UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

HEITOR BUZETTI SIMÕES BENTO

Derivados da agroindústria de cana-de-açúcar para cultivo de fungo oleaginoso:
produção e modificação de lipídios

Lorena
2020

HEITOR BUZETTI SIMÕES BENTO

**Derivados da agroindústria de cana-de-açúcar para cultivo de fungo
oleaginoso: produção e modificação de lipídios**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Heizir Ferreira de Castro

Versão Original

Lorena
2020

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)

Bento, Heitor Buzetti Simões

Derivados da agroindústria de cana-de-açúcar para cultivo de fungo oleaginoso: produção e modificação de lipídios / Heitor Buzetti Simões Bento; orientadora Heizir Ferreira de Castro - Versão Original. - Lorena, 2020.
111 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. 2020

1. *Mucor circinelloides*. 2. Biorrefinaria. 3. Biodiesel. 4. Ácidos graxos. I. Título. II. de Castro, Heizir Ferreira, orient.

*Dedico este trabalho aos meus pais
por sempre confiarem e apoiarem
minhas decisões e sonhos*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e ter me concedido forças e capacidade para chegar até aqui, por me presentear com momentos e pessoas especiais.

À Prof^a Dr^a Heizir Ferreira de Castro, pela orientação, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pelo apoio constante durante a realização de todas as etapas e por ser um exemplo de profissionalismo.

Aos meu pais, André e Naara, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos, por me auxiliarem e me incentivarem na busca dos meus sonhos. A vocês minha eterna gratidão.

À minha querida irmã Camille pelo apoio prestado com tanto carinho e pela motivação constante nesta caminhada e ao meu irmão Rafael pelo amor e companheirismo.

À Dr^a Ana Karine Furtado de Carvalho pelas valiosas e inúmeras contribuições ao trabalho, pela disponibilidade, amizade e apoio. Obrigado pelas orações e por me estimular e inspirar a seguir este caminho.

Ao Dr. Cristiano Reis pela contribuição neste trabalho, pela disposição em ajudar e pela amizade dentro e fora do laboratório. Aos queridos companheiros de laboratório, Ana Karine, Cristiano, Giovanna, Pietro e Thiago, obrigado pelo auxílio constante, pelos cafés, almoços e risadas.

Aos meus amigos Arthur, Bruno, Edward, Ian, Lucas, Matheus, Mila, Thiago Ribeiro, Thiago Vieira e Vinícius agradeço o carinho e o incentivo ao longo desta caminhada e por serem minha segunda família, tornando os meus dias melhores.

Aos amigos de laboratório que me acompanharam e me ajudaram nesta etapa: Amanda, Annie, Caio, Carol, Daniela, Mateus, Rosemar, Rafael, Renata, Sara e Savienne, Vinícius obrigado pela agradável companhia de todos os dias.

Aos professores que estão presentes desde o começo do meu mestrado e pelos quais tenho imenso carinho: Dra. Larissa, Dra. Patrícia e Dr. Pedro. Obrigado pelo auxílio constante, pela amizade e convivência.

Aos professores: Dra. Jayne, Dr. Julio Dra. Rita, e Dr. Hécio. Agradeço pelo apoio na realização de importantes análises, pelas valiosas sugestões e contribuições neste trabalho e principalmente por estarem sempre disponíveis a ajudar.

A todos os professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho. Em especial à equipe do PPGBI, PPGEQ e CPG.

Aos familiares e amigos que torceram e continuam torcendo pelas minhas conquistas.

Agradeço o apoio financeiro concedido pela CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Ao ensino público gratuito e de qualidade, por ter me concedido a oportunidade de realizar Graduação, Mestrado e Doutorado.

RESUMO

BENTO, H. B. S. **Derivados da agroindústria de cana-de-açúcar para cultivo de fungo oleaginoso: produção e modificação de lipídios**. 2020. 111p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

A utilização de microrganismos como método de valorização de subprodutos e derivados agroindustriais na geração de energia e outros produtos de valor agregado tem sido apontado como uma importante ferramenta na transição para uma bioeconomia circular. Os lipídios microbianos são de grande interesse para aplicação nas indústrias de energia, de alimentos e farmacêutica, devido a seu potencial de ser convertido a biodiesel e de produzir elevados teores de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA). Desta forma, o trabalho teve como objetivo investigar o acúmulo de lipídios pela linhagem de *Mucor circinelloides* URM 4182 explorando sua aplicação para a produção de biodiesel e concentrados de PUFA, partindo da seleção de meios de cultivo alternativos compostos por derivados agroindustriais. Os resultados confirmaram a capacidade da espécie estudada em assimilar diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, xilose, sacarose, amido e glicerol), com elevado crescimento celular (entre 2,0 e 7,8 g L⁻¹) e acúmulo lipídico (até 43% da biomassa seca). Meios baseados em sacarose foram selecionados por fornecer lipídios com composição em ácidos graxos balanceada para a produção de biodiesel (principalmente C16:0 e C18:1). Cultivos baseados em açúcar bruto, caldo de cana-de-açúcar, melado e melaço de cana-de-açúcar, confirmaram a capacidade do fungo em gerar elevadas quantidade de lipídios (3,25-4,67 g L⁻¹) sem a necessidade de adição de enzimas externas para converter sacarose. As reações de transesterificação enzimática destes lipídios atingiram elevados teores de ésteres etílicos (95,3-97,1%), indicando seu potencial de aplicação como biodiesel. Os lipídios obtidos pelo cultivo em meio contendo melaço de cana-de-açúcar apresentaram elevados teores de PUFA e foram submetidos a hidrólise enzimática para gerar soluções concentradas de potencial nutracêutico, as reações atingiram 99,1% de grau de hidrólise com 20% de lipase de *Candida rugosa* como catalisador. Reações de transesterificação direta da biomassa oleaginosa aplicando 20% de H₃PMo/Al₂O₃ produziu 96,7% de teor de ésteres e o produto atendeu à normas de especificações internacionais, indicando elevado potencial de aplicação na produção de biodiesel diminuindo custos de processo ao condensar as etapas de extração e reação. Os resultados permitiram concluir que o fungo filamentoso *M. circinelloides* URM 4182 é um microrganismo robusto capaz de assimilar diversos substratos derivados da agroindústria gerando produtos de interesse industrial, contribuindo para a transição à uma economia sustentável.

Palavras-chave: *Mucor circinelloides*. Biorrefinaria. Biodiesel. Ácidos graxos.

ABSTRACT

BENTO, H. B. S. **Sugarcane agroindustry derivatives to be used on the culture of oleaginous fungi: production and modification of lipids**. 2020. 111p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

The use of microorganisms to promote the valorization of by-products generated by the agriculture industries has been identified as an important tool to be used in the transition to a circular bio-based economy. Microbial lipids are of particular interest to diverse sectors in the energy, food, and pharmaceutical industries, due to their potential to be converted to biodiesel and concentrated solutions of polyunsaturated fatty acids (PUFA). In this sense, the goal of this work was to investigate the accumulation of lipids by the *Mucor circinelloides* URM 4182 fungal strain exploring its potential for application in the production of both biodiesel and PUFA concentrate, having started by the studies evaluating alternative culture media composed by agro-industrial derivatives. The screening results demonstrate the capacity of the strain to assimilate different carbon sources (glucose, fructose, xylose, sucrose, starch and glycerol), with high cell growth (between 2.0 -7.8 g L⁻¹) and lipid accumulation (up to 43% of dry biomass). Sucrose-based media were then selected for providing lipids with balanced fatty acid composition for the production of biodiesel (mainly C16:0 and C18:1). Different growth assays based on raw sugar, sugarcane juice, molasses and sugarcane molasses confirmed the ability of the fungal strain to accumulate high amounts of lipids (3.25-4.67 g L⁻¹) without the need to add external enzymes to hydrolyze sucrose to its monomers. The enzymatic transesterification reactions of such lipids reached high levels of ethyl esters (95.3-97.1%), indicating their potential for application as biodiesel. The lipids obtained by cultivation in a medium containing sugarcane molasses also showed high levels of PUFA and were submitted to enzymatic hydrolysis to generate concentrated solutions of nutraceutical potential. The hydrolysis reactions reached 99.1% of hydrolysis degree with 20% of *Candida rugosa* lipase as catalyst. Direct transesterification reactions of oleaginous biomass applying 20% H₃PMo/Al₂O₃ gave a mixture containing 96.7% esters, which provided a product that met international biofuel standards, indicating its high potential for the application in the production of biodiesel, reducing process costs by condensing the steps of oil extraction and reaction. The results allowed concluding that the filamentous fungus *M. circinelloides* URM 4182 is a robust microorganism capable of assimilating diverse substrates derived from the agribusiness, generating products of industrial interest, contributing to the transition to a sustainable economy.

