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) (Equação 4.5), fator de conversão de substrato em lipídio ($Y_{P/S}$) (Equação 4.6), produtividade volumétrica em relação à biomassa (Q_X) (Equação 4.7), produtividade volumétrica em relação ao lipídio (Q_P) (Equação 4.8) e velocidade volumétrica de consumo de substrato (Q_S) (Equação 4.9). Os dados foram obtidos a partir do acompanhamento do cultivo das células nos períodos de 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h.

$$Y_{x/s} = \left(\frac{\Delta X}{-\Delta S} \right) = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i} \quad (4.5)$$

$$Y_{p/s} = \left(\frac{\Delta P}{-\Delta S} \right) = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad (4.6)$$

$$Q_X = \left(\frac{\Delta X}{\Delta t} \right) = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (4.7)$$

$$Q_P = \left(\frac{\Delta P}{\Delta t} \right) = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (4.8)$$

$$Q_S = \left(\frac{\Delta S}{\Delta t} \right) = \frac{S_f - S_i}{t_f - t_i} \quad (4.9)$$

Em que:

X_i e X_f = concentração inicial e final de biomassa

S_i e S_f = Concentração inicial e final de substrato (glicose).

P_i e P_f = concentração inicial e final de lipídio.

S_i e S_f = Concentração inicial e final de substrato (glicose).

P_i e P_f = concentração inicial e final de lipídio.

t_i e t_f = tempo inicial e final da fermentação.

4.2.10.2. Determinação das propriedades do biodiesel por modelos empíricos

Os índices de cetano (IC), saponificação (IS) e iodo (II) foram determinados por meio de equações empíricas (RAMOS et al., 2009; TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014), tomando por base as equações propostas por Krisnangkura (1986). O número de cetano do biodiesel foi estimado pela Equação 4.10, e os índices de saponificação e iodo foram determinados pelas Equações 4.11 e 4.12, respectivamente (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014; RAMOS et al., 2009).

$$IC = 46,3 + \frac{5458}{IS} - 0,225.II \quad (4.10)$$

$$IS = \sum \frac{(560 \cdot N)}{M} \quad (4.11)$$

$$II = \sum \frac{(254 \cdot D \cdot N)}{M} \quad (4.12)$$

Em que para cada ácido graxo: N = porcentagem mássica; M = massa molar (g/mol);

D = número de duplas ligações.

O parâmetro grau de instauração foi calculado a partir da Equação 4.13, na qual se considera a soma da quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados contidos no óleo (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014; RAMOS et al., 2009).

$$GI = (\% \text{ monoinsaturados}) + 2 \cdot (\% \text{ poliinsaturados}) \quad (4.13)$$

Em que: GI = grau de instauração (%).

O fator do comprimento da cadeia (FCC) foi calculado a partir da Equação 4.14, utilizando a composição em ácidos graxos saturados de cadeia longa que constituem o biodiesel. Este parâmetro está correlacionado com o ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF) (Equação 4.15).

$$FCC = (0,1.C_{16}) + (0,5.C_{18}) + (1.C_{20}) + (1,5.C_{22}) + (2.C_{24}) \quad (4.14)$$

$$PEFF = 3,1417 .FCC - 16,477 \quad (4.15)$$

Em que: FCC = fator do comprimento da cadeia; PEFF = ponto de entupimento de filtro a frio.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Avaliação do potencial da linhagem *M. circinelloides* URM 4182 como fonte de produção de lipídios

A espécie *Mucor circinelloides* é descrita na literatura como potencial fonte de produção de lipídios, fornecendo valores variados de teores de lipídios dependendo da linhagem utilizada. Para verificar a potencialidade da linhagem *M. circinelloides* URM 4182 em produzir biomassa rica em lipídios foi efetuado um teste preliminar de cultivo em meio líquido contendo glicose (20 g/L) como única fonte de carbono e diversos nutrientes (Meio A), conforme metodologia descrita por Vicente e colaboradores (2010).

A etapa de cultivo teve duração de 120 h e em intervalos de 24 h amostras eram retiradas para análise dos parâmetros de interesse, incluindo concentração de biomassa seca, teor de lipídio, atividade lipolítica da biomassa e do filtrado. Os lipídios foram extraídos da biomassa liofilizada utilizando o método Folch assistido por ultrassom, conforme descrito no item 4.2.7.2.

Na Figura 4.14 são apresentadas fotografias das etapas do cultivo, sendo possível observar que com o progresso do cultivo o meio incolor (tempo inicial) foi tornando-se amarelo claro (amostra 24h) atingindo coloração amarela intensa ao final do cultivo (120 h). Este comportamento pode ser associado a produção de carotenóides, visto que várias estirpes de zigomicetos são conhecidas por produzirem pigmentos durante o crescimento, como por exemplo as espécies de *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus* e algumas espécies do gênero *Mucor*, tais como *Mucor circinelloides*, possuem a capacidade de sintetizar diferentes carotenóides sendo em sua maioria o β -caroteno (CERTK et al., 2013; PAPP et al., 2010).

A Tabela 4.5 apresenta os valores obtidos em concentração de biomassa celular (g/L), teor de lipídio (%) e atividade lipolítica da biomassa (U/g) e do extrato fermentativo (U/g) para todas as etapas do cultivo.

O teor de lipídios obtido no período entre 24 a 120 h foi crescente e variou respectivamente de 8,01 a 21,68 (% m/m) em relação à biomassa seca. Os resultados sugerem que a linhagem de *M. circinelloides* URM4182 atende aos conceitos de *single cell oil*, visto que apresenta a capacidade de acumular mais de 20% de lipídios em relação à biomassa seca (HUANG et al., 2013).

Figura 4.14. Etapas do cultivo de *M. circinelloides* URM4182 em meio glicose e nutrientes (meio A)

Fonte: própria

Tabela 4.5. Constituintes da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182 cultivada em meio A em função do tempo

Cultivo (h)	Biomassa (g/L)	%Lipídios (g/g de biomassa)	Atividade lipolítica (U/g)	
			Biomassa	Caldo fermentativo
24	1,15±0,08	8,01±0,12	53,25±0,02	2,37±0,02
48	2,78±0,02	12,05±0,08	54,90±0,05	2,55±0,01
72	3,19±0,03	16,14±0,15	64,44±0,03	2,67±0,01
96	4,21±0,04	20,02±0,06	76,50±0,01	3,36±0,02
120	4,75±0,02	21,68±0,02	92,70±0,01	3,99±0,01

Fonte: própria

Constata-se ainda, que o meio de cultura contendo glicose, foi também adequado para produção de lipase ligada ao micélio, fornecendo biomassa com atividade lipolítica da ordem de 92,70 U/g e baixa atividade no caldo fermentativo sugerindo que não houve excreção da lipase para meio de cultura (valores alcançados foram inferiores a 4,0 U/g). Entretanto, esse valor de atividade foi relativamente menor ao alcançado no cultivo em meio contendo azeite de oliva como fonte de carbono em 72 h de cultivo (atividade= 186

U/g, capítulo 3, item 3.4.2.1). Deste modo, verifica-se que o meio glicose enriquecido com nutrientes (meio A) é mais adequado para o acúmulo de lipídio pela linhagem *M. circinelloides* URM4182.

4.3.2. Estabelecimento da metodologia de extração de lipídios produzidos pelo *M. circinelloides* URM 4182

Tendo confirmado a capacidade da linhagem *M. circinelloides* URM4182 em acumular elevados teores de lipídio foram avaliadas e comparadas a eficiência de cinco diferentes métodos de extração de lipídios: “Bligh & Dyer” modificado, método de Folch (empregando ultrassom de sonda), Soxhlet, extração empregando 2-etoxietanol e método de extração em reator de micro-ondas, conforme descrito no item 4.2.7.2.

Os métodos “Bligh & Dyer” modificado, Soxhlet e Folch foram efetuados com biomassa liofilizada e os resultados obtidos (Tabela 4.6) indicam uma variação ampla dos teores de lipídios (5,6 a 21,7%) sugerindo influência marcante do método de extração no teor de lipídio obtido de uma mesma biomassa.

A baixa concentração de óleo microbiano da ordem de 7,0 %, m/m, fornecido pelo método de “Bligh & Dyer” pode ser atribuída ao menor número de toques efetivos das esferas de vidro com a biomassa fúngica. Iverson e colaboradores (2001) relataram que amostras com conteúdo de lipídios superior a 2 % podem ser subestimados pelo método de Bligh & Dyer devido à baixa solubilidade de lipídios apolares (triacilgliceróis) em solvente relativamente polar (clorofórmio, metanol e água). Este fato também pode justificar o baixo rendimento de extração de lipídio obtido pelo método de Soxhlet (5,6%, m/m).

A utilização de método assistido por técnicas auxiliares de rompimento celular (Folch assistido por ultrassom) favoreceu penetração mais rápida do solvente no interior das células melhorando o processo de extração. Verifica-se na Tabela 4.6 que a cavitação promovida pelo ultrassom permitiu a extração de considerável quantidade de lipídios da ordem de 21,7 %. Este resultado sugere a importância do emprego de métodos extrativos assistidos por sistemas de aquecimento não convencionais, tais como ultrassom ou micro-ondas, para permitir o rompimento celular facilitando assim o escoamento do lipídio para o meio (MUBARAK et al., 2015; QV et al., 2014; MA et al., 2014).

Tabela 4.6. Concentração total de lipídios da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182 por diferentes métodos de extração

Método de extração	Solvente	Lipídios (g)	Biomassa (massa seca) (g)	Lipídios total (% , g/g)
Folch assistido por ultrassom	Clorofórmio/ metanol	0,22±0,01	1,05±0,03	21,7±0,06
Bligh & Dyer	Clorofórmio/ metanol	0,07±0,05	1,03±0,06	7,0±0,05
Soxhlet	Hexano	0,06±0,04	1,01±0,07	5,6±0,01
Extração com agitação	2-etoxietanol	0,17±0,01	1,08±0,01	16,0±0,02
Extração assistida por micro-ondas	Etanol	0,30±0,02	1,02±0,01	29,0±0,04

Fonte: própria

Na literatura, os métodos clássicos tais como Bligh & Dyer e Soxhlet são técnicas bastante utilizadas para a extração de lipídios (FRANCISCO et al., 2015; MUNCH et al., 2015; HUSSAIN et al., 2015; NAGAJARA et al., 2014; BOER et al., 2012). No entanto, estes métodos são demorados e demandam elevadas quantidades de solventes, além de requererem uma etapa adicional de secagem das células. Desta forma, para atenuar esses inconvenientes, foram propostas outras técnicas de extração que requerem menor tempo de processamento, menor quantidade de solvente, além de utilizarem biomassa úmida eliminando, desta forma, a etapa de secagem da biomassa.

A extração de lipídio a partir da biomassa úmida foi realizada empregando dois tipos de solventes: 2-etoxietanol e etanol. No primeiro caso, 2-etoxietanol foi utilizado sob aquecimento e agitação constantes, resultando em um aumento considerável do teor de lipídios (16%) em relação aos métodos clássicos, entretanto apresentou valor inferior ao teor obtido pelo método Folch. Outra limitação desse método foi referente ao custo do solvente, bem como sua difícil recuperação exigindo sistemas dotados de pressão à vácuo.

Na sequência foi testada a técnica de extração de lipídio a partir de biomassa úmida empregando o método assistido por micro-ondas, utilizando etanol como solvente. Este método foi facilmente executado e o solvente (etanol 96%) utilizado é de baixo custo, fácil de remover e permite a sua reutilização. O uso de etanol e irradiação das micro-ondas mostrou-se promissor para aplicação em processos de extração de lipídios microbianos,

sendo contatado pela análise comparativa dos resultados (Tabela 4.6) o valor mais elevado de concentração de lipídios (29%).

Deste modo, o método de extração por etanol assistida por micro-ondas foi então estudado e melhorado para ser posteriormente aplicado na extração dos lipídios da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182. Para tanto, foi avaliada a concentração de lipídios (% m/m) obtida em tratamentos extrativos independentes de 10, 30 ou 60 min sob temperaturas de 50 ou 60 °C.

Na Figura 4.15, apresentam-se as concentrações de lipídios obtidas por extração com etanol assistida por micro-ondas, nas condições testadas. Nota-se que a máxima concentração de lipídios (41% m/m; 0,84g) foi alcançada na temperatura de 60 °C para tratamentos extrativos de três etapas de 30 ou 60 min.

Figura 4.15. Extração de lipídios com etanol assistida por micro-ondas, sob diferentes condições de tempo e temperatura

Fonte: própria

A eficiência do método de extração com etanol foi também constatada pelas mudanças conformacionais na biomassa microbiana por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 4.16 mostra as microfotografias das hifas de *Mucor circinelloides* URM 4182 obtidas antes (Figura 4.16 a) e após (Figura 4.16 b) a extração de lipídios com etanol assistida por micro-ondas.

Sabe-se que a maioria dos fungos incluindo as linhagens de *M. circinelloides* cresce na forma de hifas, onde estão localizadas as partículas de lipídios e outras organelas citoplasmáticas. Neste estudo, a radiação das micro-ondas promoveu a fragmentação das hifas (Figura 4.16 b). Esse comportamento pode ter ocorrido, visto que, a absorção de energia de micro-ondas no material biológico é dependente de rotação dipolar e condução iônica e as moléculas (tais como água e etanol) exibem fortes momentos dipolares que podem ser manipulados em campos electromagnéticos alternados, o que resulta em colisões aleatórias destas moléculas e leva à agitação e ao aquecimento térmico (DATTA et al., 2005; ORSAT; REGHAVAN, 2005).

Figura 4.16. Estudo do efeito da irradiação de micro-ondas nos micélios de *Mucor circinelloides* URM 4182. (a) biomassa antes da extração com etanol assistida por micro-ondas; b) biomassa após da extração com etanol assistida por micro-ondas

Fonte: própria

As microfotografias da biomassa de *Mucor circinelloides* URM 4182 sugerem que o tratamento com micro-ondas agiu de forma eficaz rompendo as células, facilitando assim a extração de lipídios por etanol (Figura 4.16 a-b).

Na mesma figura é possível ainda observar que antes do processo de extração a biomassa (Figura 4.16 a) apresentava cor amarela em função da presença de carotenóides que são substâncias altamente apolares e solúveis em óleo que estão presentes nas células dos fungos. Entretanto, após o processo de extração ocorreu a despigmentação da biomassa (Figura 4.16 b), que pode ter ocorrido em virtude da retirada do lipídio, mostrando a eficiência do processo de extração utilizado (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012).

No presente trabalho, a extração assistida por micro-ondas mostrou-se um dos mais potentes métodos de extração de lipídio, podendo ser reconhecido como uma das técnicas promissoras para utilização em escala industrial, visto que oferece alta reprodutibilidade em menor período de tempo, operação simplificada e com menor consumo de solvente e de energia.

Além disso, a extração assistida por micro-ondas utilizando etanol como solvente atende aos conceitos de extração sustentável (*green extraction*), que visa o estudo e a aplicação de processos de extração de produtos, com baixo consumo de energia, com reduzidas operações unitárias e com uso de solventes alternativos e renováveis (ASBAHANI et al., 2015; CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; CHEMAT et al., 2006).

4.3.3. Perfil dos ácidos graxos presentes nos óleos microbianos extraídos por diferentes métodos

A composição em ácidos graxos dos lipídios provenientes da biomassa de *M. circinelloides* URM4182, após tratamentos extrativos com ultrassom (Modelo-UP200S/UP400S, Hielscher-Ultrasound Technology) e micro-ondas comercial (Titan MPSTTM PerkinElmer®), foi analisada e comparada (Tabela 4.7). O lipídio extraído de *M. circinelloides* URM4182 foi caracterizado quanto aos teores de interesse para controle de qualidade, incluindo composição em ácidos graxos e índice de acidez adotando normas estabelecidas pela AOCS (2004).

Independente do metodo de extração, os lipídios obtidos apresentaram concentrações relativamente elevadas dos ácidos graxos saturados, palmítico ((C16:0)CH₃(CH₂)₁₄COOH) e esteárico ((18:0) CH₃(CH₂)₁₆COOH), monoinsaturados e poli-insaturados, oleico ((C18:1, n-9) cis-9-octadecenoico) e linoleico ((C18:2, n-6) cis-

9,12-octadecadienoico), respectivamente. Este perfil de ácidos graxos de cadeia longa é similar aos óleos convencionalmente utilizados para a produção de biodiesel, indicando que o lipídio proveniente da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182 possui potencial para ser usado como matéria-prima para obtenção de combustível de qualidade em substituição ao diesel convencional (CARVALHO et al., 2013; ATABANI et al., 2013; RAMOS et al., 2009; RAMOS et al., 2008; BEZAD; FARID, 2007).