Keywords: *Mucor circinelloides*. Biorefinery. Biodiesel. Fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Esquema resumido das etapas desenvolvidas no presente trabalho	22
Figura 2.1 - Conceito de biorrefinaria baseada em fungo filamentoso	29
Figura 2.2 - Dados de processamento de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol no Brasil nos últimos anos	30
Figura 2.3 - Rota metabólica sugerida para a síntese de lipídios por <i>M. circinelloides</i>	34
Figura 2.4 - Produção de biodiesel no Brasil nos últimos anos.....	35
Figura 2.5 - Etapas da reação de transesterificação de triacilgliceróis	40
Figura 3.1 – Biorreator utilizado nos cultivos de <i>Mucor circinelloides</i>	52
Figura 4.1- Imagens do cultivo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 (a) e de sua biomassa filtrada (b)	62
Figura 4.2 – Composição dos ácidos graxos presentes nos lipídios microbianos obtidos utilizando diferentes fontes de carbono.....	67
Figura 5.1- Curvas de crescimento, acúmulo de lipídios e consumo de açúcares por <i>M. circinelloides</i> URM4182 cultivos em meio com açúcar bruto.....	78
Figura 5.2- Curvas de crescimento, acúmulo de lipídios e consumo de açúcares por <i>M. circinelloides</i> URM4182 cultivos em meio com caldo de cana-de-açúcar.....	78
Figura 5.3- Curvas de crescimento, acúmulo de lipídios e consumo de açúcares por <i>M. circinelloides</i> URM4182 cultivos com melado	79
Figura 5.4- Curvas de crescimento, acúmulo de lipídios e consumo de açúcares por <i>M. circinelloides</i> URM 4182 cultivado em meio com melaço de cana-de-açúcar.....	79
Figura 5.5- Imagens das biomassas obtidas a partir dos meios com diferentes fontes sacaríneas (a: açúcar bruto, b: caldo de cana, c: melado, d: melaço de cana-de-açúcar.....	82
Figura 5.6 - Composição dos ácidos graxos presentes nos lipídios microbianos obtidos a partir de diferentes fontes sacaríneas	84
Figura 5.7 - Monitoramento da formação dos ésteres na transesterificação enzimática dos lipídios de <i>M. circinelloides</i> cultivado em meios sacaríneos ..	85

Figura 5.8 - Espectro de RMN ¹ H do óleo extraído de <i>M. circinelloides</i> URM 4182	86
Figura 5.9 - Espectros de RMN ¹ H dos produtos de transesterificação enzimática obtidos dos lipídios obtidos de cultivo em meio contendo: a) açúcar bruto; b) caldo de cana; c) melado; d) melaço de cana-de-açúcar	86
Figura 6.1 - Diagrama de Pareto do planejamento aplicado a transesterificação direta de <i>M. circinelloides</i> URM4182	95
Figura 6.2 - Superfície de resposta do modelo proposto pelo planejamento aplicado a transesterificação direta de <i>M. circinelloides</i> URM4182.....	97
Figura 6.3 - Correlação do modelo proposto pelo planejamento aplicado a transesterificação direta de <i>M. circinelloides</i> URM4182 com os dados experimentais obtidos.....	98
Figura 6.4 - Análise de FTIR da biomassa de <i>M. circinelloides</i> sem modificação, após extração em micro-ondas e após transesterificação direta	100
Figura 6.5 - Perfil do grau de hidrólise em função do tempo com variação da concentração de catalisador e influência de a) aquecimento convencional e agitação magnética e b) utilização de banho de ultrassom	102
Figura 6.6 - Taxas iniciais de hidrólise das reações com variação da concentração de catalisador e forma de aquecimento (convencional e ultrassom).....	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Estudos utilizando a espécie <i>Mucor circinelloides</i>	32
Quadro 2.2 - Principais classes de catalisadores aplicados na síntese de biodiesel	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Microrganismos utilizados para produção de biodiesel via transesterificação direta.....	41
Tabela 3.1 – Níveis e fatores utilizados no planejamento fatorial aplicado às reações de transesterificação direta via catálise química.....	54
Tabela 4.1- Cultivos de <i>M. circinelloides</i> URM4182 realizados em frascos agitados utilizando diferentes fontes de carbono.	63
Tabela 4.2- Composição em ácidos graxos dos lipídios microbianos obtidos em frascos agitados utilizando diferentes fontes de carbono.	66
Tabela 4.3 - Propriedades estimadas dos biocombustíveis de acordo com o <i>software</i> Biodisel Analyzer®.	68
Tabela 5.1 – Características das matérias-primas sacaríneas utilizadas.....	77
Tabela 5.2 - Cultivos de <i>M. circinelloides</i> URM4182 em biorreator utilizando meios de cultivo contendo sacarose a partir de derivados industriais da cana-de-açúcar.....	80
Tabela 5.3 - Composição em ácidos graxos dos óleos microbianos obtidos a partir de cultivos efetuados em meios com diferentes fontes sacaríneas.....	83
Tabela 5.4 - Perfil do produto purificado da transesterificação enzimática de óleo de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 cultivado em meios sacaríneos.	88
Tabela 5.5 -Parâmetros das amostras de biodiesel estimadas pela composição dos óleos de <i>M. circinelloides</i> cultivados em diferentes fontes de sacarose ..	89
Tabela 6.1 – Matriz experimental e teor de ésteres obtidos na transesterificação direta de biomassa de <i>M. circinelloides</i> URM4182 de acordo com o planejamento fatorial	95
Tabela 6.2 – Análise de variância do planejamento aplicado a transesterificação direta de biomassa de <i>M. circinelloides</i> URM4182.....	96
Tabela 6.3 -Análise do produto da transesterificação direta de biomassa de <i>M. circinelloides</i> cultivado em meio baseado em melaço	99

LISTA DE ABREVIações

ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
AOCS	America Oil Chemists' Society
ASTM	American Society for Testing and Materials
DAG	Diacilglicerol
EN	European Regulation
GLA	Ácido gama-linolênico
MAG	Monoacilglicerol
MUFA	Ácido graxo mono-insaturado
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
PUFA	Ácido graxo poli-insaturado
SCO	Single Cell Oil
SFA	Ácido graxo saturado
TAG	Triacilglicerol
URM	University Recife Mycology

SUMÁRIO

1. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	19
1.1 Justificativa e motivação do trabalho	19
1.2 Objetivos	21
1.3 Estrutura da tese	22
REFERÊNCIAS.....	24
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 Biorrefinarias e bioeconomia circular	27
2.2 Agroindústria de cana-de-açúcar	29
2.3 Potencial biotecnológico do fungo filamentoso <i>Mucor circinelloides</i>	31
2.3.1. Biossíntese lipídica microbiana	33
2.4 Biodiesel.....	34
2.4.1 Matérias-primas	36
2.4.2 Catalisadores	36
2.5 Síntese de biodiesel microbiano	39
2.5.1. Síntese de biodiesel via transesterificação direta	40
REFERÊNCIAS.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Materiais.....	49
3.1.1 Microrganismo.....	49
3.1.2 Fontes de carbono e nutrientes.....	49
3.1.3 Catalisadores	49
3.1.4 Outros materiais	50
3.1.5 Equipamentos	50
3.2 Metodologia Experimental.....	51
3.2.1 Preparo da suspensão de esporos	51
3.2.2 Cultivos em frascos agitados	51
3.2.3 Cultivos em biorreator	51
3.2.4 Extração de lipídios da biomassa de <i>M. circinelloides</i> URM 4182	52
3.2.5 Síntese de ésteres etílicos	53
3.2.6 Hidrólise enzimática do óleo de <i>M. circinelloides</i>	54
3.2.7 Metodologias analíticas.....	55
REFERÊNCIAS.....	59

4. SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO PARA CULTIVO DO FUNGO	61
4.1 Introdução	61
4.2 Resultados e discussão	62
4.2.1 Crescimento celular e acúmulo de lipídios	62
4.2.2 Composição em ácidos graxos dos óleos microbianos.....	65
4.2.3 Estimativa das propriedades do biodiesel obtido dos lipídios de <i>M. circinelloides</i> URM 4182	67
4.3 Conclusões	70
REFERÊNCIAS.....	71
5. PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS A PARTIR DE DERIVADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	75
5.1 Introdução	75
5.2 Resultados e discussão	76
5.2.1 Caracterização da matéria-prima e parâmetros de cultivo em biorreator.....	76
5.2.2 Composição em ácidos graxos dos óleos obtidos nos cultivos em biorreator	82
5.2.3 Transesterificação dos lipídios via catálise enzimática assistida por micro-ondas	84
5.3 Conclusões	90
REFERÊNCIAS.....	91
6. APLICAÇÃO DE LIPÍDIOS OBTIDOS EM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	93
6.1 Introdução	93
6.2 Resultados e discussão	94
6.2.1 Avaliação da influência da razão molar e concentração de catalisador na transesterificação direta	94
6.2.2 Transesterificação direta da biomassa oleaginosa de <i>Mucor circinelloides</i> ..	98
6.2.3 Aplicação de lipídios na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados.....	101
6.3 Conclusões	104
REFERÊNCIAS.....	106
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	109

1. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Justificativa e motivação do trabalho

O aumento exponencial da população nos últimos anos tem ocasionado preocupação crescente em relação à sustentabilidade do sistema industrial e energético atual. A descontrolada geração de resíduos e consumo de recursos naturais aliadas à demanda de alimentos e de energia pode gerar colapso do sistema, indicando a necessidade de desenvolvimento de processos integrados a partir de materiais renováveis que promovam o aumento da segurança energética mundial sem competir com a cadeia alimentícia e sem a geração de resíduos (KHOSHNEVISAN et al. 2019; MOHAN et al., 2016; PARAJULI et al., 2015).

A implementação de biorrefinarias desponta como promissora alternativa na produção de bioenergia e outros produtos de elevado valor agregado a partir de materiais renováveis e subprodutos agroindustriais, atendendo aos critérios de sustentabilidade. A utilização de óleos vegetais (fontes renováveis) já vem sendo empregada para a geração de biocombustíveis, porém, a competição com a indústria de alimentos limita o uso de matérias-primas comestíveis para este fim, promovendo o interesse por alternativas não inseridas na cadeia alimentícia, como os óleos microbianos (MOHAN et al., 2016).

A produção de biodiesel a partir de óleo microbiano tem sido extensivamente estudada por ser um promissor biocombustível de origem renovável, incluindo a utilização de óleos obtidos por microalgas, leveduras e fungos, que apresentam perfil de composição semelhante aos óleos vegetais, fornecendo propriedades adequadas ao biocombustível. A utilização destas biomassas lipídicas microbianas possui diversas vantagens em relação às matérias-primas de origem vegetal, como maior produtividade, menor custo envolvido com a mão de obra, e o fato de não gerar competição com agricultura de alimentos (QIN et al., 2017).

Os fungos filamentosos possuem grande interesse biotecnológico para aplicação em biorrefinarias por apresentarem propriedades estruturais que possibilitam o acúmulo de grande quantidade de material lipídico com fácil recuperação da biomassa cultivada, além de serem produtores de diversos metabólitos de interesse industrial, como enzimas, carotenoides e ácidos graxos

poli-insaturados (AHMAD et al., 2017; FERREIRA et al., 2016; FERREIRA et al., 2013).

Dentro da classe dos *Zigomicetos*, os fungos do gênero *Mucor* são fortes candidatos para a conversão de uma ampla faixa de substratos em biomassa com elevados teores de óleo. A biomassa lipídica obtida no cultivo da espécie *Mucor circinelloides* tem demonstrado potencial para exploração como matéria-prima na síntese de biodiesel (KAMOUN et al., 2019; CARVALHO et al., 2017; CARVALHO et al., 2015; HO; NGO; GUO, 2014; VICENTE et al., 2010) bem como na produção de lipídios concentrados de ácidos graxos poli-insaturados (CARVALHO et al., 2019; ZHANG et al., 2017; ČERTÍK; ADAMECHOVÁ; GUOTHOVÁ, 2013).

A introdução de substratos alternativos como subprodutos e resíduos agrícolas e industriais podem reduzir o custo global de produção de lipídios microbianos, além de permitir enquadrar o processo dentro do conceito de biorrefinaria e bioeconomia circular, aproveitando os subprodutos (UBANDO; FELIX; CHEN, 2020; QIN et al., 2017; GHISELLINI; CIALANI; ULGIATI, 2016). Diferentes resíduos e subprodutos agroindustriais apresentam composição rica em nutrientes adequados para o crescimento microbiano e estão disponíveis em grandes quantidades no mercado por baixos custos, visto que muitas vezes são descartados, queimados ou mal aproveitados. Dentre estes, os substratos mais estudados e avaliados para a produção de lipídios microbianos são derivados da indústria sucroalcooleira (materiais lignocelulósicos, subprodutos ricos em sacarídeos) e da indústria de alimentos (SPALVINS; BLUMBERGA, 2019).

A agroindústria de cana-de-açúcar se encontra bem estabelecida no cenário nacional e mundial como base na produção de etanol e açúcar. No Brasil, foram processadas 547053 mil toneladas de cana-de-açúcar na safra 2018/2019, e apresenta previsão de crescimento para o ano de 2020, de acordo com dados da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICADATA, 2020), gerando 25836 mil toneladas de açúcar e 29224 milhões de litros de etanol. Estes expressivos valores mostram o potencial de exploração dos subprodutos e resíduos gerados no processamento de seus principais produtos (açúcar e etanol).

Desta forma, o presente trabalho teve como proposta desenvolver uma tecnologia de produção de biomassa rica em lipídios pelo cultivo do fungo *Mucor*

circinelloides visando avaliar seu potencial como matéria-prima na geração de produtos de interesse industrial, como biodiesel.

1.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a utilização de derivados da agroindústria de cana-de-açúcar como base de meio de cultivo do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* URM 4182 visando o acúmulo de lipídios (*Single cell oil*), bem como explorar seu potencial na produção de biodiesel e de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. Para alcançar este objetivo, foi proposto um estudo sistemático de produção de biomassa e lipídio microbiano analisando as alterações da composição dos ácidos graxos dos lipídios produzidos a partir de cada meio de cultivo utilizado e sua influência nas propriedades dos produtos finais. Um resumo das etapas desenvolvidas no trabalho é ilustrado na Figura 1.1, cujos principais aspectos abordados compreendem:

- ✓ Avaliar as fontes de carbono comumente encontradas em subprodutos agroindustriais e selecionar as mais adequadas para integrar o meio de cultivo para crescimento de biomassa e acúmulo de lipídios pela linhagem *Mucor circinelloides* URM 4182, tomando por base o perfil de ácidos graxos dos óleos microbianos obtidos nos diversos cultivos;
- ✓ Avaliar o potencial de aplicação de derivados da agroindústria de cana-de-açúcar contendo a fonte de carbono mais adequada para produção de lipídios pela linhagem *Mucor circinelloides* URM 4182 e testar a potencialidade dos óleos para produção de biodiesel;
- ✓ Avaliar a aplicação de lipídios obtidos por *M. circinelloides* URM 4182 cultivado em meio industrial para produção de biodiesel por transesterificação direta via catálise química e produção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados via hidrólise enzimática. Caracterização dos produtos obtidos.