Tabela 4.7. Composição do lipídio extraído da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182

Propriedades		Método de extração	
		Folch Ultrassom	Etanol Micro-ondas
Índice de acidez (mg KOH/g de óleo)		38	34
Composição em ácidos graxos		Concentração (% m/m)	
Capróico	C6	0,30	NI
Caprílico	C8	0,18	0,07
Cáprico	C10	0,26	0,21
Láurico	C12	2,07	0,44
Mirístico	C14	2,06	1,47
Palmítico	C16	23,22	20,05
Esteárico	C18	7,77	3,87
Oleico	C18:1	39,29	32,43
Linoleico	C18:2	9,69	16,94
Gama linolênico	C18:3	10,81	22,77
Araquídico	C20	0,40	0,20
Eicosenoico	C20:1	0,67	0,74
Behênico	C22	0,53	0,33
Lignocérico	C24	1,71	1,54
Outros			
Saturados		38,10	24,14
Monoinsaturados		40,97	45,15
Poliinsaturados (2,3)		20,27	39,88

NI: Não identificado

Fonte: própria

Diferentemente da maioria dos óleos vegetais, foi detectado um percentual considerável de ácido Gama-linolenico ((C18:3, n-3) cis-9,12,15-octadecatrienoico) na composição do lipídio microbiano, este fenômeno é comum em SCOs de *M. circinelloides* visto que estes microrganismos são potenciais produtores de ácidos graxos poli-insaturados C18 (CERTIK; SHIMIZU, 1999; JACKSON, 1998b). Óleos com elevados teores de ácidos graxos insaturados quando usado como matéria-prima na produção de biodiesel proporciona menor estabilidade oxidativa, entretanto promovem melhor fluidez do

combustível que é uma excelente vantagem (VENKATA; VENKATA, 2011; KIRAN et al., 2010; VICENTE et al., 2010; RAMOS et al., 2009; WYNN et al., 2001).

A quantidade de GLA - C18: 3 produzido pelo *M. circinelloides* URM 4182 foi similar à produzida pela linhagem de *M. circinelloides* MU241 descrita por Vicente e colaboradores (2009) e (2010) (da ordem de 18,5% e 22,5% respectivamente) e pelas linhagens de *M. circinelloides* W11 (14,5%) e CBS 277.49 (27,1%) estudadas por Tang e colaboradores (2015). Por outro lado, os teores de GLA - C18: 3 alcançados pelo *M. circinelloides* URM 4182 nas condições utilizadas no presente trabalho foram relativamente superiores aos encontrados em SCOs das espécies de *Aspergillus* sp. (0,09%) e *Mortierella isabellina* (2,4%) estudadas por Venkata e Venkata (2011) e Wynn e colaboradores (2001), respectivamente.

No lipídio produzido por *M. circinelloides* URM 4182 não foram detectados PUFA's com quatro ou mais ligações duplas. Esses resultados estão em contraste com os obtidos por Kiran e colaboradores (2010) e Vicente e colaboradores (2010), que estudaram o acúmulo de lipídio por *M. terreus* e *M. circinelloides*, respectivamente, relataram elevados teores de PUFA, tais como C15: 4; C17: 4; C19: 4; C32: 3 e C33: 4 perfazendo um total de 9%.

Embora, os ácidos graxos encontrados em ambos os extratos lipídicos obtidos a partir dos diferentes métodos de extração sejam os mesmos, na análise comparativa constata-se que os teores variaram de acordo com o método utilizado: pode-se notar um perfil antagônico, visto que o extrato lipídico obtido a partir do tratamento com micro-ondas apresentou maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados, tais como C18:2 e C18:3 e o extrato lipídico obtido a partir do tratamento ultrassônico apresentou em sua maioria ácidos graxos saturados, tais como o C16:0 e C18:0 e monoinsaturado C18:1.

No extrato lipídico obtido a partir do tratamento com micro-ondas nota-se um aumento acentuado em torno de 50% nos teores de ácido linoleico (C18:2) e γ -linolênico (GLA - C18: 3) em relação aos teores desses ácidos graxos encontrados no extrato lipídico obtido a partir do tratamento ultrassônico. Por outro lado, o processo extrativo assistido por ultrassom foi mais eficiente na extração de ácidos graxos saturados, tais como: ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) fornecendo um aumento em torno de 13,65 e 50% respectivamente.

O ácido GLA-C18:3 quando extraído sob irradiação de ultrassom alcançou uma concentração da ordem 10,81%, cerca de 50% menor que a concentração encontrada no

extrato lipídico obtido a partir da extração assistida por micro-ondas (22,77% m/m). Resultado semelhante foi observado para o C18:2 que teve um aumento superior a 50% quando extraído pelo método de extração por micro-ondas. O ácido oleico (C18:1) foi o ácido graxo encontrado em maior quantidade em ambos os extratos lipídicos, e sua concentração foi 18% maior no extrato lipídico obtido a partir do processo ultrassônico que o obtido no processo com micro-ondas.

Tais diferenças podem ser justificativas pelos mecanismos de atuação da micro-ondas e ultrassom. A Figura 4.17 a-b, mostra os efeitos das técnicas de aquecimento não convencionais nas células microbianas.

Figura 4.17. Extração de lipídio da biomassa microbiana assistida por: a) micro-ondas; b) ultrassom

(a) extração por micro-ondas

(b) extração por ultrassom

Fonte: Adaptado de (MARTINEZ-GUERRA et al., 2014).

De acordo com a Figura 4.17 a-b é possível notar que o campo elétrico criado no reator de micro-ondas acelera os íons com cargas opostas em diferentes direções e promove as colisões entre as partículas para aumentar a temperatura do material e deste

modo aumentar a capacidade de extração do óleo por meio do etanol (MA et al., 2014; KAUFMANN; CHRISTEN, 2002; ORSAT; REGHAVAN , 2005).

Por outro lado, o ultrassom (Figura 4.17 b) gera ondas sonoras que se propagam em meios líquidos resultando em ciclos alternados de alta e de baixa pressão induzindo a mistura intensa do solvente com a biomassa devido à cavitação, causando um aquecimento localizado. Este fenômeno aumenta automaticamente a temperatura da maior parte do meio da amostra promovendo a ruptura celular e facilitando a entrada do solvente na célula e consequentemente o escoamento do lipídio (SINANOGLOU et al., 2015; MUBARAK et al., 2015; MA et al., 2014; QV et al., 2014; MA et al., 2014).

Na Tabela 4.8 é possível observar que a composição em ácidos graxos de lipídios produzidos por diferentes linhagens de *M. circinelloides*, utilizando glicose como única fonte de carbono, são similares ao perfil de ácidos graxos encontrados no extrato lipídico produzido pela linhagem estudada no presente trabalho. Na literatura o método de Folch é o mais utilizado para a extração do lipídio de biomassa microbiana, e trabalhos que utilizam o método de extração assistido por micro-ondas, ainda são escassos.

Tabela 4.8. Comparação do perfil de ácidos graxos produzidos por diferentes linhagens de *Mucor circinelloides*

Linhagem <i>M. circinelloides</i>	Método de extração	Fonte de Carbono	C16	C18	C18:1	C18:2	C18:3	Referência
<i>M. circinelloides</i> W11	Folch	Glicose	22,1	5,8	37,8	14,9	14,5	TANG et al., 2015
<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49	Folch	Glicose	18,2	2,2	27,3	19,2	27,1	TANG et al., 2015
<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49	Folch Ultrassom	Glicose	15,8	4,0	24,4	15,7	17,5	MITRA et al., 2012
<i>M. circinelloides</i> MU241	Folch Ultrassom	Glicose	20,0	2,0	37,0	14,3	18,5	VICENTE et al., 2010
<i>M. circinelloides</i> MU241	Folch Ultrassom	Glicose	20,7	7,0	28,0	12,7	22,5	VICENTE et al., 2009
<i>M. circinelloides</i> CBS 108.16	Folch	Glicose	21,5	14,7	28,8	15,5	15,9	BOTHA et al., 1997
<i>M. circinelloides</i> CBS 108.16	Folch	Glicose	18,6	2,9	15,7	12,9	32,0	KENDRICK; RATLEDGE, 1992
<i>M. circinelloides</i> INMI	Folch	Glicose	14,0	5,5	16,2	16,9	35,5	MYSYAKINO; FUNTIKOVA, 2008
<i>M. circinelloides</i> URM 4182	Folch Ultrassom	Glicose	23,22	7,77	39,29	9,69	10,81	Este trabalho
<i>M. circinelloides</i> URM 4182	Micro-ondas etanol	Glicose	20,05	3,87	32,43	16,94	22,80	Este trabalho

4.3.4. Produção de *single cell oil* por *M. circinelloides* URM 4182 em shaker orbital

A produção de *single cell oil* por *M. circinelloides* URM 4182 foi investigada em meio líquido contendo concentrações diferentes de glicose 20 g/L (meio “A”) e 40 g/L (meio “D”). Os cultivos foram efetuados em Erlenmeyers incubados em shaker orbital por um período máximo de 120 h. Nas Figuras 4.18 a-b são apresentadas as curvas do perfil de crescimento celular e de consumo de glicose, bem como da produção de lipídio em função do tempo de cultivo.

Figura 4.18. Perfil da concentração de biomassa (■) e consumo de glicose (●) durante a produção de lipídio (▲) pelo fungo de *M. circinelloides* URM 4182: a) cultivo em meio A; b) cultivo em meio D.

Fonte: própria

Observando os gráficos (Figura 4.18 a-b) pode-se supor que a produção de lipídios está associada ao crescimento do fungo, visto que as curvas apresentam o mesmo perfil. Além disso, verifica-se que em ambos os cultivos a concentração de biomassa aumentou rapidamente nas primeiras 24 h alcançando a fase estacionária em 96 h.

No cultivo efetuado em meio contendo 20g/L glicose (meio A) observa-se que o término do consumo da glicose coincide com uma inflexão na curva de massa celular (Figura 4.18 a), enquanto no meio contendo 40g/L (Meio D) o fungo continua a crescer até o final do período de 120 h. Também é possível observar para ambos os cultivos com os meios “A” e “D” que o consumo de glicose foi significativo em função do tempo de cultivo, entretanto, não houve esgotamento do substrato no período total de

experimentação (120 h). Aparentemente, o esgotamento de glicose pelo microrganismo nos cultivos “A” e “D” foi limitado pelas condições adversas de pH durante o crescimento e/ou pelo número de esporos inoculado (BELLOU et al., 2012).

A Tabela 4.9. apresenta os parâmetros bioquímicos de cultivo, bem como os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), conversão de substrato em lipídio ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica em relação à biomassa (Q_X), produtividade volumétrica em relação ao lipídio (Q_P) e velocidade volumétrica de consumo de substrato (Q_S) em 120 h.

Tabela 4.9. Parâmetros bioquímicos do cultivo de *M. circinelloides* URM4182 (120 h) de cultivo em shaker orbital utilizando glicose como fonte de carbono em concentrações diferentes

Parâmetros	Meio de cultivo	
	A	D
Biomassa (g/L)	4,75±0,08	6,64±0,05
Glicose residual (g/L)	4,37±0,18	3,85±0,01
% Lipídio (g/g biomassa)	42,76±0,41	46,65±0,28
$Y_{X/S}$ (g/g glicose)	0,30±0,02	0,18±0,01
$Y_{P/S}$ (g/g glicose)	0,13±0,003	0,09±0,01
Q_X (g/L.h)	0,04±0,003	0,06±0,01
Q_P (g/L.h)	0,02±0,001	0,03±0,01
Q_X (g/L.dia)	0,95±0,01	1,32±0,01
Q_P (g/L.dia)	0,42±0,01	0,62±0,001
Q_S (g/L.h)	0,13±0,001	0,30±0,001

Fonte: própria

No cultivo efetuado em meio contendo 20g/L de glicose (Figura 4.19a) a produção mais elevada de biomassa (4,75 g/ L), de $Y_{X/S}$ (0,30 g/ g de glicose) e de Q_X (0,95 g/ L.dia) foram obtidos em 120 h, e a concentração máxima de lipídio foi de 43,25% correspondendo a uma produtividade volumétrica em relação ao lipídio (Q_P) de 0,42 g/ L.dia (Tabela 4.9).

Esses resultados são similares aos relatados por Vicente e colaboradores (2010) que cultivaram a linhagem de *M. circinelloides* MU241 em meio contendo glicose (20 g/L) como única fonte de carbono e reportaram rendimentos de 4,17 g/L de biomassa fúngica em 96 h de cultivo, quando o fungo atingiu a fase estacionária. Os autores utilizaram uma

mistura de solventes (água e hexano) para extração do lipídio das células e alcançaram rendimentos de 22,9% de triacilgliceróis em relação ao conteúdo de matéria seca. Vicente e colaboradores (2009) também cultivaram uma linhagem silvestre de *M. circinelloides*, utilizando glicose como única fonte de carbono e alcançaram um rendimento lipídico da ordem de 20%.

No presente trabalho, o cultivo efetuado em glicose numa concentração de 40g/L (Figura 4.18.b) observa-se que a concentração de biomassa aumentou de forma rápida após a fase *lag* de crescimento, sendo a concentração máxima (6,64 g/L) alcançada com 120 h de cultivo. Na Figura 4.9b também é possível observar que não houve esgotamento da glicose em 120 h e após 96 h de cultivo do fungo, tanto a produção de biomassa quanto de lipídio permaneceram estáveis. Nesse período de tempo, foi alcançada uma concentração de biomassa de 6,64 g/L e rendimento de 46,65% de lipídio.

Muitos fatores afetam a síntese de lipídios, incluindo composição genética do microrganismo (cepa), o meio de cultivo e seus componentes, as condições operacionais (e.g., pH, temperatura, agitação e oxigenação) e a taxa de crescimento (BELLOU et al., 2012; EL-NAGGAR et al., 2011; EL-FADALY et al., 2009). O consumo parcial da glicose pode ser atribuído às condições adversas de pH, pois os cultivos foram realizados em meio isento de agentes tamponantes e o aferimento manual do pH a cada 24 h provavelmente não foi suficiente para garantir a manutenção do pH do meio em 4,5 durante todo o cultivo.

4.3.5. Produção de *single cell oil* por *M. circinelloides* URM4182 em biorreator

Na maioria dos trabalhos descritos na literatura, a produção de lipídio a partir de microrganismos tem sido estudada em sistemas de cultivo conduzidos em frascos agitados, uma vez que o estudo das variáveis nesse sistema tem menor custo e os resultados alcançados são satisfatórios no que diz respeito à produção de biomassa e de lipídios, embora sejam relatados alguns problemas relacionados com a limitação de oxigênio ou controle do pH do meio de cultura (REIS et al., 2014; XIA et al., 2011; VICENTE et al., 2010; VICENTE et al., 2009).

Desta forma, a etapa seguinte do trabalho foi direcionada para o estudo do cultivo do fungo em biorreator de tanque agitado com capacidade de 1L provido de controles automáticos de ajustes de pH, oxigênio dissolvido, agitação e aeração visando superar as limitações relatadas para cultivos em frascos agitados.

Para tanto, foram realizados cultivos no biorreator de tanque agitado contendo os meios “A” e “D” conforme descrito na Tabela 4.4, utilizando um volume de 700 mL, agitação de 250 rpm, a 26 °C por 120 h, sob condições de transferência de oxigênio (kLa de 49,9 e 41,6 h^{-1} para os meios A e D, respectivamente).

O biorreator foi inoculado com uma suspensão de 1×10^5 esporos/mL e o pH do cultivo foi controlado automaticamente para 4,5, por meio da adição de NaOH 1 mol/L ou H_2SO_4 1 mol/L.

A Figura 4.19 mostra as fotografias do cultivo de *M. circinelloides* URM4182 em biorreator nos tempos inicial e final. Assim como no cultivo efetuado em frascos incubados em shaker orbital, o meio incolor observado no tempo inicial (0h) tornou-se de coloração amarelada ao final do cultivo em 120 h.

Figura 4.19. Fotografias do cultivo do *M. circinelloides* URM 4182 em meio glicose (Meio A) conduzido em biorreator

Fonte: própria

Durante o cultivo foram retiradas periodicamente amostras do meio de cultura para a determinação quantitativa do consumo de glicose pelo *M. circinelloides* URM4182 nos cultivos contendo meio “A” e o meio “D” com concentração inicial de 20 g/L e 40 g/L de glicose, respectivamente. Em 120 h de cultivo, o meio de cultura foi separado das células por centrifugação a 1570 g por 15 min, em seguida foram realizadas análises para quantificação da formação de biomassa e produção de lipídio.