Figura 1.1 – Esquema resumido das etapas desenvolvidas no presente trabalho

Fonte: Próprio autor.

1.3 Estrutura da tese

O presente trabalho de tese encontra-se organizado em 7 capítulos. No primeiro Capítulo apresenta-se a motivação do desenvolvimento do projeto de tese utilizando o fungo filamentoso *Mucor circinelloides* URM 4182 dentro do contexto de biorrefinarias visando contribuir para uma bioeconomia circular. O Capítulo também inclui os objetivos propostos e a estrutura do trabalho.

No segundo Capítulo são abordadas as informações gerais sobre as aplicações do fungo oleaginoso *M. circinelloides*, com foco nos processos de produção de biodiesel, bem como os mecanismos envolvidos na biossíntese lipídica e a utilização de subprodutos agroindustriais como meio de fermentação de baixo custo.

No Capítulo 3 descreve-se a metodologia geral utilizada destacando os materiais, condições reacionais e de cultivo, além também dos métodos de análises aplicados para avaliar todas as etapas envolvidas.

Nos Capítulos 4, 5 e 6 são apresentados os resultados obtidos e sua discussão. No Capítulo 4 é referente a seleção de fontes de carbono comumente encontradas em subprodutos agroindustriais visando sua aplicação no acúmulo

lipídico por *M. circinelloides* e potenciais produtos. O Capítulo 5 é relativo aos experimentos de cultivo do fungo em meio composto por subproduto da agroindústria de cana-de-açúcar, bem como a utilização do óleo microbiano na síntese de biodiesel por via enzimática. O Capítulo 6 é direcionado para obtenção de biodiesel e concentrados de ácidos graxos poli-insaturados a partir do lipídio obtido no cultivo do fungo em meio composto por melaço de cana-de-açúcar. As considerações finais do trabalho desenvolvido, bem como sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no Capítulo 7.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F. B.; ZHANG, Z.; DOHERTY, W. O.; TE'O, V. S.; O'HARA, I. M. Improved microbial oil production from oil palm empty fruit bunch by *Mucor plumbeus*. **Fuel**, v.194, p.180-187, 2017.
- CARVALHO, A. K. F.; RIVALDI, J. D.; BARBOSA, J. C.; CASTRO, H. F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides* – A sustainable pathway for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 47–53, 2015.
- CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B.; REIS, C. E.; DE CASTRO, H. F. Sustainable enzymatic approaches in a fungal lipid biorefinery based in sugarcane bagasse hydrolysate as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 269-275, 2019.
- CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B. S.; RIVALDI, J. D.; DE CASTRO, H. F. Direct transesterification of *Mucor circinelloides* biomass for biodiesel production: Effect of carbon sources on the accumulation of fungal lipids and biofuel properties. **Fuel**, v. 234, p. 789-796, 2018.
- ČERTÍK, 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, n. 2, p. 130-134, 2013.
- 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.
- FERREIRA, J. A.; MAHBOUBI, A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v.215, p.334-345, 2016.
- GHISELLINI, P.; CIALANI, C.; ULGIATI, S. A review on circular economy: the expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. **Journal of Cleaner production**, v. 114, p. 11-32, 2016.
- HO, D. P.; NGO, H. H.; GUO, W. A mini review on renewable sources for biofuel. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 742-749, 2014.
- KAMOUN, O.; MURALITHARAN, G.; BELGHITH, H.; GARGOURI, A.; TRIGUI-LAHIANI, H. Suitable carbon sources selection and ranking for biodiesel production by oleaginous *Mucor circinelloides* using multi-criteria analysis approach. **Fuel**, v.257, p.116117, 2019.
- KHOSHNEVISAN, B.; TABATABAEI, M.; TSAPEKOS, P.; RAFIEE, S.; AGHBASHLO, M.; LINDENEG, S.; ANGELIDAKI, I. Environmental life cycle assessment of different biorefinery platforms valorizing municipal solid waste to bioenergy, microbial protein, lactic and succinic acid. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p. 109493, 2019.

MOHAN, S. V.; NIKHIL, G. N.; CHIRANJEEVI, P.; REDDY, C. N.; ROHIT, M. V.; KUMAR, A. N.; SARKAR, O. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: critical review and future perspectives. **Bioresource Technology**, v.215, p. 2-12, 2016.

PARAJULI, R.; DALGAARD, T.; JØRGENSEN, U.; ADAMSEN, A. P. S.; KNUDSEN, M. T.; BIRKVED, M.; GYLLING, M.; SCHJØRRING, J. K. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.43, p. 244-263, 2015.

QIN, L.; LIU, L.; ZENG, A. P.; WEI, D. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1507-1519, 2017.

SPALVINS, K.; BLUMBERGA, D. Single cell oil production from waste biomass: review of applicable agricultural by-products, **Agronomy Research**, v. 17, n. 3, p. 833-849, 2019.

UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W. H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122585, 2020.

UNICADATA. União da Indústria de Cana-de-açúcar. Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol. Disponível em: <https://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2>. Acesso em: 05 Jan. 2020.

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.

ZHANG, Y.; LUAN, X.; ZHANG, H.; GARRE, V.; SONG, Y.; RATLEDGE, C. Improved γ -linolenic acid production in *Mucor circinelloides* by homologous overexpressing of delta-12 and delta-6 desaturases. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 113, 2017.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biorrefinarias e bioeconomia circular

A contínua urbanização aliada ao crescimento populacional mundial acarreta aumento na demanda de inúmeros recursos, com destaque para a demanda energética, além de tornar os processos industriais atualmente estabelecidos inviáveis em função da geração de resíduos. A necessidade de integração de processos em um ciclo com aproveitamento dos subprodutos, eliminando a geração de resíduos, se torna imprescindível para evitar uma crise mundial (MOHAN et al., 2019; MOHAN et al., 2016; PARAJULI et al., 2015).

A demanda global por energia cresce consideravelmente com o decorrer dos anos (a demanda energética mundial foi de $5,5 \times 10^{20}$ J em 2010, e está previsto um aumento para $6,6 \times 10^{20}$ J em 2020 e para $8,6 \times 10^{20}$ J em 2040), gerando preocupações em relação à dependência de fontes fósseis de energia (atualmente, aproximadamente 80% da energia global produzida é obtida de combustíveis fósseis), que apesar de não terem sido totalmente exploradas ainda, tem sido apontadas como inviáveis em função do esgotamento, elevado custo e consequentes danos ambientais (PARAJULI et al., 2015; GUO; SONG; BUHAIN, 2015; LEIVA-CANDIA et al., 2014). Desta forma, se destaca a urgente necessidade de estabelecer alternativas energéticas renováveis a partir de processos que atendam aos conceitos de sustentabilidade ambiental.

O emprego de biomassa como fonte de energia renovável e biocombustíveis desponta como uma viável alternativa sustentável com papel importante na diminuição dos níveis de carbono, no aumento da segurança energética e no incentivo ao desenvolvimento rural. Apesar das inúmeras vantagens, sobretudo ambientais, as diversas tecnologias envolvidas na geração de bioenergia ainda enfrentam dificuldades de implementação em larga escala devido a situações político-sociais regionais e competição de mercado (FYTILI; ZABANIOTOU, 2017).

Biorrefinarias são conceitualmente semelhantes às tradicionais refinarias de petróleo, gerando múltiplos produtos obtidos a partir de uma única matéria prima, desta forma, o objetivo de uma biorrefinaria é produzir biocombustíveis e produtos de valor agregado a partir de uma fonte renovável por meio de processos

integrados com utilização ou conversão dos subprodutos, sem geração de resíduos (MOHAN et al., 2016; HARISH; RAMAIAH; UPPULURI, 2015; BASTOS, 2012).

A 1ª geração de biorrefinaria se refere principalmente a conversão de matérias-primas comestíveis em biocombustíveis, causando questionamentos em relação a competição com a cadeia alimentícia. Esse conflito propulsionou o desenvolvimento das biorrefinarias de 2ª geração, a partir de materiais não comestíveis, como biomassa lignocelulósica. Entretanto, este tipo de biomassa apresenta complexa composição de celulose, hemicelulose e lignina, que precisam ser convertidos a açúcares fermentescíveis para viabilizar sua utilização na geração de bioenergia. Os processos baseados em rotas bioquímicas mais empregados nesta conversão consistem em pré-tratamento para rompimento da estrutura da parede celular da biomassa para facilitar uma subsequente hidrólise enzimática (JIN et al., 2015).

A 3ª geração de biorrefinarias se baseia em biomassa aquática, sobretudo microalgas, que apresenta grande potencial como fonte de biocombustíveis e diversos produtos de elevado valor agregado. Dentre as vantagens desta abordagem pode-se destacar os elevados rendimentos de crescimento de biomassa e acúmulo lipídico, a eficiência do sequestro de CO₂ atmosférico, e sobretudo sua capacidade de cultivo em águas salobras e de reuso, não competindo com a agricultura por terras aráveis (HARISH; RAMAIAH; UPPULURI, 2015).

A transição para uma economia sustentável já vem sendo instaurada e acredita-se que um de seus princípios fundamentais seja o conceito de economia circular (MOHAN et al., 2019; PHILP; WINICKOFF, 2018). A economia circular representa um sistema econômico baseado na reciclagem e reutilização de matérias-primas, mantendo a capacidade intrínseca dos recursos naturais de se restaurarem com o decorrer do tempo (UBANDO; FELIX; CHEN, 2020; PHILP; WINICKOFF, 2018).

Kirchherr, Reike e Hekkert (2017) analisaram diversas definições de economia circular relatadas na literatura, e descreveram como um sistema econômico baseado em modelos de negócios que substituem o conceito de 'fim de vida', com a utilização de ferramentas para reduzir materiais dos processos,

produções, distribuição e consumo em todos os níveis industriais, desde micro a macro escalas. As principais ferramentas aplicadas com o objetivo de alcançar o desenvolvimento sustentável são reutilizar, reciclar e recuperar materiais, implicando em qualidade ambiental, prosperidade econômica e equidade social, em benefício das gerações atuais e futuras.

Com aplicação deste conceito geral, a utilização de microrganismos com capacidade de acumular matéria lipídica em organelas especializadas se torna uma eficiente ferramenta na integração dos processos de uma biorrefinaria. Dentre os microrganismos oleaginosos estudados para compor esta estrutura, os fungos filamentosos se destacam devido sua versatilidade em fornecer uma ampla gama de produtos de interesse, podendo gerar compostos de valor agregado a partir de seus metabólitos, biomassa e enzimas, além de possuir a capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono, conforme ilustrado na Figura 2.1 (REIS et al., 2019; FERREIRA et al., 2016; FERREIRA et al., 2013).

Figura 2.1 - Conceito de biorrefinaria baseada em fungo filamentoso

Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2016); Ferreira et al. (2013).

2.2 Agroindústria de cana-de-açúcar

O Brasil é um grande produtor de cana-de-açúcar, na safra 2018-2019 foram processadas cerca de 621 milhões de toneladas de cana, que produziram aproximadamente 33 milhões de m³ de etanol e 30 milhões de toneladas de açúcar

(UNICADATA, 2020). Do processamento da cana, os principais subprodutos são o bagaço e a palha, que representam cerca de 28% em base seca do material. Nas últimas décadas, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de promover o processamento do bagaço e da palha para obtenção de açúcares fermentescíveis e, conseqüentemente, etanol de segunda geração e outros produtos de fermentação. Ao analisar a produção da última década (Figura 2.2) é possível verificar que não existe tendência em diminuir o processamento de cana-de-açúcar, se mostrando uma indústria estável com significativo impacto na produção agrícola do país.

Figura 2.2 - Dados de processamento de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol no Brasil nos últimos anos

Fonte: UNICADATA (2020).

Além do etanol, do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, essa agroindústria gera diversos produtos e subprodutos ricos em açúcares e nutrientes, possuindo interesse de aplicações biotecnológicas como fontes de suporte para crescimento microbiano. Spalvins e Blumberga (2019) destacam o potencial de aproveitamento e valorização de alguns derivados ricos em açúcares, como caldo de cana-de-

açúcar e melaço, um subproduto gerado na etapa final do processo de cristalização do açúcar. Os autores relatam que para cada tonelada de açúcar produzido, são gerados 320 kg de melaço, composto principalmente de sacarose residual não suscetível a cristalização, glicose e frutose, além de nutrientes e sais.

2.3 Potencial biotecnológico do fungo filamentoso *Mucor circinelloides*

Os fungos pertencentes à classe dos Zigomicetos têm recebido atenção no campo biotecnológico devido as suas propriedades fisiológicas e estruturais, tendo sido investigado para a produção de diversos produtos metabólicos, como ácidos orgânicos, enzimas, carotenoides e óleo para produção de biocombustíveis. Estes microrganismos são capazes de crescer em uma grande variedade de fontes de carbono, e sua biomassa é constituída principalmente por proteínas, lipídios, aminoácidos, quitosana e quitina, possuindo potencial de aplicação em rações animais e alimentação humana (FERREIRA et al., 2013).

O gênero *Mucor*, possui capacidade de acumular elevados níveis de carotenoides e lipídios em seu micélio, além da capacidade de sintetizar ácidos graxos poli-insaturados, apresentando um perfil ideal de estudo e aplicação como componente essencial de uma biorrefinaria (TANG et al., 2016; VONGSANGNAK et al., 2013).

A espécie *Mucor circinelloides* em particular, tem sido amplamente estudada na obtenção tanto de matéria-prima (lipídios) como de biocatalisadores (lipases) para produção de biocombustíveis (CARVALHO et al., 2019; SZCZĘSNA-ANTCZAK et al., 2018; RIVALDI et al., 2017; CARVALHO et al., 2017; CARVALHO et al., 2015; ANDRADE et al., 2014; VICENTE et al., 2010; VICENTE et al., 2009). Esta espécie apresenta interesse especial devido a sua capacidade de ser aplicada para a geração de diferentes compostos, como pode ser verificado nos diversos estudos (Quadro 2.1) que mostram a eficiência deste fungo em variadas aplicações.

Quadro 2.1 – Estudos utilizando a espécie *Mucor circinelloides*

Linhagem	Foco do estudo	Referência
<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49 e WJ11	Produção de β -caroteno	NAZ et al., 2020
<i>M. circinelloides</i> ZSKP	Produção de quitosana e lipídios	ZININGA et al., 2019
<i>M. circinelloides</i> UCPWFCC 0001	Produção de biossurfactante	DO AMARAL MARQUES et al., 2019
<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49	Produção de GLA (C18:3)	ZHANG et al., 2017
<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49	Produção de carotenoides e SCO	SÁNCHEZ-PUJANTE et al., 2017
<i>M. circinelloides</i> CCF-2617	Produção de GLA (C18:3) e β -caroteno	CERTÍK; ADAMECHOVÁ, GUOTHOVÁ, 2013
<i>M. circinelloides</i> WJ 11, CBS 277.49 e CBS 108.16	Produção de antioxidantes	HAMEED et al., 2017
<i>M. circinelloides</i> URM 4182	SCO para produção de biodiesel	CARVALHO et al., 2018
		CARVALHO et al., 2017
		CARVALHO et al., 2015
		VICENTE et al., 2010; VICENTE et al., 2009
<i>M. circinelloides</i> MU 241		
<i>M. circinelloides</i>	Biorremediação de metais pesados	ZHANG; YANG; CUI, 2017
<i>M. circinelloides</i> WJ 11 e CBS 277.49	Produção de lipases	ZAN et al., 2016
<i>M. circinelloides</i> CBS 277.49	Produção de β -caroteno	ZHANG et al., 2016
<i>M. circinelloides</i> WJ11	Análise proteômica durante o acúmulo lipídico	TANG et al., 2016 TANG et al., 2017
<i>M. circinelloides</i>	Produção de lipases e lipídios	SZCZĘSNA-ANTCZAK et al., 2018

Fonte: Próprio autor.