Em ambos os cultivos verifica-se que entre os tempos 0 a 12 h (Figura 4.20), correspondente a fase *lag* houve um pequeno consumo de glicose quando comparado aos demais tempos, visto que nesse período o crescimento celular foi mínimo devido à

adaptação das células. Entre o período de 12 e 24h verifica-se acentuado consumo de glicose, com redução de praticamente 50% da concentração inicial.

No cultivo em meio “A”, cuja concentração inicial de glicose era de 20 g/L, o esgotamento da glicose foi alcançado em 72 h de cultivo, contrastando com o comportamento observado no cultivo efetuado em frascos agitados quando se utilizou o mesmo meio, uma vez que em 120 h ainda havia uma quantidade considerável de glicose residual da ordem de $4,37 \pm 0,18$ g/L.

O mesmo comportamento foi observado no cultivo efetuado em meio contendo 40 g/L de glicose (meio “D”), no qual o esgotamento da glicose no biorreator foi alcançado em 96 h e no cultivo conduzido em frascos agitados, a glicose residual em 120 h de cultivo foi da ordem de 3,85 g/L.

Figura 4.20. Perfil de concentração do consumo de glicose durante a produção de lipídio pelo fungo de *M. circinelloides* URM4182 em biorreator contendo glicose como fonte de carbono em duas concentrações: a) 20g/L (meio A) e b) 40g/L (Meio D).

Fonte: própria

A comparação dos parâmetros bioquímicos dos cultivos efetuados em shaker e biorreator (Tabela 4.10) indica diferenças significativas no consumo da glicose para ambas as concentrações iniciais de glicose (20 g/L e 40 g/L). Tal resultado foi confirmado estatisticamente por meio do programa Design Expert 9.0, no qual o valor de p obtido foi menor que 0,05 considerando um nível de confiança de 95%.

A diferença no consumo de glicose entre os dois sistemas de cultivo (shaker e biorreator) pode ser atribuída ao controle do pH do meio de cultivo. Enquanto no cultivo efetuado em biorreator o pH se manteve estável, uma vez que era controlado automaticamente, no cultivo em shaker o crescimento de biomassa e consequentemente o consumo da glicose pode ter sido afetado em virtude do ajuste manual do pH que provavelmente não garantiu efetivamente a estabilidade do pH em 4,5.

De acordo com a Tabela 4.10 é possível notar que os cultivos efetuados em biorreator utilizando os meios “A” e “D” produziram uma quantidade de biomassa da ordem de 10,15 g/L e 13,28 g/L respectivamente, esses resultados são superiores aos alcançados no cultivo efetuado em frascos agitados que forneceram concentrações de biomassa de 4,75 g/L no cultivo em meio “A” e 6,64 g/L quando se utilizou o meio “D”.

Tabela 4.10. Comparação dos parâmetros bioquímicos obtidos no cultivo de *M. circinelloides* URM4182 em diferentes aparatos (Shaker e biorreator) em 120 h utilizando glicose como fonte de carbono

Parâmetros	Cultivo			
	Shaker		Biorreator	
	A	D	A	D
Biomassa (g/L)	4,75±0,08	6,64±0,05	10,15±0,02	13,28±0,05
Glicose residual (g/L)	4,37±0,18	3,85±0,01	0,28±0,06	0,55±0,02
% Lipídio (g/g biomassa)	42,76±0,41	46,65±0,28	38,16±0,02	40,41±0,02
Y_{X/S} (g/g glicose)	0,30±0,02	0,18±0,01	0,52±0,05	0,33±0,03
Y_{P/S} (g/g glicose)	0,13±0,003	0,09±0,01	0,20±0,01	0,13±0,01
Q_X (g/L.h)	0,04±0,003	0,06±0,01	0,08±0,01	0,11±0,01
Q_P (g/L.h)	0,02±0,001	0,03±0,01	0,03±0,02	0,04±0,02
Q_X (g/L.dia)	0,95±0,01	1,32±0,01	2,03±0,01	2,66±0,01
Q_P (g/L.dia)	0,42±0,01	0,61±0,01	0,77±0,02	1,07±0,02
Q_S (g/L.h)	0,13±0,001	0,30±0,001	0,16±0,02	0,33±0,01

Fonte: própria

No que diz respeito à produtividade de biomassa por dia (Q_x) o cultivo efetuado em biorreator para ambos os meios “A” e “D” (2,03 e 2,66 g/L.h, respectivamente) foi maior que a Q_x alcançada no cultivo em frascos agitados (0,95 e 1,33 g/L.h, respectivamente). No entanto, o acúmulo de lipídio na biomassa obtida foi superior no cultivo realizado em frascos agitados, uma vez que para os meios “A” e “D” a produção de lipídio foi da ordem de 42,76% e 46,65% respectivamente e no cultivo conduzido em biorreator o acúmulo de lipídio foi, respectivamente, da ordem de 38,16% e 40,41%.

A variação da produção de lipídio nos diferentes sistemas de cultivo pode ser associada à dispersão do inóculo (suspensão de esporos) no meio de cultura que pode ter afetado o crescimento micelial, e consequentemente afetado a formação de lipídio. Por outro lado, em consequência do rápido esgotamento da glicose pode ter acarretado o consumo de lipídio formado para garantir a sobrevivência do fungo. Este comportamento foi relatado no cultivo de leveduras oleaginosas (HOLDSWORTH; RATLEDGE, 1988) sendo constatado que após o esgotamento da fonte de carbono, o lipídio formado foi utilizado pelas leveduras, comprovando a hipótese de que se a glicose, ou outros substratos, esgotarem-se no final da fermentação, em seguida, o microrganismo começa a utilizar o lipídio como fonte de carbono e de energia.

Os resultados obtidos são similares aos reportados por Bellou e colaboradores (2012) com relação a comparação do desempenho do cultivo de diferentes espécies de zigomicetos em Erlenmeyer e em biorreator. Os autores relataram a obtenção de maior produção de biomassa quando o cultivo foi realizado em biorreator e maior acúmulo de lipídio na biomassa obtida a partir do cultivo em Erlenmeyer. Para solucionar essas limitações, esses mesmos autores sugeriram a construção de biorreatores para o cultivo de fungos oleaginosos, considerando vários parâmetros relacionados com as propriedades biológicas específicas de fungos, isto é, a fragilidade do micélio, bem como o crescimento heterogêneo da biomassa. Adicionalmente, Bellou e colaboradores (2012) observaram que o tipo de inóculo influenciou no crescimento da biomassa, resultando na formação de um micélio compacto, quando o recipiente de cultura foi inoculado com uma suspensão de esporos, e na formação de micélio mais disperso a partir da inoculação de pellets de pré-cultura de fungo crescido em ágar. Deste modo, constata-se que o tipo de inóculo (isto é, número de esporos por unidade de volume de meio de cultura) é um dos principais fatores que influencia na morfologia micelial, podendo afetar a reologia da cultura e causar difusão limitada de nutrientes no meio em biorreator.

Papanikolaou e colaboradores (2004) estudaram o cultivo de *Mortierella isabellina* e *Cunninghamella echinulata* em frascos Erlenmeyers e biorreator em meio contendo glicose como fonte de carbono para a produção de lipídios. Os autores relataram que para os ensaios realizados de biorreator, tanto o cultivo de *C. echinulata*, quanto o de *M. isabellina* apresentaram formação de grandes aglomerados de micélio, o que teria causado limitações quanto à homogeneidade das culturas quando comparado aos aglomerados de micélio formados pelas mesmas espécies cultivadas em Erlenmeyers.

Papanikolaou e colaboradores (2007-b) estudaram o cultivo da levedura *Yarrowia lipolytica* ACACC-50109 utilizando estearina como única fonte de carbono. Os experimentos foram conduzidos no modo descontínuo em frascos Erlenmeyer de 250 mL agitados em shaker ou em biorreator de 2L de tanque agitado (Applikon, The Netherlands). Os autores relataram que ocorreu maior produção de biomassa e acúmulo de lipídios intracelular pela *Y. lipolytica* ACA CC-50109, quando esta espécie foi cultivada em frascos com agitação orbital (em torno de 53% m/m), do que, quando foi cultivada em biorreator (em torno de 16% m/m).

4.3.6. Cultivo de *M. circinelloides* URM 4182 para a produção de lipídio utilizando milhocina como fonte de nutrientes.

A solução de milhocina (composição Anexo 1) é um produto obtido a partir da maceração do grão de milho e devido sua composição rica em carboidratos solúveis, sais minerais e aminoácidos essenciais é considerada fonte de nutrientes adequada para o desenvolvimento de vários microrganismos, cujo pH está em torno de 4,5. Na literatura são descritos diversos estudos que utilizaram a milhocina como fonte de nutriente principal ou como co-substrato em processos de fermentação (KUANG et al., 2015; DOMINGOS, 2009; FERRAZ et al., 2008; VICENTIM, 2007; MASARIN, 2006; SILVA, 2011; SILVA et al., 2010; AKHTAR et al., 1992). Estudos relacionados à viabilidade econômica para produção de ácidos graxos recomendam o uso de subprodutos industriais como substratos no cultivo de fungos filamentosos, visando reduzir os custos do meio de cultura (MCCOY, 2006). De acordo com Malvessi (2008) a milhocina pode substituir o extrato de levedura, com excelentes resultados.

No presente trabalho, foi avaliado a substituição dos nutrientes sintéticos comerciais utilizados nos meios de cultivos (A e D), por milhocina para a produção de *single cell oil* por *M. circinelloides* URM4182. Para tanto foram realizados cultivos em Erlenmeyers incubados em shaker orbital (Figura 4.21 a-b) e em biorreator em meios de cultivo contendo com concentrações de glicose de 20 g/L (meio “C”) e 40 g/L (meio “E”) e milhocina (5% v/v). Os cultivos em biorreator foram conduzidos a 26 °C por 120 h sob condições de transferência de oxigênio (k_La de 41,5 e 45,9 h^{-1} para os meios C e E, respectivamente).

Figura 4.21. Cultivo de *M. circinelloides* URM 4182 em shaker orbital utilizando milhocina como fonte de nutrientes: a) caldo fermentativo; b) biomassa

a)

b)

Fonte: própria

Nas Figuras 22 a-b são apresentadas as curvas do perfil de crescimento celular e de consumo de glicose, bem como da produção de lipídio a partir dos cultivos em shaker orbital utilizando os meios de cultura “C” e “E”. Como verificado nos cultivos efetuados com glicose e nutrientes sintéticos, as curvas de crescimento celular e produção de lipídio apresentaram o mesmo perfil, sugerindo que a produção de lipídios está associada ao crescimento do fungo.

Figura 4.22. Perfil de concentração de biomassa (■) e consumo de glicose (●) durante a produção de lipídio (▲) pelo fungo de *M. circinelloides* URM 4182: a) cultivo em meio C; b) cultivo em meio E

a) Meio contendo 20g/L de glicose

b) Meio contendo 40g/L de glicose

Fonte: própria

Observando os gráficos (Figura 22 a-b) verifica-se que em ambos os cultivos a concentração de biomassa aumentou rapidamente, atingindo em 120 h de cultivo valores similares nos meios contendo 20g/L (Meio C) ou 40 g/L de glicose (Meio E) da ordem 12,61g/L e 14,43 g/L, respectivamente. Observa-se ainda que a glicose foi praticamente

esgotada em ambos os cultivos (concentração residual $< 0,97$ g/L). Esses valores se comparam favoravelmente aqueles alcançados em meios contendo glicose e nutrientes sintéticos (meios A e D), sugerindo que milhocina pode substituir com sucesso os macronutrientes e micronutrientes propostos por Vicente et al, 2010 na formulação de meio de cultivo para produção de lipídios por *M. circinelloides*. Outro aspecto importante do uso da milhocina foi o efeito de tamponamento conferido aos meios de cultivo (meios “C” e “E”) eliminando, desta forma, a necessidade de ajuste manual do pH durante o período de experimentação.

Apesar dos menores teores de lipídio obtidos na biomassa celular da ordem de 22,64% e 30,63% em relação aos dados obtidos em meio suplementado com nutrientes sintéticos, a produtividade volumétrica de lipídio Q_p em meios suplementados com milhocina foi superior em aproximadamente 40%. Para melhor visualização dos resultados obtidos a Tabela 4.11 apresenta os parâmetros bioquímicos dos cultivos de *M. circinelloides* URM4182 em meios contendo milhocina (Meios C e E) conduzidos em erlenmeyer agitados.

Na etapa seguinte foi realizado o cultivo do *M. circinelloides* em biorreator de tanque agitado com capacidade de 1L utilizando os meios de cultura “C” e “E”. Para tanto, nesta etapa do trabalho, foram realizados cultivos no biorreator (Figura 4.23 a-b) de tanque agitado contendo os meios “C” ou “E”, utilizando um volume de 700 mL, agitação de 250 rpm, a 26 °C por 120 h. O biorreator foi inoculado com uma suspensão de 1×10^5 esporos/mL e o pH do cultivo foi medido e ajustado automaticamente para 4,5, por meio da adição de NaOH 1 mol/L ou H₂SO₄ 1 mol/L.

Figura 4.23. Cultivo de *M. circinelloides* URM 4182 em biorreator utilizando milhocina como nutriente: a) Glicose 20g/L + milhocina 5%; b) Glicose 40g/L + milhocina 5% (120h).

a)

b)

Fonte: própria

Durante o cultivo em biorreator foram retiradas periodicamente amostras do meio de cultura para a determinação quantitativa da glicose residual (Figura 4.24 a-b). Após o período de crescimento dos fungos (120 h), o meio de cultura foi separado das células por centrifugação a 1570 g por 15 min, em seguida foi realizada análise para a determinação quantitativa da formação de biomassa e produção de lipídio.

Figura 4.24. Perfil do consumo de glicose durante a produção de lipídio pelo fungo de *M. circinelloides* URM4182 em biorreator contendo meio enriquecido com milhocina a) (Meio C); b) (Meio E).

Fonte: própria

Nos cultivos efetuados em biorreator contendo meios suplementados com milhocina foi constatado o esgotamento total da glicose, diferentemente dos cultivos realizados na ausência de milhocina (“A” e “D”). No cultivo efetuado em meio “C”, cuja concentração inicial de glicose era de 20 g/L, o esgotamento total do substrato foi alcançado em aproximadamente 60 h de cultivo, para o cultivo em Shaker quando se utilizou o mesmo meio, o substrato se esgotou em 120 h de crescimento. Nos cultivos realizados em biorreator e Shaker com concentração de 40 g/L de glicose (meio “E”) foi observado o esgotamento do substrato em 96 h.

Nesta série de experimentos foi também verificado a formação de grandes aglomerados de biomassa fúngica ocupando um espaço considerável no interior do reator, conforme ilustrado na Figura 23 (a,b) o que provavelmente deve ter dificultado a absorção

de nutrientes pelo microrganismo prejudicando seu metabolismo, visto que no centro desses aglomerados a distribuição de oxigênio é nula. Além da baixa solubilidade, o processo de transferência de oxigênio da fase gasosa para o meio líquido, no caso de cultivos de fungos filamentosos, enfrenta resistências físicas devido à geração de caldos viscosos à medida que o cultivo evolui. Além disso, com o aumento da concentração celular e da velocidade específica de respiração celular o consumo global de oxigênio aumenta (WANG et al., 2005).

Embora tenham ocorrido mudanças reológicas do meio de cultivo, em virtude do elevado crescimento celular e cisalhamento das hifas causado pelas pás de agitação do biorreator, o fungo conseguiu assimilar a glicose e a milhocina, não apresentando problemas em relação à produção de biomassa. De acordo com a Tabela 4.11 pode-se notar que os cultivos em biorreator utilizando os meios “C” e “E” produziram uma quantidade de biomassa da ordem de 10,20 g/L e 15,49 g /L, respectivamente. Esses resultados são similares aos alcançados quando o cultivo foi realizado em Shaker que produziu uma biomassa de 12,61 g/L no cultivo com o meio “C” e 14,43 g/L quando se utilizou o meio “E”.

O menor teor de lipídios verificado nos cultivos efetuados em biorreator utilizando meios contendo milhocina como fonte de nutrientes pode ser consequência do rápido esgotamento da glicose, o que pode ter levado ao consumo de lipídio para garantir a sobrevivência do fungo.

Tabela 4.11. Parâmetros bioquímicos do cultivo de *M. circinelloides* URM 4182 em 120 h de cultivo contendo meio com milhocina

Parâmetros	Shaker		Biorreator	
	C	E	C	E
Biomassa (g/L)	12,61±0,05	14,43±0,01	10,20±0,06	15,49±0,03
Glicose Residual (g/L)	0,97±0,01	0,47±0,01	0,31±0,03	0,37±0,02
% Lipídio (g/g biomassa)	22,83±0,18	30,53±0,28	20,46±0,05	31,22±0,03
Y_{X/S} (g/g glicose)	0,66±0,01	0,36±0,01	0,53±0,02	0,39±0,01
Y_{P/S} (g/g glicose)	0,46±0,01	0,31±0,01	0,11±0,01	0,12±0,01
Q_X (g/L.h)	0,11±0,01	0,12±0,01	0,09±0,02	0,13±0,01
Q_P (g/L.h)	0,02±0,01	0,04±0,01	0,02±0,01	0,04±0,01
Q_X (g/L.dia)	2,52±0,01	2,88±0,01	2,04±0,02	3,10±0,01
Q_P (g/L.dia)	0,57±0,01	0,88±0,01	0,42±0,02	0,97±0,01
Q_S (g/L.h)	0,16±0,01	0,33±0,01	0,16±0,02	0,33±0,01

Fonte: própria

Com relação à produtividade de biomassa por dia (Q_x) o cultivo em biorreator para ambos os meios “C” e “E” (2,04 e 3,10 g/L.h, respectivamente) foi similar ao Q_x alcançada no cultivo em Shaker (2,52 e 2,86 g/L.h, respectivamente). O acúmulo de lipídio em ambos os cultivos conduzidos em biorreator e Shaker também não apresentou diferença significativa.

Os resultados obtidos sugerem que a milhocina pode ser utilizada como potencial fonte de nutrientes na formulação de meios para a produção de lipídios, visto que a biomassa do *M. circinelloides* URM4182 teve um aumento acentuado quando cultivada na presença de milhocina, quando comparado aos meios A e D que utilizaram nutrientes sintéticos.

Na Tabela 4.12, é possível observar a diferença entre o perfil da composição em ácidos graxos do lipídio (ambos extraídos pelo método Folch assistido por ultrassom) obtido a partir do cultivo de *M. circinelloides* URM4182, utilizando o meio “A” isento de milhocina e utilizando o meio “C” contendo milhocina. Os resultados apresentados demonstram que o enriquecimento do meio de cultura com milhocina proporcionou um aumento considerável na produção de ácido graxo linoleico (C18:2) e Gama linolênico (C18:3) e uma produção significativamente menor de ácidos graxos saturados (C16 e C18) quando comparados ao cultivo em meio isento de milhocina. Deste modo, conclui-se que possivelmente a adição de milhocina ao meio de cultivo proporcionou um aumento na produção de ácidos graxos poli-insaturados pela linhagem de *M. circinelloides* URM4182.

Tabela 4.12. Comparação da composição em ácidos graxos do lipídio produzidos por *M. circinelloides* URM4182 cultivado em diferentes meios

Composição em ácidos graxos		Meio de cultivo	
		A	C
		Concentração (% m/m)	
Palmítico	C16	22,21	15,63
Palmitoleico	C16:1	1,01	4,57
Esteárico	C18	8,06	4,43
Oleico	C18:1	39,29	25,33
Linoleico	C18:2	9,69	17,44
Gama linolênico GLA	C18:3	10,81	18,32

Meio de cultivo A: Glicose 20g/L; Meio de cultivo C: Milhocina (5%)+ Glicose (20 g/L)

Fonte: própria

Alguns trabalhos na literatura destacam o uso da milhocina na produção de lipases por diferentes fungos filamentosos (ESSAMRI; VALERIE; LOUIS, 1998; ANTCHACK e al., 2006). No entanto, estudos relacionados ao uso de milhocina como fontes de nutrientes na produção de lipídios são escassos. Antczack e colaboradores (2006) estudaram o cultivo de duas linhagens de *Mucor* (*M. circinelloides* e *M. racemosus*) em meios de cultura contendo diferentes concentrações de azeite de oliva, milhocina e glicose como fontes de carbono e nitrogênio para a produção de lipases ligadas ao micélio e lipídios. Os autores constataram que o meio contendo milhocina foi o mais eficiente resultando em uma superprodução de lipases e lipídios por ambas as estirpes de *Mucor* estudadas.

4.3.7. Estudo reológico do lipídio de *M. circinelloides* URM 4182

O estudo da viscosidade é um dos parâmetros fundamentais no processo de produção de biodiesel, sendo que, a aplicação direta dos óleos nos motores é limitada por algumas propriedades físicas dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade. Desta forma, o estudo da viscosidade dos óleos microbianos é fundamental para posterior comparação com o biodiesel obtido.

O material lipídico da biomassa de *M. circinelloides* URM4182 foi avaliado em um viscosímetro cone-placa sob temperatura de 50 °C. A Figura 4.25 (a) mostra a variação da viscosidade em função da taxa de deformação para o comportamento da viscosidade absoluta do óleo microbiano.

A análise do comportamento da curva permitiu o ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação (Figura 4.25 b) de acordo com a lei de potência. Linearizando e resolvendo a Equação 4.1 determina-se o valor do coeficiente de escoamento (n - índice de comportamento de escoamento). Os fluidos para os quais a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à taxa de deformação são denominados fluidos newtonianos, nos quais $n=1$ (FOX; PRITCHARD; MSDONALD, 2009).

Para o óleo de *M. circinelloides* URM 4182 verificou-se uma viscosidade de 60 cP dentro da faixa de deformação aplicada (60 a 260 s⁻¹), esse valor se assemelha aos valores de viscosidade de outros óleos microbianos como os provenientes da biomassa de *Microcystis aeruginosa* NPCD-1 (52,7 cP), *Trichormus* sp. CENA77 (59 cP) e *Synechococcus* sp. PCC7942 (62,3 cP) reportados por Da Rós et al., (2013) na faixa de deformação entre 70 a 150 s⁻¹. No entanto, esses mesmos autores constataram que os óleos da biomassa de cianobactérias revelaram comportamento de fluido não newtoniano,

diferente do lipídio produzido pelo *M. circinelloides* URM 4182 que apresentou um comportamento reológico do tipo fluido-Newtoniano, uma vez que a viscosidade foi constante para qualquer valor de taxa de cisalhamento e apresentou um coeficiente linear igual a 1.

Figura 4.25. Viscosidade absoluta em função da taxa de deformação do material lipídico da biomassa de *Mucor circinelloides* URM 4182

Fonte: própria

Esse comportamento está de acordo com os resultados apresentados na literatura para alguns óleos vegetais e gorduras residuais, tais como o óleo de palma e sebo bovino que também apresentam comportamento fluido-Newtoniano (MOREIRA et al., 2007).

A elevada viscosidade do óleo proveniente da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182 não é um fator limitante para uso como matéria-prima na produção de biodiesel, uma vez que as reações de síntese de biodiesel a partir de matérias-primas lipídicas com viscosidade elevada, tais como o sebo bovino, resultaram em ésteres de etila com valores de viscosidade que atenderam as normas estabelecidas para uso como combustível (SILVA et al., 2012).

Sabe-se que a estrutura molecular dos ésteres alquílicos varia segundo as características estruturais dos ácidos graxos dos óleos vegetais precursores do biodiesel. Logo, o tamanho e o número de insaturações da cadeia carbônica são também fatores

determinantes de algumas propriedades do biodiesel. Como exemplo, observa-se que a elevação do número de cetano, calor de combustão (medida de conteúdo energético) e dos pontos de fusão e ebulição do combustível são reflexos do aumento do comprimento da cadeia carbônica dos ésteres. Por outro lado, uma cadeia mais insaturada eleva a fluidez (parâmetro relacionado com a viscosidade e a cristalização do combustível).

Além disso, os ácidos graxos de cadeia longa exercem importante papel na manutenção das propriedades do biodiesel, visto que este quando submetido a baixas temperaturas, tende a solidificar-se parcialmente ou a perder sua fluidez, levando à interrupção do fluxo do combustível e entupimento do sistema de filtração, ocasionando problemas na partida do motor. Deste modo, os ácidos graxos de cadeia longa proporcionam menor viscosidade e elevado ponto de névoa (*cloud point* - CP) ao biodiesel.

4.3.8. Produção de ésteres etílicos a partir de SCO de *M. circinelloides* URM 4182

O presente trabalho incluiu o estudo de três métodos de obtenção de biodiesel utilizando o *M. circinelloides* URM4182 como matéria-prima:

- Método 1: etanólise enzimática do lipídio microbiano utilizando aquecimento convencional.
- Método 2: etanólise enzimática utilizando aquecimento não convencional (reator de micro-ondas)
- Método 3: conversão direta da biomassa, ou seja, produção de ésteres sem a prévia extração do lipídio.

Nos Métodos 1 e 2 um dos principais objetivos foi analisar a viabilidade de óleo de *M. circinelloides* URM4182 como matéria-prima para a produção de biodiesel utilizando etanol e catalisador bioquímico na presença de um solvente orgânico, visando obter um biocombustível produzido a partir de fontes totalmente renováveis. Para tanto, a lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) foi escolhida como catalisador, em virtude de ser o melhor biocatalisador disponível comercialmente. Além disso, esta lipase é obtida a partir de uma fonte renovável e o seu potencial como um biocatalisador com ciclos sucessivos de utilização são bem documentados e amplamente reconhecidos na literatura (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Nas reações de etanólise do óleo de *M. circinelloides* URM4182 efetuadas sob aquecimento convencional (Método 1) ou sob radiação de micro-ondas (Método 2) foi utilizado iso-octano como solvente. O uso de solventes orgânicos, tais como o iso-octano no meio de reação oferece inúmeras vantagens de interesse industrial em comparação a sistemas de reação aquosos tradicionais, tais como aumento da solubilidade dos substratos, a reversão do equilíbrio termodinâmico, a supressão de reações água-dependente e a eliminação da contaminação microbiana. Além disso, o solvente pode ser recuperado e reutilizado. Assim, a produção de biodiesel obtida por meio da etanólise enzimática na presença iso-octano pode ser considerada sustentável.

Para o Método 1 o óleo obtido das células de *M. circinelloides* URM4182 foi submetido à etanólise enzimática conduzida em duplicata por um período máximo de 96 h a 50 °C utilizando aquecimento convencional amplamente empregado na transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais (CARVALHO et al., 2013). As análises RMN ¹H (Figura 4.27) e de CLAE (Tabela 4.13) confirmaram rendimentos da ordem de 93% m/m ±0,5 mostrando que este método reacional foi eficiente na conversão do óleo microbiano em ésteres etílicos.

Quando comparados aos processos clássicos de obtenção de biodiesel mediados por catalisadores químicos homogêneos ou heterogêneos, o método enzimático opera a temperaturas muito mais baixas e por isso requer muito mais tempo de reação. Portanto, a utilização de sistemas de aquecimento não convencionais para acelerar os processos enzimáticos, tais como micro-ondas e ultrassom constituem tema de relevante importância, principalmente para aplicação em sistemas não aquosos, nos quais as enzimas apresentam estabilidade térmica mais elevada (GUDE et al., 2013).

A transesterificação assistida por micro-ondas é eficiente em termos de gasto de energia e é considerado um processo rápido para produzir biodiesel a partir de diferentes matérias-primas. Além disso, muitos pesquisadores testaram a aplicação de micro-ondas na produção em biodiesel e constataram que as reações foram claramente aceleradas de 5 a 1000 vezes (COSTA et al., 2011; REFAAT, 2010; PATIL; DENG, 2009; GROISMAN; GEDANKEN, 2008; SHARMA; SINGH; UPADHYAY, 2008; GEDYE, SMITH FE, WESTAWAY KC, 1988).

Sabe-se que o aquecimento por micro-ondas é também denominado de aquecimento dielétrico, e existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor. O primeiro deles é chamado rotação de dipolo, e relaciona-se

com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida para esta orientação nestes dipolos é dissipada na forma de calor. O segundo mecanismo é chamado de condução iônica, e o calor é gerado por meio de perdas por fricção, que acontecem por meio da migração de íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético (GUDE et al., 2013; COSTA et al., 2011).

Em reações assistidas por micro-ondas, o superaquecimento também pode contribuir com a redução da energia de ativação, devido à interação direta do campo elétrico com as moléculas específicas do meio, sendo que a polaridade do sistema é alterada durante o progresso da reação, resultando assim num aumento da reatividade e diminuição energia de ativação. Além disso, o efeito do micro-ondas será mais pronunciado quanto maior for a polaridade de uma molécula (tal como o solvente) contribuindo para o aumento da velocidade de reação (GUDE et al., 2013).

Na produção de biodiesel assistida por micro-ondas o uso de etanol como agente acilante é uma boa alternativa, visto que sua polaridade permite uma rápida absorção da radiação alterando a estrutura da interface entre o etanol e o óleo, fazendo com que os grupos funcionais do meio também fiquem reativos (DA RÓS et al., 2012; LERTSATHAPORNUSUK et al., 2008). A irradiação de micro-ondas também pode aumentar a velocidade da emulsificação, o que resulta em um transporte acelerado dos reagentes ou produtos devido ao maior contato entre a enzima e o substrato, e, portanto, a velocidade de reação aumenta. Além disso, a enzima torna-se mais ativa, em virtude de uma mudança na sua conformação facilitando a interação do substrato com o seu sítio ativo

De acordo com a Tabela 4.13 pode-se constatar que a etanólise do óleo de *M. circinelloides* URM 4182 atingiu 98,83 % m/m $\pm$ 0,08 de conversão em apenas 14h quando a reação de transesterificação foi efetuada sob aquecimento por irradiação de micro-ondas (reator Discover), enquanto que, sob aquecimento convencional uma conversão de 93% foi obtida somente em 96h de reação, o que representa um incremento de aproximadamente 7 vezes na velocidade da reação. Desta forma, verifica-se que a aplicação de micro-ondas na etanólise enzimática do óleo de *M. circinelloides* URM 4182 foi procedimento potencial para a produção de biodiesel, permitindo alcançar rendimentos de reação satisfatórios em um menor período de tempo.

Os resultados obtidos são similares aos descritos por Da Rós e colaboradores (2010) que realizaram um estudo comparativo da etanólise do óleo de palma efetuada sob

aquecimento não convencional e sob aquecimento de micro-ondas e constataram que a aplicação de micro-ondas na etanólise enzimática do óleo de palma alcançou conversão total dos triacilgliceróis em ésteres etílicos em 12h de reação, enquanto que, a etanólise conduzida sob aquecimento convencional alcançou em torno de 60% somente após 24h de reação.

Da Rós e colaboradores (2011) estudaram a etanólise enzimática de sebo bovino sob irradiação de micro-ondas e sob aquecimento convencional, e constataram que a etanólise sob aquecimento convencional atingiu uma conversão completa dos ácidos graxos do sebo bovino em ésteres etílicos em 48 h, enquanto que, a mesma reação realizada sob aquecimento de micro-ondas atingiu o mesmo rendimento em 8h.

Neste estudo também foi proposto a transesterificação direta da biomassa seca de *M. circinelloides* URM4182 (Método 3) realizada em duplicata conduzida em uma única fase, sem a prévia extração do lipídio em reator pressurizado (Modelo Paar, 0,5L). Após 4h de reação, o produto obtido apresentou elevado teor de conversão do óleo microbiano em ésteres etílicos (97 % m/m $\pm$ 0,6). De acordo com as análises de RMN H^1 (Figura 4.27) e CLAE (Tabela 4.13) verifica-se satisfatórios rendimentos em ésteres etílicos e baixos teores de mono- e diacilgliceróis residuais comprovando a eficácia do processo de transesterificação. Os resultados sugerem que a produção de biodiesel por transformação direta da biomassa fúngica sem a etapa intermediária de extração de lipídios é tecnicamente viável. Além disso, os resultados obtidos sugerem que o processo proposto é economicamente benéfico, uma vez que tem algumas vantagens em relação aos métodos convencionais, tais como redução do tempo de operação e dos gastos de energia.

Na literatura podem ser encontrados diversos trabalhos que elucidam o uso da transformação direta da biomassa de microrganismos oleaginosos em biodiesel alcançando elevados rendimentos de reação (MARWAN; SUHENDRAYATNA; INDART, 2015; CUI et al., 2014; JOHSON; WEN, 2009). Vicente e colaboradores (2009) em particular, estudaram a produção de biodiesel por transformação direta de biomassa *M. circinelloides* sem a prévia extração de lipídios utilizando metanol como agente acilante e catalisadores ácidos homogêneos. Este estudo mostrou que o método direto produziu elevados rendimentos em ésteres metílicos (> 99%) nas reações mediadas por todos os três catalisadores testados (BF_3 , H_2SO_4 e HCl).