Reis et al. (2019) destacam o potencial do fungo *M. circinelloides* na produção de lipídios e enzimas (como lipases, amilases e celulasas), assim como também apontam a capacidade de síntese de outros metabólitos secundários,

como carotenoides e ácidos orgânicos de elevado valor agregado. É importante destacar que este fungo foi o primeiro microrganismo a ser usado comercialmente para produzir óleo rico em ácido α -linolênico (GLA, C18:3) (TANG et al., 2015). O processo em escala comercial para produção de óleo a partir do cultivo de *Mucor circinelloides* foi implementado em 1985, pela empresa JE Sturge no Reino Unido (ARJUNA, 2014; RATLEDGE, 1992).

Esta espécie (anteriormente classificada como *Mucor javanicus*) é também relatada em estudos que utilizam ferramentas de engenharia genética que contribuem para viabilizar sua implementação industrial com otimização dos rendimentos (TANG et al., 2016).

2.3.1. Biossíntese lipídica microbiana

Nos microrganismos oleaginosos, geralmente o acúmulo lipídico ocorre durante o seu crescimento principalmente em meios com elevadas concentrações de açúcares e limitação de algum nutriente (SUBHASH; MOHAN, 2014). Os mecanismos metabólicos responsáveis pelo acúmulo lipídico em microrganismos já apresentam diversos aspectos elucidados, com pequenas variações entre as rotas propostas. Apesar da maioria das enzimas envolvidas serem as mesmas para fungos e leveduras, os mecanismos que operam em fungos filamentosos são mais complexos e ainda apresentam aspectos moleculares não completamente conhecidos (VONGSANGNAK et al., 2016; HUANG et al., 2013; WYNN et al., 2001).

A biossíntese lipídica microbiana envolve a síntese de ácidos graxos e de triacilgliceróis, que são dependentes do fornecimento de precursores essenciais como acetil-CoA e NADPH. O ciclo citosólico de trans-hidrogenase e o ciclo citrato/malato fornecem estes precursores necessários na biossíntese, dessaturação e aumento das cadeias de ácidos graxos conforme ilustrado na Figura 2.3 (REIS et al., 2019; VONGSANGNAK et al., 2016; CHRISTOPHE et al., 2012).

A maioria dos microrganismos apresenta um processo metabólico lipogênico complexo que associa enzima málica, ATP: citrato liase e isocitrato desidrogenase para criar uma via para os metabólitos (NADPH e acetil-CoA) em direção aos sítios

ativos da ácido graxo sintase. Os ácidos graxos são convertidos a triacilgliceróis no retículo endoplasmático, onde também ocorre a elongação e dessaturação (VONGSANGNAK et al., 2016; LIANG; JIANG, 2015; CHRISTOPHE et al., 2012).

Figura 2.3 - Rota metabólica sugerida para a síntese de lipídios por *M. circinelloides*

Fonte: Adaptado de Reis et al. (2019).

Esta via de lipogênese é desencadeada por um desequilíbrio nutricional no meio de cultivo, as células continuam assimilando a fonte de carbono mesmo quando um nutriente importante se esgota (geralmente nitrogênio). A limitação de nitrogênio causa um decaimento de atividade da isocitrato dehidrogenase devido a diminuição da concentração de seu regulador alostérico, causando uma mudança no fluxo de carbonos por meio do ciclo do ácido cítrico para a biossíntese lipídica (TANG et al., 2016).

2.4 Biodiesel

Biodiesel é um biocombustível não tóxico, seguro e renovável que se destaca como promissora fonte limpa de energia, é obtido a partir de diversas fontes oleaginosas e possui principal aplicação em motores de ignição por compressão (ciclo Diesel). Produzido pelo processo de transesterificação de

triacilgliceróis e/ou esterificação de ácidos graxos livres presentes em diferentes matérias-primas oleaginosas, o biodiesel também é definido como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos com alcoóis de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol (ANP, 2020; LOURINHO; BRITO, 2015).

Considerando a realidade agroindustrial atual, a produção de biodiesel utiliza em sua maior parte óleos vegetais comestíveis, que além de competir com o suprimento alimentício, apresenta limitações em relação a rendimento e estabilidade oxidativa (QIN et al., 2017; LI et al., 2013).

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP-Brasil), o Brasil produziu 5.898.846 m³ de biodiesel no ano de 2019, e tende a crescer devido ao aumento de demanda em virtude da legislação nacional, esta tendência de crescimento pode ser visualizada no gráfico da Figura 2.4 que mostra o aumento da produção nacional nos últimos anos. O artigo 2º da Lei nº 11.097/2005 introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira por meio da obrigatoriedade da sua mistura ao diesel fóssil em todo o território nacional com um aumento gradual da concentração do biodiesel, partindo de 2% em 2008, alcançando 8% em 2017 e 10% em 2018 (Lei nº 13.263/2016, ANP-BRASIL, 2020).

Figura 2.4 – Evolução da produção de biodiesel no Brasil (2010-2019)

Fonte: ANP (2020).

2.4.1 Matérias-primas

O uso de óleos vegetais comestíveis como matéria-prima na produção de biodiesel já vem sendo aplicado industrialmente com sucesso nos últimos anos (considerados a 1ª geração de biodiesel). Este processo atual, apesar de eficiente, apresenta a limitação de mercado devido a competição com a indústria de alimentos (de acordo com a ANP-Brasil (2020) em média 70% do biodiesel nacional é derivado do óleo de soja). Visando amenizar esta limitação, a 2ª geração inclui matérias-primas não comestíveis como óleos de pinhão-manso, palma, macaúba, sebo bovino, óleos e gorduras residuais, entre outros (SAWANGKEAWA; NGAMPRASERTSITH, 2013).

As matérias-primas de 3ª geração visam diminuir também a competição com a agricultura por terras aráveis, deste modo a utilização de lipídios derivados de microrganismos fotossintéticos (microalgas e cianobactérias) se destaca como uma das mais promissoras alternativas, com rápida taxa de crescimento de biomassa e facilidade de cultivo, porém os elevados custos e a necessidade de iluminação artificial ainda causam dificuldade na sua ampliação industrial (SILLS et al., 2020; BHUIYA et al., 2015; CHEN et al., 2015).

A utilização de óleos microbianos provenientes de bactérias, fungos e leveduras, vem se destacando como uma potencial alternativa de matéria-prima para biocombustíveis, com vantagens extremamente atrativas, como a elevada taxa de crescimento e produtividade lipídica, com capacidade de acumular entre 20 e 70% de lipídios em massa seca, tornando-os mais eficiente em termos de produção de biocombustível que as plantas oleaginosas. Outras vantagens incluem menor necessidade de mão de obra e menor influência climática (PARSONS et al., 2019; QIN et al., 2017).

2.4.2 Catalisadores

Os catalisadores atuam reduzindo a energia de ativação da reação e podem ser agrupados em homogêneos ou heterogêneos, químicos ou enzimáticos, conforme mostrado no Quadro 2.2 que resume algumas vantagens e desvantagens de cada grupo (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

Quadro 2.2 - Principais classes de catalisadores aplicados na síntese de biodiesel

Catalisador		Exemplo	Vantagens	Desvantagens
Alcalino	Homogêneo	NaOH, KOH Metóxidos	Alta atividade catalítica; baixo custo	Requerem baixos níveis de ácidos graxos livres, formação de sabões;
	Heterogêneo	CaO, CaTiO ₃ , KOH/NaY, zeolita	Não corrosivos; reutilizáveis; fácil separação; alta seletividade	Requerem baixos níveis de AGL; limitação de difusão; alto custo
Ácido	Homogêneo	H ₂ SO ₄ concentrado	Também catalisa esterificação; evita formação de sabão	Corrosão de equipamentos; geração de resíduos ácidos
	Heterogêneo	Nb ₂ O ₅ , ZnO/I ₂ , TiO ₂ / SO ₄ ²⁻ , HPMo/Al ₂ O ₃	Também catalisa esterificação; reutilizável	Requer alta temperatura e pressão de reação; limitações de difusão; custo elevado
Enzima		Lipase	Também catalisa esterificação; não poluente; fácil purificação do produto; podem ser reutilizadas quando imobilizadas	Custo elevado; sensibilidade à desnaturação

Fonte: adaptado de Leung; Wu; Leung (2010).