O elevado rendimento alcançado em todos os processos de etanólise do óleo de *M. circinelloides* URM4182 foi confirmado pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear

Protônica (Figura 4.26), que mostrou a elevada conversão do lipídio microbiano em ésteres etílicos, uma vez que o espectro apresentou o quarteto em 4,1 ppm referente ao desdobramento do pico correspondente ao hidrogênio metilênico presente na estrutura dos ésteres etílicos (Paiva et al. 2013). Este valor também foi confirmado pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que quantificou os teores de mono-, di- e triacilgliceróis (Tabela 4.13).

Figura 4.26. Espectro de RMN ^1H : a) lipídio de *Mucor circinelloides* URM 4182; Produto da etanólise do lipídio de *M. circinelloides* URM 4182 obtido a partir do Método 1 (b); Método 2 (c) e Método 3(d)

Fonte: própria

Tabela 4.13. Propriedades dos ésteres etílicos de SCO de *Mucor circinelloides* URM 4182

Rendimentos	Ésteres etílicos		
	Transesterificação		
	Método 1	Método 2	Método 3
Ésteres etílicos (%m/m)	93,5±0,05	98,83±0,08	98,20±0,06
Monoacilglicerol (%m/m)	4,2	0,93	1,9
Diacilglicerol (%m/m)	2,8	0,24	0,6

Fonte: própria

No produto obtido a partir dos diferentes métodos de etanólise do lipídio de *M. circinelloides* URM 4182, os teores de monoacilgliceróis e diacilgliceróis (Tabela 4.13) obtidos foram superiores aos limites mínimos estabelecidos pela ANP (2014) da ordem 0,80 e 0,20 % m/m, respectivamente. Geralmente, a presença de glicerídeos que não reagiram, reduz a qualidade do produto final, uma vez que estes compostos aumentam a turbidez e a viscosidade do produto. Entretanto, a baixa concentração destes glicerídeos residuais e a ausência de triacilgliceróis no biodiesel obtido a partir do óleo de *M. circinelloides* URM 4182 mostraram a eficiência dos métodos de conversão dos triacilgliceróis em ésteres etílicos e também devido à seletividade dos catalisadores testados no presente estudo.

Os resultados obtidos sugerem que a transesterificação direta da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182 é uma abordagem eficaz que deve ser melhor explorada utilizando outros tipos de catalisadores e sistemas aquecidos por irradiação de micro-ondas.

4.3.9. Caracterização do lipídio e biodiesel de *M.circinelloides* URM4182 por meio de espectroscopia vibracional na região do infravermelho por FTIR

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) tem sido um método bem aplicado para estudar e caracterizar a natureza dos compostos químicos presentes nas matérias-primas lipídicas e derivados. Esta metodologia é baseada nas diferenças dos espectros na faixa de 4000-400 cm^{-1} , sendo muito empregada na identificação dos grupos funcionais e bandas correspondentes as vibrações dos estiramentos e flexões nas amostras das matérias-primas lipídicas. Embora a literatura apresente vários trabalhos que estudam os componentes dos óleos vegetais e microbianos por meio da técnica de FTIR (DA ROS

et al, 2014), não existem ainda estudos que relatam o uso desta técnica para análise do óleo da estirpe de *M. circinelloides*.

No espectro do material lipídico extraído de *M. circinelloides* URM 4182 (Figura 4.27) observa-se uma ligeira vibração em 3556 cm^{-1} , esta região é referente ao estiramento do componente -OH (banda 1), que pode se referir a uma pequena quantidade de água na amostra em virtude da umidade, portanto não se refere a um componente da estrutura do lipídio microbiano. A vibração em 3002 cm^{-1} no espectro é atribuída ao estiramento CH relacionado com a ligação C-H= (banda 2). A vibração em 2956 cm^{-1} (banda 3) é referente ao estiramento assimétrico de um grupo CH_3 . As duas bandas intensas em 2921 cm^{-1} (banda 4) e 2850 cm^{-1} (banda 5) surgem em virtude da deformação angular simétrica e assimétrica do grupo CH_2 conhecidas como scissors e rockin respectivamente (MAHAMUNI; ADEWUYI, 2009; ALBUQUERQUE et al., 2008).

A banda a 1744 cm^{-1} (banda 6) é atribuída ao alongamento dos grupos carboxílicos C=O. Lie Ken Jie e colaboradores (1981) observaram a partir da espectroscopia de infravermelho que esta banda representa todos os ésteres de ácidos graxos do grupo C18. Em 1655 cm^{-1} (banda 7) observa-se uma banda muito fraca, o que é atribuído ao alongamento de um grupo C = C. Em 1464 cm^{-1} (banda 8), observa-se uma banda que é atribuído a deformação do CH_2 scissors. A região entre $1290\text{-}1040\text{ cm}^{-1}$ (banda 9) representa os ácidos graxos que tem a fórmula $(\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_n \text{COOH})$, tais como o ácido mirístico (C14) e palmítico (C16), por exemplo. A banda a 722 cm^{-1} (banda 10) é observada no espectro de ácidos graxos e de triacilgliceróis e representa CH_2 rocking (MAHAMUNI; ADEWUYI, 2009; ALBUQUERQUE et al., 2008).

Figura 4.27. Espectro do infravermelho do lipídio *M. circinelloides* URM 4182

Fonte: própria

De acordo com a Tabela 4.14 observa-se que o lipídio de *M. circinelloides* URM4182 é muito semelhante às fontes lipídicas alternativas que são explorados na produção de biodiesel.

Este resultado não só indica a pureza do óleo microbiano, visto que as bandas apresentadas no espectro de infravermelho são características de óleos vegetais e confirmam a composição em ácidos graxos descrita na Tabela 4.9, mas também o torna promissor para uso como matéria-prima lipídica na produção de biodiesel.

A técnica de espectroscopia de infravermelho tem-se mostrado como um método versátil para determinar a qualidade do biodiesel (MARWAN; SUHENDRAYATNA; INDARTI, 2015; GUZZATTO et al., 2012; TARIQ et al., 2011; MAHAMUNI; ADEWUYI, 2009).

Tabela 4.14. Comparação das bandas de infravermelho do óleo *Mucor circinelloides* URM 4182 com bandas de óleos vegetais alternativos explorados para a produção de biodiesel

Bandas	Óleos			Referência
	<i>Mucor circinelloides</i> (cm ⁻¹)	Babaçu* (cm ⁻¹)	Andiroba* (cm ⁻¹)	
1	3479	3478	***	Estiramento do OH
2	3002	3007	3005	Estiramento do (=C-H)
3	2956	2955	2953	Estiramento assimétrico do CH ₃
4	2921	2922	2923	Estiramento assimétrico do CH ₂
5	2850	2854	2854	Estiramento simétrico do CH ₂
6	1741	1743	1741	Estiramento do (C=O)
7	1658	1664	1657	Estiramento do (C=C)
8	1466	1464	1463	Deformação angular simétrica do CH ₂
9	1040-1290	1040-1290	1040-1290	C=C-C-O
10	722	722	722	Deformação angular assimétrica do CH ₂

Fonte: Adaptado de (ALBUQUERQUE et al., 2003)

A Figura 4.28 mostra que os espectros na região de infravermelho do óleo de palma e do biodiesel obtido a partir desse óleo são muito semelhantes, uma vez que a reação de transesterificação não causa uma alteração significativa dos componentes químicos ou funcionais do óleo. Os espectros de infravermelho do óleo de origem e do biodiesel mostraram bandas referentes a carbonila (C = O) em 1744 cm⁻¹ e o de CO em 1163 cm⁻¹, o que indica que estes grupos estão presentes nos óleos e se mantêm após a reação de

transesterificação. As vibrações do alongamento de CH, CH₂, CH₃, aparecem em 3003, 2854, e 2922 cm⁻¹, respectivamente, enquanto que as vibrações de desdobramento de CH₂ são encontradas em 1375, 1163 e 723 cm⁻¹, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos relatados na literatura (GUZATTO et al., 2012; TARIQ et al., 2011).

Alguns picos do espectro de infravermelho são específicos de biodiesel e podem ser eventualmente identificados com a observação ampliada do espectro, conforme ilustrado na Figura 29. No espectro do biodiesel de óleo de palma é possível observar uma banda em 1435 cm⁻¹ que não está presente no espectro do óleo de palma, que representa o grupo éster, confirmando o resultado da transesterificação. Tahvildari e Mohammadi, (2014) estudaram a produção de biodiesel a partir de óleo de linhaça e relataram o deslocamento dos picos de absorção da amostra de óleo que estavam em 1744 e 1162 cm⁻¹ para 1739 e 1178 cm⁻¹, respectivamente, na amostra de biodiesel.

Figura 4.28. Espectro na região do infravermelho, do óleo e do biodiesel de palma

Fonte: (MARWAN; SUHENDRAYATNA; INDARTI, 2015)

Na Figura 4.29 foi comprovada a formação de ésteres a partir da transesterificação de SCO de *M. circinelloides* URM 4182, visto que é possível notar uma ligeira diferença nos espectros do infravermelho do lipídio microbiano (Figura 4.27) e dos ésteres etílicos correspondentes obtidos a partir dos Métodos 1, 2 e 3, em virtude de apresentar uma vibração em 1435 cm^{-1} (Figura 4.29).

Figura 4.29. Espectro na região do infravermelho das amostras de biodiesel obtidas do lipídio de *M.circinelloides* pelo Método 1 (—); Método 2 (—); Método 3 (—).

Fonte: própria

No produto obtido pelo Método 2 foi possível observar o pico atribuído aos ésteres e o espectro não apresentou vibrações referentes a compostos indesejáveis formados devido ao calor gerado pelo efeito de micro-ondas. Da mesma forma o espectro do produto obtido pelo Método 3 também não apresentou nenhum composto indesejável referente a possíveis resíduos de biomassa fúngica.

4.4. Propriedades das amostras de biodiesel obtidas

A qualidade do biodiesel está diretamente relacionada ao perfil de ácidos de óleo usado como matéria-prima para a sua produção. Algumas das características estruturais que influenciam nas propriedades do biocombustível são: o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações nas moléculas de ácidos graxos (KNOTHE et al., 2003). Sendo assim, para um bom funcionamento nos motores, é necessário analisar e conhecer as propriedades físicas e químicas do biodiesel. A padronização do biodiesel é estabelecida por normas, dentre as quais se destacam e são mais utilizadas: ASTM D6751

(American Society for Testing and Materials - Estados Unidos), EN 14214 (European Norm - Europa) e ANP255 (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - Brasil) (KNOTHE et al., 2006).

A análise destas características são fatores determinantes para a obtenção de um biocombustível de alta qualidade, sendo que as análises químicas e físicas são conduzidas por metodologias variadas, de modo a verificar a qualidade do biodiesel, tais como: número de cetano, calor de combustão, viscosidade, ponto de névoa, ponto de fluidez, entre outras (KNOTHE et al., 2006).

Algumas propriedades referentes à qualidade do biodiesel obtido a partir do óleo de *M. circinelloides* URM 4182 foram estimadas por modelos empíricos tomando por base a composição em ácidos graxos e as equações propostas por Talebi; Tabatabaei; Chisti, 2014. Esta metodologia permite efetuar uma análise preliminar sobre a viabilidade de uma determinada matéria-prima para a produção de um biodiesel que atenda completamente as especificações de qualidade. Os resultados são mostrados na Tabela 4.15.

O número de cetano do biodiesel pode variar amplamente com base em diferenças na composição de ácidos graxos, comprimento da cadeia e nível de saturação. Valores de elevados do número de cetano são observados para os ésteres de ácidos graxos (VARATHARAJAN; CHERALATHAN, 2012). É também claro que o número de cetano tem uma correlação com o grau de insaturação. Neste estudo, o número de cetano foi estimado em 54 nas misturas de ésteres etílicos de obtidos da transesterificação do óleo de *M. circinelloides* URM4182 (Tabela 4.15). Estes valores estão de acordo com as normas para o biodiesel que prescrevem um mínimo de 47 (ASTM D6751) ou 51 (EN 14214) (KNOTHE, 2005). O baixo número de cetano está associado com o grau de insaturação do lipídio de *M. circinelloides* URM4182, visto que o biodiesel obtido a partir desse óleo é composto em sua maioria por ácidos graxos insaturados, tais como: ésteres de ácido linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) (VARATHARAJAN; CHERALATHAN, 2012). De acordo com Knothe et al. (2003), números elevados de cetano foram encontrados para os ésteres de ácidos graxos saturados, tais como: ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), como é o caso do biodiesel de óleo de palma (matéria-prima rica nestes ácidos graxos).

Tabela 4.15. Parâmetros de qualidade do biodiesel a partir de *M. circinelloides* URM 4182 estimados por modelos empíricos.

Parâmetro	Resultado
Índice de Saponificação (IS) (mg KOH/g)	205
Índice de Iodo (II) g(I ₂)/100 g	84
Grau de insaturação (GI) %	82
Fator de comprimento de cadeia (FCC) %	11
Ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF) °C	17
Índice de cetano (IC)	54

Fonte: própria

Com relação ao índice de iodo, a norma EM 14214, uma das mais rigorosas nesse quesito, requer um valor máximo de 120 g(I₂)/100 g (biodiesel) e o valor de 84 estimado encontra-se num patamar bastante seguro.

Os valores de ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF), determinados com base na quantidade de ácidos graxos saturados de cadeia longa (a partir do C16) presentes no lipídio de *M. circinelloides* URM4182, foi satisfatório, visto que o valor estimado de 17 °C é inferior ao estabelecido pelas normas brasileiras, que determina como valor máximo 19°C de acordo com Resolução ANP, n° 45 25.8.2014.

Diante dos resultados obtidos, o óleo de *M. circinelloides* URM 4182 mostra um excelente potencial para produção de biodiesel que atende aos requisitos necessários referentes ao índice de iodo, ponto de entupimento de filtro a frio e número de cetano.

4.5. Pesquisas exploratórias para trabalhos futuros

4.5.1. Cultivo de *M. circinelloides* URM 4182 para a produção de biomassa celular em pellets

Muitos fungos filamentosos podem crescer sob a forma de pequenos grânulos esféricos de hifas entrelaçadas. Esta técnica pode ser útil nos processos de fermentação, por diversas razões, visto que resultados de crescimento de células pelletizadas diminuem a viscosidade do caldo fermentativo, melhoram a aeração, a agitação e a transferência de calor. Além disso, a pelletização oferece outras vantagens, tais como aumenta o desempenho nas propriedades de mistura e de transferência de massa. A biomassa também

pode ser facilmente separada do meio e permite o reuso das células (XIA; HEI; HU, 2014; NYMAN et al., 2013; XIA et al., 2011).

O cultivo realizado segundo metodologia descrita por Xia et al. (2011) (Meio B), iniciou com o pH em torno de 3,0 e após 18h de cultivo foi adicionado CaCO_3 (carbonato de cálcio 0,4 g / 100 mL) como recomendado, a fim de controlar o pH do meio de cultivo em torno de 5,0. Na Figura 4.30, são ilustradas as fotografias do acompanhamento da formação de células durante 120 h de cultivo.

Figura 4.30. Cultivo de *M. circinelloides* URM 4182 em shaker orbital utilizando metodologia descrita por Xia et al., 2011

Fonte: própria

Pode-se observar um baixo crescimento celular nas primeiras 12 h de cultivo, sendo que neste período o pH se encontrava em torno de 3,0. Em 18 h de cultivo CaCO_3 foi adicionado e ocorreu a formação de pellets. A adição de CaCO_3 no meio facilitou formação dos pellets, este fato tem sido amplamente estudado em recentes publicações (NYMAN et al., 2013; XIA et al., 2011). Na Figura 4.32 também é possível observar uma maior formação de pellets no cultivo de 120h.

Na Figura 4.31 são plotadas as curvas do perfil de crescimento celular e de consumo de glicose, bem como da produção de lipídio a partir dos cultivos em shaker orbital utilizando o meio de cultura “B”, em função do tempo de cultivo.

Observando o gráfico (Figura 4.31) pode-se supor que a produção de lipídios está associada ao crescimento do fungo, visto que conforme ocorre o crescimento da biomassa aumenta o acúmulo de lipídio.

Figura 4.31. Perfil de concentração de biomassa (■) e consumo de glicose (●) durante a produção de lipídio (▲) pelo fungo de *Mucor circinelloides* URM 4182: a) cultivo em meio A; b) cultivo em meio B

Fonte: própria

No cultivo efetuado em meio “B”, verifica-se que a concentração de biomassa e o consumo de glicose aumentou rapidamente nas primeiras 48 h, observa-se ainda que o microrganismo continuou crescendo até o final do período de 120 h, no entanto, não houve esgotamento do substrato no período total de experimentação. Aparentemente, a conversão de glicose em biomassa foi limitada pelas condições adversas de pH durante o crescimento. Estes resultados foram similares aos observados por Xia e colaboradores (2011) em cultivos conduzidos com *Mucor circinelloides* ATCC1216B. Esses mesmos autores relatam que a redução do pH provavelmente devido a alguma excreção de ácidos desconhecidos pela cultura, influenciou significativamente no crescimento de células de *Mucor circinelloides* ATCC1216B.

Embora, o baixo pH tenha inibido significativamente o crescimento de células, o rendimento de lipídico foi superior a 20% em 120h de cultivo (Tabela 4.16). No presente trabalho, a formação de pellets permitiu a fácil separação da biomassa do meio de cultivo melhorando assim o tempo de extração e produção de lipídio, no entanto, o cultivo B mostrou-se pouco eficaz para a produção de biomassa de *Mucor circinelloides* URM 4182, uma vez que apresentou baixos valores de conversão de glicose em biomassa $Y_{(X/S)}$ e produtividade de biomassa (Q_X), 0,06 g/g glicose e 0,01 g/L/h (Tabela 4.16), respectivamente.

Embora Xia et al. (2011) tenham reportado valores mais elevados de concentração de lipídio (30%, m/m) e conversão de glicose em biomassa ($Y_{(X/S)}=1,25$ g/L) os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o cultivo de *M. circinelloides* URM 4182 na forma de células pelletizadas deve ser melhor estudado. Além disso, esta estratégia poderá acarretar vantagens nos processos de produção de lipídios para biocombustíveis, visto que os produtos finais da fermentação podem ser separados por métodos simples como filtração, que é um método muito mais fácil e de menor custo do que os comumente utilizados, tais como a centrifugação. Deste modo, trabalhos futuros podem ser propostos visando utilizar componentes que induzam a formação de pellets bem como nutrientes que induzam o elevado acúmulo de lipídios, aumentando desta forma a potencialidade do uso de células pelletizadas para a produção de SCO.

Tabela 4.16. Parâmetros bioquímicos do cultivo de *Mucor circinelloides* URM 4182 em shaker (Meio de Cultivo “B”).

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Glicose (g/L)	Lipídio (%, m/m biomassa)	Y _{X/S} (g/g glicose)	Y _{P/S} (g/g glicose)	Q _X (g/L.h)	Q _P (g/L.h)	Q _X (g/L.dia)	Q _P (g/L.dia)	Q _S (g/L.h)
0	0	20,44±0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0,38±0,001	18,31±0,01	4,51±0,36	0,18±0,001	0,01±0,001	0,03	0,75	1,04	0,03	0,18
24	0,58±0,001	15,65±0,02	10,29±0,27	0,12±0,001	0,01±0,001	0,02	0,58	0,62	0,06	0,19
48	0,71±0,01	12,06±0,01	16,23±0,49	0,09±0,001	0,01±0,001	0,01	0,36	0,33	0,06	0,17
72	0,87±0,002	10,54±0,03	20,32±0,39	0,08±0,001	0,02±0,001	0,01	0,29	0,29	0,05	0,14
96	0,89±0,002	7,47±0,05	22,70±0,18	0,07±0,001	0,02±0,001	0,01	0,23	0,22	0,05	0,14
120	0,93±0,01	6,39±0,01	25,15±0,13	0,06±0,001	0,02±0,001	0,01	0,19	0,19	0,05	0,12

Q_x = produtividade volumétrica da biomassa; Q_p = produtividade volumétrica do lipídio; Q_s = velocidade volumétrica de consumo de substrato

Fonte: própria

4.5.2. Cultivo de *M. circinelloides* URM 4182 para a produção de lipídio utilizando diferentes fontes de carbono

O óleo microbiano acumulado pelas células fúngicas é uma matéria-prima potencial para produção de biodiesel. No entanto, os altos custos nos processos de fermentação para a obtenção de SCO podem ser limitantes para aplicação industrial dos óleos microbianos (HUANG et al., 2015; LIANG; JIANG, et al., 2015; PAPANIKOLAOU et al., 2011).

Geralmente para o cultivo de fungos com concomitante acúmulo de lipídio são utilizadas fontes de carbono convencionais, tais como (sacarose, glicose, frutose, xilose, amido de milho e etc.). Essas fontes de carbono convencionais são os melhores substratos para a biossíntese de ácidos graxos pelos microrganismo, no entanto, a introdução de fontes de carbono alternativas como resíduos agrícolas e industriais apresentam vantagens em virtude da sua grande disponibilidade e baixo custo, uma vez que a fonte de carbono é responsável por uma grande parte dos custos de produção de lipídio (LIANG; JIANG, 2015; REIS et al., 2014).

No presente trabalho, visando avaliar o potencial do fungo *M. circinelloides* URM 4182 para produzir lipídios foram elaborados meios líquidos sintéticos com diferentes fontes de carbono, tais como sacarose, xilose, frutose, amido de milho, etanol e glicerol, todos adquiridos comercialmente. Essas fontes de carbono foram selecionadas como substratos, devido ao seu conhecido potencial para a produção de lipídio microbiano descrito na literatura (PAPANIKOLAOU et al., 2011; VICENTE et al., 2010; BOTHA et al., 1997; REIS et al., 2014). Além disso, estas fontes de carbono se encontram disponíveis em grandes quantidades nos resíduos agroindustriais como o melaço de cana-de-açúcar e materiais lignocelulósicos (HUANG et al., 2015).

O melaço obtido a partir de cana-de-açúcar ou de beterraba, é um subproduto industrial de fabricação de açúcar. Geralmente, o melaço contém frutose, sacarose, glicose e por conseguinte, é considerado uma matéria-prima ideal para formulações de meio de cultura de baixo custo e o seu uso é bastante elucidado na literatura, visto que é amplamente utilizado na indústria de fermentação para a produção de etanol. As fontes de biomassa lignocelulósica, como palha, bagaço, e sabugo de milho são também de baixo custo e relativamente fáceis de adquirir, o que indica que essas matérias-primas apresentam potencial para a industrialização da produção SCO. Atualmente, a biomassa lignocelulósica que é utilizado para a produção de SCO inclui, essencialmente, hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz, casca de arroz, palha de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (HUANG et al., 2015).

Todas as fontes de carbono testadas no presente trabalho foram assimiladas pelo *M. circinelloides* URM4182, proporcionando diferentes percentuais de lipídio, obtendo resultados que variaram de 4 a 18% (g lipídio/g de biomassa) (Tabela 4.17). É importante observar que a espécie fúngica utilizada assimilou bem os açúcares sacarose, xilose, frutose e o polissacarídeo, amido solúvel e no entanto, apresentou baixa assimilação dos álcoois etanol e glicerol, estes resultados são similares aos encontrados por Botha et al., (1997). Estes autores estudaram o crescimento de *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* CBS108.16 em meios sintéticos contendo diferentes fontes de carbono e constataram que o fungo foi capaz de crescer em todas as aldoses que apresentam a mesma configuração de átomo de carbono assimétrico. Em relação à assimilação de polissacarídeos o fungo também foi capaz de crescer utilizando amido solúvel. No entanto, o etanol não foi assimilado, visto que a capacidade de assimilar álcool primário de cadeia curta como única fonte de carbono, não é amplamente encontrada entre as espécies de fungo. Por fim, os autores também constataram que o fungo em questão não assimila polióis com três ou quatro átomos de carbono, assim como o glicerol, isso explica os baixos rendimentos de produção de lipídio.

Na Tabela 4.17 é possível observar que o cultivo utilizando frutose e xilose forneceram concentrações mais elevadas de lipídios (>17%, m/m) em relação as demais fontes de carbono testadas. Estes resultados se assemelham aos descritos por Reis et al., (2014) que estudaram a produção de lipídio por *Mucor circinelloides* (ATCC1216B) cultivado em diferentes fontes de carbono incluindo glicose, frutose, manose, galactose e xilose. Os autores constataram que embora a glicose seja o açúcar mais utilizado no crescimento de biomassa para a produção de lipídio, os demais açúcares testados em especial a xilose podem ser usados como fontes de carbono. Além disso, os autores também cultivaram a mesma espécie de fungo em hidrolisado de palha de milho com elevada quantidade de xilose (22,29 g/L) alcançando uma concentração de lipídio de 29,10% m/m. Portanto, conclui-se que os co-produtos dos processos agrícolas e industriais que apresentarem as fontes de carbono testadas no presente trabalho em suas composições, são fortes candidatos para serem utilizadas como substrato alternativo viável e de menor custo para produzir SCO, visando a competitividade com outros processos industriais de produção de combustíveis.

Tabela 4.17. Parâmetros bioquímicos do cultivo de *Mucor circinelloides* URM 4182 em shaker utilizando diferentes fontes de carbono (120h)

Fonte de Carbono	Biomassa (g/L)	Lipídio (% g/g biomassa)	Q _x (g/L.h)	Q _p (g/L.h)	Q _x (g/L.dia)	Q _p (g/L.dia)
Amido solúvel	6,87±0,01	13,27±0,06	0,29±0,01	0,038±0,01	1,72±0,01	0,28±0,01
Sacarose	6,05±0,06	12,12±0,01	0,25±0,01	0,031±0,01	1,51±0,01	0,18±0,01
Frutose	5,01±0,01	18,60±0,02	0,20±0,01	0,039±0,01	1,25±0,01	0,23±0,01
Xilose	5,51±0,02	16,72±0,01	0,22±0,01	0,038±0,01	1,38±0,01	0,23±0,01
Etanol	0,23±0,05	4,18±0,02	0,01±0,01	0,001±0,01	0,06±0,01	0,004±0,01
Glicerol	0,78±0,01	12,69±0,01	0,03±0,01	0,004±0,01	0,20±0,01	0,025±0,01

Q_x = produtividade volumétrica da biomassa; Q_p = produtividade volumétrica

Fonte: própria

4.6. Conclusões

O principal objetivo desta etapa do trabalho foi produzir e avaliar o óleo microbiano (SCO) de *Mucor circinelloides* como matéria-prima lipídica na síntese de biodiesel via catálise heterogênea. Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios e nesse conjunto de dados pôde-se concluir que:

- Entre os métodos de extração de lipídios da biomassa do fungo *M. circinelloides* URM 4182 testados, a extração com etanol assistida por micro-ondas a 60 °C mostrou-se promissora para sua aplicação em processos produtivos, uma vez que a radiação eletromagnética promovida pelo reator de micro-ondas permitiu a rápida obtenção de lipídios com um solvente polar de baixo custo, ambientalmente seguro e de fácil recuperação e que atende aos conceitos de “*green extraction*”.
- O total de lipídio extraído da biomassa obtida de *M. circinelloides* URM 4182 nos cultivos efetuados em diferentes meios de cultura foi superior a 20% caracterizando esta linhagem como microrganismo oleaginoso e, portanto, sendo uma fonte potencial de matéria-prima para a produção de biodiesel.
- Entre os meios de cultivo testados e sistemas de fermentação avaliados, o melhor desempenho foi alcançado no cultivo efetuado em biorreator contendo 40g/L glicose e 5% de milhocina como fonte de nutrientes. Nessas condições foram obtidas concentrações de biomassa 15,5 g/L contendo 31,2% de lipídios, o que corresponde a uma produtividade lipídica de 0,97 g/L. dia. Esses resultados indicam que a milhocina pode ser utilizada como potencial fonte de nutrientes na formulação de meios para a produção de lipídios.
- O perfil em ácidos graxos do óleo de *M. circinelloides* URM 4182 revelou elevadas porcentagens de ácidos graxos saturados como o ácido palmítico (C16), monoinsaturado como o ácido oleico (C18) e poli-insaturados como o ácido linoleico (C18:2) e GAMA-linolênico (C18:3). O percentual dos diferentes ácidos graxos presentes no óleo de *M. circinelloides* URM 4182 sofreu variação de acordo com o meio de cultura utilizado para produzir biomassa, bem como do método de extração do lipídio.

- Independente do catalisador utilizado, a síntese de biodiesel a partir do lipídio da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182 apresentou resultados promissores e rendimentos em ésteres de etila superiores a 93%.
- Na comparação da síntese enzimática usando Novozym 435 como catalisador sob aquecimento convencional e irradiação de micro-ondas, os resultados indicaram que a irradiação de micro-ondas reduziu significativamente o tempo da reação de síntese de biodiesel quando comparado ao aquecimento convencional, resultando em rendimentos elevados (98%) em menores tempos reacionais e produtividade 7 vezes maior.
- Na transesterificação direta da biomassa de *M. circinelloides* URM4182 mediado pelo catalisador heterogêneo químico (alumina impregnada com $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), o produto obtido apresentou elevado teor de conversão do óleo microbiano em ésteres etílicos (97 %) em 4h de reação. Os resultados sugerem que a produção de biodiesel por transformação direta da biomassa fúngica sem a etapa intermediária de extração de lipídios é tecnicamente viável, o que representa um ponto de partida para estudos destinados a avaliar o desenvolvimento deste processo.
- Os parâmetros estimados por modelos teóricos, visando à predição da qualidade do biodiesel, tais como: número de cetano: 54; índice de saponificação: 205; índice de iodo: 84; grau de insaturação: 82; fator de comprimento da cadeia: 11 e ponto de entupimento de filtro a frio: 17 estão dentro dos limites estabelecidos pelas normas internacionais.

Referências

- AGGELIS, G.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S.; PAPADOPOULOS, G. A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. I. Lipid accumulation during growth of *Mucor circinelloides* CBS 172-27 on a vegetable oil. **Gracas y Aceites**, v. 46, p. 169-173, 1995.
- AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A.; MYERS, G.; KIRK, K. An overview of biomechanical pulping research. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M. (Ed.). *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. NY: John Wiley and Sons; 1998. p. 309–83.
- ALBUQUERQUE, M. L. S.; GUEDES, I.; ALCANTARA JR., P.; MOREIRA, S. G. C. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. **Vibrational Spectroscopy**, v. 33, p. 127–131, 2003.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) Boletim mensal do Biodiesel. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>> Acesso em: 08 de agosto de 2015
- ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; WASIAK, M. P.; RZYSKA M.; BINKOWSKA N.; BIELECKI, S. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1214-1222, 2006.
- AOCS AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th ed. Champaign: AOCS, 2004.
- ARJUNA, A. Production of polyunsaturated fatty acids by fungi: a Review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 5, p. 931-954, 2014.
- ASBAHANI, A. EL.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E. H.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. EL; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220–243, 2015.
- ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012.
- BALASUBRAMANIAN, L.; SUBRAMANIAN, G.; NAZEER, T. T.; SIMPSON, H. S.; RAHUMAN, S. T.; RAJU, P. Cyanobacteria cultivation in industrial wastewaters and biodiesel production from their biomass: a review. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 59, p. 220-225, 2012.
- BAUTISTA, S.; NARVAEZ, P.; CAMARGO, M.; CHERY, O.; MOREL, L. Biodiesel-TBL+: A new hierarchical sustainability assessment framework of PC&I for biodiesel production – Part I. **Ecological Indicators**, v. 60, p. 84-107, 2016.

BELLOU, S.; MOUSTOGIANNI, A.; MAKRI, A.; AGGELIS, G. Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by Zygomycetes grown on glycerol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 146–158, 2012.

BELLOU, S.; TRIANTAPHYLLOIDOU, I. E., AGGELI, D., ELAZZAZY, A. M.; BAESHEN, M. N.; AGGELIS, G. Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 24–35, 2016.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHEA, R.; URIBELARREA, J-L.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J-M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v.48, p. 375-787, 2009.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J-M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1193-1206, 2011.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOER, K.; MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A.; BAHRI, P. A. Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 1681-1698, 2012.

BORUGADDA, V. B.; GOUD, V. V. Biodiesel production from renewable feedstocks: status and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 4763-4784, 2012.

BOTHA, A.; KOCK, J. L. F.; COETZEE, D. J.; BOTES, P. J. Physiological properties and fatty acid composition in *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.71, p. 201–206, 1997.

BOTHAM, P. A.; RATLEDGE, C. Metabolic studies related to lipid accumulation in yeast. **Biochemical Society Transactions**, v. 6, p. 383-385, 1978.

BOTHAM, P.; RATLEDGE, C. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous microorganisms. **Journal of General Microbiology**, v. 114, p. 361–375, 1979.