Os catalisadores homogêneos alcalinos são os mais aplicados industrialmente devido a seu baixo custo e elevada eficiência catalítica, entretanto, as desvantagens tipicamente associadas ao uso destes catalisadores incluem dificuldade de recuperação do produto, elevado consumo de energia, saponificação e geração de grandes quantidades de águas residuais (LOURINHO; BRITO, 2015).

Vários catalisadores heterogêneos vêm sendo classificados como os mais vantajosos devido a sua fácil recuperação, diminuindo custos de purificação e contribuindo com as exigências de órgãos ambientais. Os catalisadores heterogêneos incluem uma enorme variedade de materiais, incluindo zeólitas, óxidos e sais orgânicos, resinas de troca iônica e enzimas imobilizadas (CORDEIRO et al., 2011; LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

A transesterificação de óleos microbianos e demais óleos de elevado índice de acidez, requer a utilização de catalisadores de caráter ácido ou bioquímico, para favorecer a reação de esterificação dos ácidos graxos livres, evitando desta forma a reação de saponificação (CARVALHO et al., 2017; LEUNG; WU; LEUNG, 2010). Heteropoliácidos com estruturas de Keggin, como $H_3PW_{12}O_{40}$, $H_4SiW_{12}O_{40}$, $H_3PMo_{12}O_{40}$ e $H_4SiMo_{12}O_{40}$, são descritos como eficientes catalisadores em reações de trans/esterificação devido sua capacidade de atuar na presença de certa quantidade de água e ácidos graxos livres com características adequadas de alta mobilidade de prótons. A utilização destes catalisadores suportados em matrizes sólidas apresenta ainda as vantagens de maior estabilidade e possibilidade de fácil recuperação e reutilização (CARVALHO et al., 2017; DA CONCEIÇÃO et al., 2019).

Do ponto de vista ambiental, a classe dos catalisadores bioquímicos é a alternativa mais benéfica, aplicando enzimas que atuam em condições brandas de temperatura e pressão com elevados rendimentos e diversas vantagens biotecnológicas. A classe de enzimas mais importante na catálise das reações de transesterificação, esterificação e hidrólise, é a classe das lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3), que apresentam grande compatibilidade com as variações das matérias-primas lipídicas atuando em meios reacionais com elevados teores de ácidos graxos livres e água. A aplicação de lipases imobilizadas permite sua fácil recuperação e reutilização, além de permitir a operação em processos em regime contínuo, fornecendo elevada produtividade e viabilizando sua aplicação industrial (POPPE et al., 2015).

De acordo com Ortiz et al. (2019), talvez o biocatalisador disponível comercialmente mais utilizado tanto industrialmente quanto para fins acadêmicos, é a lipase imobilizada Novozym 435, produzido pela Novozymes por imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em resina polimérica acrílica macroporosa (Lewatit VP OC 1600) via ativação interfacial. Este biocatalisador apresenta grande potencial de aplicação em reações de transesterificação e esterificação. A lipase de *Candida rugosa* também é relatada na literatura como um biocatalisador amplamente aplicado sobretudo na hidrólise de triacilgliceróis para produção de ácidos graxos livres, mono- e diacilgliceróis, e na esterificação e transesterificação em meios orgânicos (BARRIUSO et al., 2016).

2.5 Síntese de biodiesel microbiano

A síntese de biodiesel em escala industrial ocorre sobretudo a partir da transesterificação de óleos vegetais com álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) via catálise homogênea. Esta reação ocorre em três etapas consecutivas e reversíveis nas quais os triacilgliceróis (TAG) são convertidos a ésteres e glicerol, como ilustrado na Figura 2-3 (LOURINHO; BRITO, 2015; KNOTHE et al., 2006).

A composição lipídica de fungos e leveduras oleaginosos é majoritariamente de triacilgliceróis, principalmente das séries C16 e C18 de ácidos graxos, se assemelhando a composição de óleos vegetais como óleos de soja, girassol, palma, canola, pinhão manso, entre outros, esta semelhança permite sua direta integração aos processos já estabelecidos de transesterificação, diminuindo custos com desenvolvimento e aprimoramento de novas rotas tecnológicas (CARVALHO et al., 2015; THILIVEROS; KIRAN; WEBB, 2014).

A conversão de lipídios de *M. circinelloides* em biodiesel vem sendo avaliada com resultados promissores a partir de diversas rotas de produção (REIS et al., 2019). Uma das primeiras abordagens em desenvolver rotas eficientes de conversão de lipídios de fungos a biodiesel foi desenvolvido por Vicente et al. (2009), que avaliaram rotas de conversão em uma e duas etapas, isto é, utilizando biomassa oleaginosa e lipídios extraídos, respectivamente. Os lipídios de *M. circinelloides* apresentam alta acidez devido à concentração relativamente alta de ácidos graxos livres, causando limitação na escolha dos catalisadores adequados que se limitam aos tipos ácidos ou enzimáticos (REIS et al., 2019; CARVALHO et al., 2017).

O estudo de aplicação de técnicas intensificadoras de processo, como aplicação de ultrassonificação, irradiação de micro-ondas e cavitação hidrodinâmica, também são ferramentas amplamente utilizadas para a otimização dos processos de síntese de biodiesel (CHIPURICI et al., 2019). Carvalho et al. (2018) analisaram o efeito da irradiação de micro-ondas na síntese enzimática de biodiesel a partir de lipídios de *M. circinelloides* e registraram valores de 98,5% de teor de ésteres em 10 h de reação, comprovando a eficácia do método aplicado.

Figura 2.5 - Etapas da reação de transesterificação de triacilgliceróis

Fonte: Adaptado de Knothe et al. (2006).

2.5.1. Síntese de biodiesel via transesterificação direta

A abordagem de transesterificação direta tem emergido como uma vantajosa rota que visa a diminuição dos custos do processo global por meio da eliminação de uma etapa prévia de extração de óleo da semente ou biomassa, unindo as etapas de extração e reação. Diversos estudos utilizando esta técnica para a produção de biodiesel vem sendo reportados a partir de matérias-primas vegetais e microbianas (GO et al., 2016), alguns estudos realizados envolvendo a transesterificação direta de biomassas microbianas encontram-se detalhados na Tabela 2.1.

Conforme mostrado na Tabela 2.1, os principais estudos envolvendo transesterificação direta de biomassa microbiana fazem uso de catalisadores homogêneos, atingindo elevados rendimentos (SARA; BRAR; BLAIS, 2016; VICENTE et al., 2010). Todavia, catalisadores heterogêneos apresentam diversas vantagens, como facilidade de recuperação e reutilização, e seu uso também tem sido considerado como alternativa sustentável na transesterificação direta de microrganismos. Carvalho et al. (2017) mostraram a eficiência do catalisador H_3PMo suportado em Al_2O_3 na reação direta de biomassa de *M. circinelloides*, indicando o potencial desta classe de catalisadores.

Tabela 2.1 – Microrganismos utilizados para produção de biodiesel via transesterificação direta

Microrganismo	Catalisador	Rendimento	Referência
Algas			
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	HCl	90%	KIM; IM; LEE, 2015
<i>Chlorella vulgaris</i>	Lipase imobilizada	96%	TRAN; CHEN; CHANG, 2013
Leveduras			
<i>Trichosporon oleaginosus</i>	NaOH	99,0%	SARA; BRAR; BLAIS, 2016
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	NaOH, H_2SO_4	97,7%	THILIVEROS; KIRAN; WEBB, 2014
<i>Lipomyces starkeyi</i>	H_2SO_4 , HCl, H_3PO_4	96,8%	LIU; ZHAO, 2007
<i>Yarrowia lipolytica</i>	H_2SO_4	NR*	HOARAU et al., 2016
Fungos			
<i>Aspergillus niger</i>	H_2SO_4	NR*	HOARAU et al., 2016
<i>Mortierella isabellina</i>	H_2SO_4 , HCl, H_3PO_4	91,0%	LIU; ZHAO, 2007
<i>Mucor circinelloides</i>	BF_3 , H_2SO_4 , HCl	99%	VICENTE et al., 2010
<i>Mucor circinelloides</i>	$HPMo/Al_2O_3$	97%	CARVALHO et al., 2017

*NR: não reportado.