BOULTON, C.; RATLEDGE, C. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: citrate lyase. **Microbiology**, v. 127, p. 169–176, 1981.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

CARRERO, A.; VICENTE, G.; RODRÍGUEZ, R.; DEL PESO, G. L., SANTOS, C. Synthesis of fatty acids methyl esters (FAMES) from *Nannochloropsis gaditana* microalga using heterogeneous acid catalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, 119-124, 2015.

CARRERO, A.; VICENTE, G.; RODRÍGUEZ, R.; LINARES, M.; DEL PESO, G. L.; Hierarchical zeolites as catalysts for biodiesel production from is microalga oil. **Catalysis Today**, v.167, p. 148–153, 2011.

CARVALHO, A. K. F.; DA RÓS, P. C. M.; TEIXEIRA, L. F.; ANDRADE, G. S. S.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 485–493, 2013.

CERTIK, M.; ANDRASI, P.; SAJBIDOR, J. Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing gamma linolenic acid extracted from fungi. **Journal American Oil Chemical Society**, v. 73, p. 357-363, 1996.

CERTÍK, M.; ADAMECHOVÁ, Z.; GUOTHOVÁ, L. Simultaneous enrichment of cereals with polyunsaturated fatty acids and pigments by fungal solid state fermentations. **Journal of Biotechnology**, v.168, p. 130– 134, 2013.

CERTIK, M.; BALTESZOVA, L.; SAJBIDOR, J. Lipid formation and g-linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 101-105, 1997.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 1-14, 1999.

CHEMAT, F.; LUCCHESI, M. E.; SMADJA, J.; FAVARETTO, L.; GOLNAGHI, G.; VISINONI, F. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: a rapid, clean and environmentally friendly approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 157–160, 2006.

CHEMAT, F.; VIAN, A. V.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8615-8627, 2012.

CHEN, H.; HAO, G.; WANG, L. ; WANG, H.; GU, Z.; LIU, L.; CHEN, W.; CHEN, Y. Q. Identification of a critical determinant that enables efficient fatty acid synthesis in oleaginous fungi. **Scientific Reports**, v. 5, 11247; doi: 10.1038/srep11247 2015a.

CHEN, C. L.; HUANG, C. C.; HO, K. C.; HSIAO, P. H.; WU, M. S.; CHANG, J. S. Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet extraction/transesterification and direct transesterification processes. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 179-186, 2015 (b).

CHRISTOPHE, G.; KUMAR, V.; NOUAILLE, R.; GAUDET, G.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCE, C. Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 29-46, 2012.

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H. C.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

CORDEIRO, C. S.; SILVA, F. R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 477-486, 2011.

COSTA, I. C. R.; LEITE, S. G. F.; LEAL, I. C. R.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Thermal effect on the microwave assisted biodiesel synthesis catalyzed by lipases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1993-1998, 2011.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, MILVIO.; CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 898-902, 2008.

CUI, Y.; LIANG Y. Direct transesterification of wet *Cryptococcus curvatus* cells to biodiesel through use of microwave irradiation. **Applied Energy**, v. 119, p. 438-444, 2014.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v.101, p. 5508–5516, 2010.

DA RÓS, P. C. M.; CASTRO, H. F.; CARVALHO, A. K. F.; SOARES, C. M. F.; MORAES, F. F. DE; ZANIN, G. M. Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 529-536, 2012.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, C. S. P.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F.; CASTRO, H. F. Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2365-2381, 2013.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, C. S. P.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F.; CASTRO, H.F. Microcystis aeruginosa lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 177–182, 2012.

DATTA, A. K.; SUMNU, G.; RAGHAVAN, G. S. V. (2005). Dielectric properties of foods. In M. A. RAO, S. S. H. RIZVI, & A. K. DATTA (Eds), **Engineering properties of Foods**, chap. 11 (3rd ed., p. 501–566). New York: Taylor & Francis.

DAVIES, R.; HOLDSWORTH, J. Synthesis of lipids in yeasts: biochemistry, physiology and production. **Advances in Applied Lipid Research**, v. 1, p. 119–159, 1992.

DAVIES, R.; HOLDSWORTH, J. READER, S. The effect of low oxygen uptake rate on the fatty acid profile of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 569-573, 1990.

DAYANANDA, C.; SARADA, R.; USHA RANI, M.; SHAMALA, T. R. RAVISHANKAR, G. A. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, p. 87-93, 2007.

D'OCA, M. G. M.; VIÊGAS, C.V.; LEMÕES, J. S.; MIYASAKI, E. K.; VILLARREYES, J. A. M.; PRIMEL, E. G.; ABREU, C. P. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 1533-1538, 2011.

DOMINGOS, M. **Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação.** 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)-Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009.

EL-FADALY, H. A.; EL-NAGGAR, N. EL-A. A.; MARCAW, EL-S. M. Single cell oil production by a oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. **Research Journal of Microbiology**, v. 4, p. 301-313, 2009.

EL-NAGGAR, N. EL-A. A.; EL-HERSH, M. S.; EL-FADALY, H. A.; SABER, W. I. A. Bioconversion of some agro-industrial by-products into Single cell Oil using *Candida albicans* NRL y- 12983 and *Lipomyces starkeyi* NRRL y-11557. **Research Journal of Microbiology** , v. 6, p. 784-795, 2011.

ENRIQUEZ, J. M. H.; ALAMILLA, R. G.; ROBLES, G. S.; BANDA, J. A. M. SERRANO, L. A. G. Effect of the addition of phosphotungstic acid on the thermal stability of zirconium oxide. **Dyna**, v. 81, p.107-114, 2013.

ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 97-103, 1998.

FEOFILOVA, E. P.; SERGEEVA, Y. E.; IVASSHECHKIN, A. A. Content, production, producers, contemporary biotechnology (Review). **Applied Biochemistry Microbiology**, v. 46, p. 369-378, 2010.

FERRAZ , A.; GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; MASARIN, F.; VICENTIM, M. P.; AGUIAR, A.; PAVAN, P. C. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 178–185, 2008.

FERREIRA, J. A.; LENNARTSSON, P. R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Zygomycetes-based biorefinery: present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 523-532, 2013.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FOX, R. W.; PRITCHARD, P. J.; McDONALD, A. T. - Introdução à mecânica dos fluidos/ Tradução e revisão técnica Ricardo Nicolau Nassar Koury, Luiz Machado. – (Reimpr.). – Rio de Janeiro: LTC, 2011. (1934)

FRANCISCO, É. C.; FRANCO, T. T.; MARONEZE, M. M.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J. Third generation biodiesel production from microalgae. **Ciência Rural**, v.45, p. 349-355, 2015.

GANZLER, K.; SALGÓ, A.; VALKÓ, K. Microwave extraction: a novel sample preparation method for chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 371, p. 299-306, 1986.

GEDYE, R. N.; SMITH, F. E.; WESTAWAY, K. C. The rapid synthesis of organic compounds in microwave ovens. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 66, p. 17–26, 1988.

GHAZALI, W. N. M. W.; MAMAT, R.; MASJUKI, H. H.; GHOLAMHASSAN, N. Effects of biodiesel from different feedstocks on engine performance and emissions: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 585–602, 2015.

GILL, C. O.; HALL, M. J.; RATLEDGE, C. Lipid-accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, p. 231–239, 1977.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. Green fuel production: processes applied to microalgae. **Environmental Chemistry Letters**, v. 11, p. 315–324, 2013.

GOUDA, M.; OMAR, S.; AOUAD, L. Single cell oil production by *Gordonia sp* DG using agro-industrial wastes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1703–1711, 2008.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 269–274, 2009.

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR APPLIED PHYCOLOGY, 3, 2009. v. 21, p. 493–507.

GROISMAN, Y.; GEDANKEN, A. Continuous flow, circulating microwave system and its application in Nanoparticle fabrication and biodiesel synthesis. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, p. 8802–8808, 2008.

GUDE, V.; PATIL, P.; MARTINEZ-GUERRA, E. Microwave energy potential for biodiesel production. **Sustainable Chemical Processes**, v.1 n.5, p. 1–31, 2013.

GUZATTO, R.; DEFFERRARI, D.; REIZNAUTT, Q. B.; CADORE, I. R.; SAMIOS, D. Transesterification double step process modification for ethyl ester biodiesel production from vegetable and waste oils. **Fuel**, v. 92, p. 197–203, 2012.

HASSAN, E. A.; ABD-ALLA, M. H.; BAGY, M. M. K.; MORSY, F. M. In situ hydrogen, acetone, butanol, ethanol and microdiesel production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 from oleaginous fungal biomass. **Anaerobe**, v. 34, p. 123–131, 2015.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709–732, 2012.

HARISH, B.S.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Bioengineering strategies on catalysis for the effective production of renewable and sustainable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 533–547, 2015.

HEGDE, K.; CHANDRA, N.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; VEERANKI, V. D. Genetic engineering strategies for enhanced biodiesel production. **Molecular Biotechnology**, v. 57, p. 606–624, 2015.

HOLDSWORTH, J. E.; RATLEDGE, C. Triacylglycerol synthesis in the oleaginous yeast *Candida-Curvata* D. **Lipids**, v. 26, p. 111–118, 1991.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, GU. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38–46, 2010.

HUANG, C.; CHEN, X. F.; XIONG, L.; CHEN, X. D.; MA, L.L.; CHEN, Y. Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. **Biotechnology Advances**, v. 31, p.129–139, 2013.

HUSSAIN, J.; LIU, Y.; LOPES, W. A.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O.; CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO, I. A.; LIAO, W. Effects of different biomass drying and lipid extraction methods on algal lipid yield, fatty acid profile, and biodiesel quality. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 175, p. 3048–3057, 2015.

IVERSON, S.J.; LANG, S.L.C.; COOPER, M.H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v.36, p. 1283–1287, 2001.

JACKSON, F. M.; FRASER, T. C. M.; SMITH, M. A.; LAZARUS, C.; STOBART, A. K.; GRIFFITHS, G. Biosynthesis of C18 polyunsaturated fatty acids in microsomal membrane preparations from the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. **European Journal of Biochemistry**, v. 252, p. 513–519, 1998 (a).

JACKSON, F. M.; Michaelson, L.; Fraser, T. C. M.; STOBART, A. K.; GRIFFITHS, G. Biosynthesis of triacylglycerol in the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. **Microbiology**, v. 144, p. 2639–2645, 1998(b).

JIN, M.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; WAGHMODE, S.; MOSER, B. R.; ORJUELA, A.; SOUSA, L. C.; BALAN, V. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 33,p. 43–45, 2015.

JOHNSON, M. B.; WEN, ZHIYOU. Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. **Energy Fuels**, v. 23, p. 5179–5183, 2009.

KANG, B.; HONDA, K.; OKANO, K.; AKI, T.; OMASA, T.; OHTAKE, H. Thermal analysis for differentiating between oleaginous and non-oleaginous microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 57, p. 23– 29, 2011.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: microwave assisted extraction and pressurized solvent extraction. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 105–113, 2002.

KENDRICK, A.; RATLEDGE, C. Desaturation of polyunsaturated fatty acids in *Mucor circinelloides* and the involvement of a novel membrane-bound malic enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 667-673, 1992.

KIRAN, K. A.; VATSYAYAN, P.; GOSWAMI, P. Production of lipid and fatty acids during growth of *Aspergillus terreus* on hydrocarbon substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1293-1300, 2010.

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

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**, 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KNOTHE, G.; MATHEAUS, A. C.; RYAN III, T. W. Cetane numbers of branched and straight chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel**, v. 82, p. 971-975, 2003.

KOUTINAS, A. A.; CHATZIFRAGKOU, A.; KOPSAHELIS, N.; PAPANIKOLAOU, SERAPHIM; KOOKOS, I. K. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production, **Fuel**, v.116, p. 566-577, 2014.

KRISNANGKURA, K. A simple method for estimation of cetane index of vegetable oil methyl esters. **Journal American Oil Chemical Society**, v. 63, n. 4, p. 552-553, 1986.

KUANG, Y.; CHI, W. Z.; ZHOU, H.X.; LIU, G.L.; CHI, Z.M. Enhanced production of Ca^{2+} - polymalate (PMA) with high molecular mass by *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* MCW. **Microbial Cell Factories**, v.14:115, 2015. DOI 10.1186/s12934-015-02963

KUMAR, M.; SHARMA, M. P. Assessment of potential of oils for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 814-823, 2015.

LEDESMA-AMARO, R. Microbial oils: a customizable feedstock through metabolic engineering. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, p. 141-144, 2015.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 500-518, 2010.

LEESING, R.; BAOJUNGHARN, R. Microbial oil production by isolated oleaginous yeast *Torulaspora globosa* YU5/2. **Engineering and Technology**, v. 52, p. 799-803, 2011.

LEMAN, J. Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential. **Advances in Applied Microbiology**, v. 51, p. 195-243, 1997.

- LERTSATHAPORNSUK, V.; PAIRINTRA, R.; ARYUSUK, K.; KRISNANGKURA, K.; Microwave assisted in continuous biodiesel production from waste frying palm oil and its performance in a 100 kW diesel generator. **Fuel Processing Technology**, v. 89, p. 1330-1336, 2008.
- LI, N.; DENG, Z-N.; QIN, Y-L.; CHEN, C-L.; LIANG, Z-Q. Production of polyunsaturated fatty acids by *Mucor recurvus* sp. with sugarcane molasses as the carbon source. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 73-79, 2008.
- LI, W.; DU, W.; LI, Q.; LI, R.; LIU, D. Dependence on the properties of organic solvent: Study on acyl migration kinetics of partial glycerides. **Bioresource Technology**, v.101, p. 5737-5742, 2010.
- LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 749-756, 2008.
- LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 764-771, 2007.
- LIANG, Y-J.; JIANG, J-G. Characterization of malic enzyme and the regulation of its activity and metabolic engineering on lipid production. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 45558-45570, 2015.
- LIU, I.; VORA, H.; KHOSLA, C. Quantitative analysis and engineering of fatty acid biosynthesis in *E. coli*. **Metabolic Engineering**, v. 12, p. 378-386, 2010.
- LV, J-M.; CHENG, L-H.; XU, X-H.; ZHANG, L.; CHEN, H-L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6797-6804, 2010.
- MA, Y.A.; CHENG, Y.M.; HUANG, J.W.; JEN, J.F.; HUANG, Y.S.; YU, C.C. Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p 1543-1549, 2014.
- MAHAMUNI N. N.; ADEWUYI Y. G. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) method to monitor soy biodiesel and soybean oil in transesterification reactions, petrodiesel-biodiesel blends, and blend adulteration with soy oil. **Energy and Fuels**. v.23. p. 3773-3782. 2009.
- MALVESSI, E. **Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis***. 2008. 235 f. Tese (Doutorado em Biologia celular e molecular)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- MARTINEZ, E. J.; RAGHAVAN, V.; GONZALEZ-ANDRÉS, F.; GÓMEZ, X. New biofuel alternatives: integrating waste management and single cell oil production **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 9385-9405, 2015.

MARWAN; SUHENDRAYATNA; INDARTI, E. Preparation of biodiesel from microalgae and palm oil by direct transesterification in a batch microwave reactor. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 622, 2015. doi:10.1088/1742-6596/622/1/012040.

MASARIN, F. **Habilidade degradativa de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium* em cultivo sobre madeira de *Eucalyptus grandis* não autoclavada.** 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MENG, X.; YANGA, J.; XUA, X.; ZHANGA, L.; NIE, Q.; XIANA, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1 – 5, 2009.

MERCER, P.; ARMENTA, R. Developments in oil extraction from microalgae. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 5, p. 539-547, 2011.

MITRA, D.; RASMUSSEN, M. L.; CHAND, P.; CHINTAREDDY, V. R.; YAO, L.; GREWELL, D.; VERKADE, J. G.; WANG, T.; LEEUWEN, J. H. Value-added oil and animal feed production from corn-ethanol stillage using the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 368 – 375, 2012.

MUBARAK M.; SHAIJA A.; SUCHITHRA T.V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**. v. 7. p. 117-123, 2015.

NAGARAJA, Y. P.; BIRADAR, C.; MANASA, K. S.; VENKATESH, H. S. Production of biofuel by using micro algae (*Botryococcus braunii*). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, p. 851-860, 2014.

NYMAN J.; LACINTRA M. G.; WESTMAN J. O.; BERGLIN M.; LUNDRIN M.; LENNARTSOON P. R.; TAHERZADEH M. J.; Pellet formation of zygomycetes and immobilization of yeast. **New Biotechnology**. v. 30, p. 516, 2013.

ORSAT, V.; REGHAVAN, V. Microwave technology for food processing: an overview, in Schubert H. and Regier M., The microwave processing foods, Cambrigde, Woodhead Publishing, p. 105-115, 2005.

PAIVA, E. J. M.; DA SILVA, M. L. C. P.; BARBOZA, J. C. S.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANI, D. S. Non-edible babassu oil as a new source for energy production - a feasibility transesterification survey assisted by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 833-838, 2013.

PAPANIKOLAOU, S.; SARANTOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiplelimited media. **Journal Applied Microbiology**, v. 97, p. 867-874, 2004.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Industrial derivative of tallow: A promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 425–435, 2007 (b).

PAPANIKOLAOU, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; FAKAS, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 1060–1070, 2007 (a).

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G.; MARC, I. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 80, p. 215–224, 2001.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivate of animal fat in batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p. 308–312, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 1031–1051, 2011.

PAPP, T.; CSERNETICS, A.; NYILASI, I.; ARBROK, M.; VAGVOLGY, I. Genetic transformation of Zygomycetes Fungi. **Process in Mycology**. v. 01. DOI: 10.1007/978-90-481-3713-8_3.

PARSON J. B.; ROCK C. O.; Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. **Progress in Lipid Research**. v. 53, p. 249–276, 2013.

PATIL, P. D.; DENG, S. Optimization of biodiesel production from edible and non-edible vegetable oils. **Fuel**, v. 88, p. 1302–1306, 2009.

PINZI, S.; LEIVA-CANDIA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; REDEL-MACÍAS, M. D.; DORADO, M. P. Latest trends in feedstocks for biodiesel production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 8, p. 126–143, 2014.

PREEZ, J. C.; IMMELMAN, M.; KILIAN, S. G. The utilization of short-chain monocarboxylic acids as carbon sources for the production of gamma- linolenic acid by *Mucor* strains in fed-batch culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p. 66–72, 1996.

PREEZ, J. C.; IMMELMAN, M.; KOCK, J. L. F. KILIAN, S. G. Production of gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides* and *Mucor rouxii* with acetic acid as carbon substrate. **Biotechnology Letter**, v. 17, p. 933–938, 1995.

PYLE, D.J.; GARCIA, R.A.; WEN, Z. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodieselderived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3933–3939, 2008.

QUINTANA, N.; VAN DER KOOY, F.; VAN DE RHEE, M. D.; VOSHOL G P.; VERPOORTE R.; Renewable energy from Cyanobacteria : energy production optimization by metabolic pathway engineering. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 91, p. 471-490, 2011.

QV X.Y.; ZHOU Q.F.; JIANG J.G. Ultrasound-enhanced and microwave-assisted extraction of lipid from *Dunaliella tertiolecta* and fatty acid profile analysis. **Journal of Separation Science**, v. 37. p. 2991-2999. 2014.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 261-268, 2009.

RATLEDGE, C. Microbial oils and fats: an assessment of their commercial potential. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 16, p. 119–206, 1982.

RATLEDGE C.: Microbial lipids: commercial realities or academic curiosities, p. 1-14. In KYLE, D. J; RATLEDGE, C. (ed.), **Industrial applications of single cell oils**, Champaign: AOCS Press, 1992.

RATLEDGE, Single cell oils - have they a biotechnological future? **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 278-284, 2013 ou 1993.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86 , p.807–815, 2004.

RATLEDGE, C.; HALL, M. J. Oxygen-demand by lipid-accumulating yeasts in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, p. 230–231, 1977.

RATLEDGE, C. The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 1557–1568, 2014.

REFAAT A. A. Different techniques for the production of biodiesel from waste vegetable oil. **Environmental Science and Technology International Journal**. v. 7, p. 183-213. 2010.

REIS, E. R. C.; ZHANG, J.; HU, B., Lipid accumulation by pelletized culture of *Mucor circinelloides* on corn stover hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 411-423, 2014.

RODRÍGUEZ-FRÓMETA, R. A.; GUTIÉRREZ, A.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; GARRE, V. Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 3063–3072, 2013.

ROSSI, J.; BALTHASAR, N.; OLSON, D.; SCOTT, M.; BERGLUND, E.; LEE, E. C.; CHOI, M. J.; LAUZON, D. L.; LOWELL, B. B.; ELMQUIST, J. K. Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 13, p. 195-204, 2011.

ROUX, M. P.; KOCK, J. L. F.; BOTHA, A.; PREEZ, J. C.; WELLS, G.V.; BOTES, P.J.; Mucor-a source of cocoa butter and gamma-linolenic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 10. p. 417-422. 1994.

RUAN, Z.; ZANOTTI, M.; WANG, X.; DUCEY, C.; LIU, Y. Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 198–205, 2012.

SANI, M. C.; WEBER, D. K.; DELAGLIO, F.; SEPAROVIC, F.; GEHMAN, J. D. A practical implementation of de-Pake-ing via weighted Fourier transformation. **Peerj**, v. 30, p. 1-8, 2013.

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

SHI, S.; VALLE-RODRIGUEZ, J.; SIEWERS, V.; NIELSEN, J. Prospects for microbial biodiesel production. **Biotechnology Journal**. v. 6, p. 277–285, 2011.

SILVA, C. S. P.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F.; CASTRO, H. F.; DA RÓS, P. C. M.; Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. **Algal Research**, v. 3, p. 1-7, 2014.

SILVA, T. A. L.; MOURA, J. L.; MORAES FILHO, M. A.; TAMBOURGI, E. B.; TAKAKI, G. M. C. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, v. 8, p. 19-26, 2010.

SILVA, G. A. M.; DA RÓS, P. C. M.; SOUZA, L. T. A.; A. COSTA, P. O.; DE CASTRO, H. F. Physico-chemical, Spectroscopical and thermal characterization of biodiesel obtained by enzymatic route as a toll to select the most efficiente immobilized lipase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 29, p. 39-47, 2012

SILVA, G. K. B. **Produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS) por *Cunninghamella elegans* UCP 542 em substratos alternativos**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, 2011.

SINANOGLOU, V. J.; ZOUMPOULAKIS, P.; HEROPOULOS, G.; PROESTOS, C.; CIRIC, A.; PETROVIC, J.; GLAMOCLIJ, J.; SOKOVIC, M. Lipid and fatty acid profile of the edible fungus *Laetiporus sulphurous*. Antifungal and antibacterial properties. **Journal of Food Science and Technology**. v. 52. p. 3264-4272. 2015.

SINGH S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 200-216, 2010.

SING, S. F.; ISDEOSKY, A.; BOROWITZKA, A. M.; MOHEIMANI, N. R. Production of biofuels from microalgae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, p. 47-72, 2013.

SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D.; BLOCK, D. E.; GERMAN, J. B.; BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1336-1360, 2014.

SONG, Y.; WYNN, J. P.; LI, Y.; GRANTHAM, D.; RATLEDGE, C. A pre-genetic study of the isoforms of malic enzyme associated with lipid accumulation in *Mucor circinelloides*. **Microbiology**, v. 147, p. 1507-1515, 2001.

SONG, C.; CHEN, G.; JI, N.; LIU, Q.; KANSHA, Y.; TSUTSUMI, A. Biodiesel production process from microalgae oil by waste heat recovery and process integration. **Bioresource Technology**, v.193, p. 192-199, 2015.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Principles of fermentation technology. 2th Ed. Great Britain, p. 357, 1995.

SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V.; Lipid accumulation for biodiesel production by oleaginous fungus *Aspergillus awamori*: influence of critical factors. **Fuel**, v. 116, p. 509-515, 2014.

SUMNER, J. B.; NOBACK, C. V. The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 287-290.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

TAHVILDARI, K.; MOHAMMADI, S.; Synthesis of ethyl ester (Biodiesel) from linseed oil, using transesterification double step process (TDSP). **Academic Research International**, v. 5, p. 27-32, 2014.

TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. BiodieselAnalyzer[®]: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, v. 2, p. 55-57, 2014.

TANG, X.; CHEN, H.; CHEN, Y. Q.; CHEN, W.; GARRE, V.; SONG, Y.; RATLEDGE, C. Comparison of biochemical activities between aigh and low lipid-producing strains of *Mucor circinelloides*: an explanation for the high oleaginiccity of strain WJ11. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

TARIQ, M.; ALI, S.; AHMAD, F.; AHMAD, M.;ZAFAR, M.; KHALID, N.; KHAN, M. A. Identification, FT-IR, NMR (1H and 13C) and GC/MS studies of fatty acid methyl esters in biodiesel from rocket seed oil. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 336-341, 2011.

TAUK-TORNISIELO S. M.; ARASATO L. S.; ALMEIDA A. F.; GOVONE J. S.; MALAGUTTI E. N. Lipid formation and γ -linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus* sp., grown on vegetable oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 342-345, 2009.

VARATHARAJAN, K.; CHERALATHAN, M. Effect of aromatic amine antioxidants on NO_x emissions from a soybean biodiesel powered DI diesel engine, **Fuel Processing Technology**, v.32, p. 106-526, 2013.

VENKATA, S. G.; VENKATA, M. S. Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus* sp. using corncob waste liquor as a substrate. **Bioresource Technology**, v.102, p. 9286-9290, 2011.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; GUTIERREZ, F. J.; RODRIGUEZ, R.; MARTINEZ, V.; RODRIGUEZ-FROMETA, R. A.; RUIZ-VAZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTINEZ, S.; GARRE, V. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. **Energy Fuels**, v. 24, p. 3173–3178, 2010.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ, F. J.; SADABA, I.; RUIZ-VAZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTINEZ, S.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 22-27, 2009.

VICENTIM, M.P. **Secreção diferenciada de enzimas lignocelulolíticas durante a biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispota* e resposta da madeira biotratada frente a processos posteriores de polpação**. 2007. 139f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos graxos em óleos e gorduras: Identificação e quantificação**, São Paulo: Varela, 2006. p. 120.

VONGSANGNAK, W.; RUENWAI, R.; TANG, X.; HU, X.; ZHANG, H.; SHEN, B.; SONG, Y.; LAOTENG, K. Genome-scale analysis of the metabolic networks of oleaginous Zygomycete fungi. **Gene**, v. 521, p. 180–190, 2013.

WANG, C.; CHEN, L.; RAKESH, B.; QIN, Y.; LV, R. Technologies for extracting lipids from oleaginous microorganisms for biodiesel production. **Frontiers of Energy and Power Engineering in China**, v. 6, p. 266-274, 2012.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; YOUNG, M. M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 115–129, 2005.

WISE, W.S. The measurement of the aeration of culture media. **Journal of General Microbiology**, v.5, p. 167, 1951.

WU, S.; HUA, C.; JINA, G.; ZHAO, X.; ZHAO, Z. K. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6124–6129, 2010.

WYNN, J. P.; HAMID, A. A.; YONGHUA, L.; RATLEDG, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. **Microbiology**, v. 147, p. 2857-2864, 2001.

XIA, C.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, 15, 2011. doi:10.1186/1754-6834-4-15.

XIA, C.; WEI, W.; HU, B. Statistical analysis and modeling of pelletized cultivation of *Mucor circinelloides* for microbial lipid accumulation. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 172, p. 3502–3512, 2014.

XU, J.; ZHAO, X.; WANG, W.; DU, LIU, W. D. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. **Biochemical Engineering Journal**, v.65, p. 30– 36, 2012.

YEN, H-W.; YANG, Y-C.; YU, Y-H. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, p. 453 – 456, 2012.

YKEMA, A.; VERBREE, E.; VERWOERT, I.; LINDEN, K.; NIJKAMP, H. SMIT, H. Lipid production of revertants of Ufa mutants from the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 33, p.176–82, 1990.

ZHANG, X.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R.Y.; VALÉRO, J. R. Ultrasonication aided in-situ transesterification of microbial lipids to biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 175–180, 2014.

ZHAO, C-H.; ZHANG, T.; LIA, M.; CHIA, Z-M. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1121-1126, 2010.

ZHAO, C-H.; CHI, Z.; ZHANG, F.; GUO, F-J.; LI, M.; SONG, W-B.; CHI, M. C. Direct conversion of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke into single cell oil by co-cultures of *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a and immobilized inulinase-producing yeast cells. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6128–6133, 2011.

Capítulo 5

Conclusões e recomendações para trabalhos futuros

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES PARA DESENVOLVIMENTO DE TRABALHOS FUTUROS

De um modo geral, biorrefinarias baseadas em fungos filamentosos podem se tornar uma alternativa atraente em futuro próximo, visto que os zigomicetos principalmente a ordem dos *Mucorales* possuem grande potencial para o estabelecimento de uma plataforma para a produção de produtos de química fina, de enzimas, de biomassa fúngica para fins alimentares e produção de lipídios.

No presente trabalho foi comprovada a eficiência do fungo *M. circinelloides* URM 4182 em produzir lipase ligada ao micélio e acumular lipídios. O trabalho realizado estabeleceu diferentes metodologias que foram aplicadas com sucesso nas diferentes etapas de obtenção do biocatalisador e de biomassa lipídica, de forma independente.

Como relação à produção de lipase ligada ao micélio, foram identificadas limitações do desempenho do biocatalisador nas reações de transesterificação de óleos vegetais alternativos, sendo necessários estudos adicionais para esclarecer a influência de vários solventes sobre o processo de migração do grupo acila. Tais estudos podem esclarecer se um rendimento elevado de transesterificação está associado com a taxa de migração do grupo acila durante etanolise. Adicionalmente, recomenda-se investigar a síntese enzimática utilizando métodos não convencionais de aquecimento, como por exemplo, irradiação de micro-ondas e ultrassom.

Dentre os meios de cultivo utilizados nos diferentes sistemas de incubação testados (shaker orbital e reator), todos apresentaram resultados satisfatórios de produção de biomassa e acúmulo de lipídio, sendo que o cultivo realizado em biorreator utilizando glicose como fonte de carbono e milho, como fonte de nutriente alternativo aos suplementos sintéticos, apresentou melhor produtividade lipídica. Entretanto, para viabilizar a produção de biomassa lipídica pelo *M. circinelloides* URM 4182, a utilização de fontes de carbono derivadas de subprodutos ou resíduos agroindustriais é recomendada, bem como opções de baixo custo para operações unitárias da recuperação e purificação, sempre tendo como referência a análise de viabilidade econômica do processo inserido na biorrefinaria. Neste contexto, estudos exploratórios indicaram a viabilidade de utilização fontes sacaríneas derivadas, por exemplo, de melaço ou fontes hemicelulósicas derivadas, por exemplo, xilose, como potenciais fontes de carbono para cultivo de fungo *M. circinelloides*. Adicionalmente, trabalhos futuros podem ser propostos visando utilizar

componentes que induzam a formação de pellets, bem como nutrientes que induzam o elevado acúmulo de lipídios, aumentando, desta forma, a potencialidade do uso de células pelletizadas para a produção de SCO.

Considerando que a transesterificação direta da biomassa rica em lipídios com etanol associado a catalisadores heterogêneos proporcionou a obtenção de biocombustível derivado totalmente de fontes renováveis, recomenda-se explorar esta opção utilizando diferentes catalisadores heterogêneos, incluindo a preparação de lipase ligada ao micélio gerada pelo próprio fungo, visando estabelecer processos menos poluentes e mais seletivos.

Ressalta-se ainda que melhoramentos do processo global podem ser alcançados a partir de estudos da via metabólica e engenharia genética, tornando essa particular linhagem de *Mucor circinelloides* fonte de matéria-prima ideal para produção de biodiesel e outros produtos de elevado valor agregado dentro do conceito de biorrefinarias.

ANEXOS

Anexo A- Composição básica da solução de milhocina concentrada, adaptada da CORN PRODUCTS BRASIL (CORN PRODUCTS BRASIL, 1998).

AMINOÁCIDOS %	
Alanina	9,83
Arginina	3,68
Ácido Aspártico	5,82
Cistina	2,20
Ácido Glutâmico	18,07
Glicina	5,27
Histidina	3,72
Isoleucina	3,07
Leucina	8,28
Lisina	4,75
Tirosina	3,09
Metionina	1,98
Fenilalanina	2,85
Prolina	9,64
Serina	5,18
Treonina	4,08
Valina	5,16
VITAMINAS mg/kg	
Biotina	0,3
Colina	3.500,0
Inositol	6.000,0
Niacina	80,0
Ácido Pantatênico	15,0
Piridoxina	9,0
Riboflavina	6,0
Tiamina	3,0
MINERAIS %	
Cálcio	0,14
Cobre	15,0
Manganês	20,0
Ferro	100,0
Magnésio	0,6
Potássio	2,8
Sódio	0,1
Fósforo	1,8
Selênio	0,3
Zinco	60,0
Enxofre	0,6