Fonte: Próprio autor.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Disponível em: <http://www.anp.gov.br/> Acesso em: 15 Jan. 2020.
- ARJUNA, A. Production of polyunsaturated fatty acids by fungi: a review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 5, p. 931-954, 2014.
- BARRIUSO, J.; VAQUERO, M. E.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 874-885, 2016.
- BASTOS, V. D. Biorrefinaria, biocombustíveis e química renovável: revolução tecnológica e financiamento. **Revista BNDES**, v. 38, p. 1-27, 2002.
- 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**, v.55, p.1109-1128, 2015;
- CARVALHO, A. K.; RIVALDI, J. D.; BARBOSA, J. C.; DE CASTRO, H. F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides*—A sustainable pathway for biofuel production. **Bioresource Technology**, v.181, p.47-53, 2015.
- CARVALHO, A. K. F.; DA CONCEIÇÃO, L. R. V.; SILVA, J. P. V.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel production from *Mucor circinelloides* using ethanol and heteropolyacid in one and two-step transesterification. **Fuel**, v.202, p.503-511, 2017.
- CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B. S.; IZÁRIO FILHO, H. J.; DE CASTRO, H. F. Approaches to convert *Mucor circinelloides* lipid into biodiesel by enzymatic synthesis assisted by microwave irradiations. **Renewable energy**, v. 125, p. 747-754, 2018.
- 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.
- 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.

CHIPURICI, P.; VLAICU, A.; CALINESCU, I.; VINATORU, M.; VASILESCU, M.; IGNAT, N. D.; MASON, T. J. Ultrasonic, hydrodynamic and microwave biodiesel synthesis—A comparative study for continuous process. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 57, p. 38-47, 2019.

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.

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.

DA CONCEIÇÃO, L. R. V.; REIS, C. E. R.; DE LIMA, R.; CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F. Keggin-structure heteropolyacid supported on alumina to be used in trans/esterification of high-acid feedstocks. **RSC advances**, v. 9 n.41, p. 23450-23458, 2019.

DO AMARAL MARQUES, N. S. A.; DE LIMA, T. A.; DA SILVA ANDRADE, R. F.; JÚNIOR, J. F. B.; OKADA, K.; TAKAKI, G. M. C. Lipopeptide biosurfactant produced by *Mucor circinelloides* UCP/WFCC 0001 applied in the removal of crude oil and engine oil from soil. **Acta Scientiarum Technology**, v. 41, 2019.

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.

FERREIRA, J. A.; MAHBOUBI, A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v.215, p.334-345, 2016.

FYTILI, D.; ZABANIOTOU, A. Social acceptance of bioenergy in the context of climate change and sustainability—A review. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v.8, p.5-9, 2017.

GO, A. W.; SUTANTO, S.; ONG, L. K.; TRAN-NGUYEN, P. L.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. Developments in in-situ (trans) esterification for biodiesel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 284-305, 2016.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.42, p.712-725, 2015.

HAMEED, A.; HUSSAIN, S. A.; YANG, J.; IJAZ, M. U.; LIU, Q.; SULERIA, H. A. R.; SONG, Y. Antioxidants potential of the filamentous fungi (*Mucor circinelloides*). **Nutrients**, v.9, n.10, p.1101, 2017.

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.

HOARAU, J.; CARO, Y.; PETIT, T.; GRONDIN, I. Evaluation of direct wet transesterification methods on yeast and fungal biomass grown on sugarcane distillery spent wash. **Chemical Engineering & Process Techniques**, v. 2, n. 3, pp.1032, 2016.

HUANG, C.; CHEN, X. F.; XIONG, L.; MA, L. L.; CHEN, Y. Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. **Biotechnology Advances**, v. 31, n.2, p. 129-139, 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.

KIM, B.; IM, H.; LEE, J. W. In situ transesterification of highly wet microalgae using hydrochloric acid. **Bioresource Technology**, v.185, p.421-425, 2015.

KIRCHHERR, J.; REIKE, D.; HEKKERT, M. Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 127, p. 221-232, 2017.

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

LEIVA-CANDIA, D. E.; PINZI, S.; REDEL-MACÍAS, M. D.; KOUTINAS, A.; WEBB, C.; DORADO, M. P. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v.123, p.33-42, 2014.

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, Y.; YE, B.; SHEN, J.; TIAN, Z.; WANG, L.; ZHU, L.; MA, T.; YANG, D.; QIU, F. Optimization of biodiesel production process from soybean oil using the sodium potassium tartrate doped zirconia catalyst under microwave chemical reactor. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 220-225, 2013.

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, B.; ZHAO, Z. K. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, n.8, p.775-780, 2007.

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

MOHAN, S. V.; DAHIYA, S.; AMULYA, K.; KATAKOJWALA, R.; VANITHA, T. K. Can circular bioeconomy be fueled by waste biorefineries—A closer look. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100277, 2019.

MOHAN, S. V.; NIKHIL, G. N.; CHIRANJEEVI, P.; REDDY, C. N.; ROHIT, M. V.; KUMAR, A. N.; SARKAR, O. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: critical review and future perspectives. **Bioresource Technology**, v.215, p. 2-12, 2016.

NAZ, T.; NOSHEEN, S.; LI, S.; NAZIR, Y.; MUSTAFA, K.; LIU, Q.; SONG, Y. Comparative analysis of β -carotene production by *Mucor circinelloides* strains CBS 277.49 and WJ11 under light and dark conditions. **Metabolites**, v. 10, n. 1, p. 8-52, 2020.

ORTIZ, C.; FERREIRA, M. L.; BARBOSA, O.; DOS SANTOS, J. C.; RODRIGUES, R. C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; BRIAND, L. E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? **Catalysis Science & Technology**, v. 9, n. 10, p. 2380-2420, 2019.

PARAJULI, R.; DALGAARD, T.; JØRGENSEN, U.; ADAMSEN, A. P. S.; KNUDSEN, M. T.; BIRKVED, M.; SCHJØRRING, J. K. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.43, p.244-263, 2015.

PARSONS, S.; ABELN, F.; MCMANUS, M. C.; CHUCK, C. J. Techno-economic analysis (TEA) of microbial oil production from waste resources as part of a biorefinery concept: assessment at multiple scales under uncertainty. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 3, p. 701-711, 2019.

PHILP, J.; WINICKOFF, D. Realising the circular bioeconomy. **OECD Science, Technology and Industry Policy Papers**, n. 60, 2018.

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.

QIN, L.; LIU, L.; ZENG, A. P.; WEI, D. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. **Bioresource Technology**, v.245, p.1507-1519, 2017.

RATLEDGE, C. Microbial oxidations of fatty alcohols and fatty acids: biodegradation and biotransformations of oils and fats. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 399-400, 1992.

REIS, C. E. R.; BENTO, H. B. S.; CARVALHO, A. K. F.; RAJENDRAN, A.; HU, B.; DE CASTRO, H. F. Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 555-570, 2019.

RIVALDI, J. D.; CARVALHO, A. K. F.; DA CONCEIÇÃO, L. R. V.; DE CASTRO, H. F. Assessing the potential of fatty acids produced by filamentous fungi as feedstock for biodiesel production. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 10, p. 970-976, 2017.

SÁNCHEZ-PUJANTE, P. J.; MIRAS-MORENO, B.; SOLUYANOVA, P.; GARRE, V.; PEDREÑO, M. A.; ALMAGRO, L. Production of fatty acid methyl esters and other bioactive compounds in elicited cultures of the fungus *Mucor circinelloides*. **Mycological progress**, v. 16, n. 5, p. 507-512, 2017.

SARA, M.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F. Comparative study between microwave and ultrasonication aided in situ transesterification of microbial lipids. **RSC Advances**, v. 6, n. 61, p. 56009-56017, 2016.

SAWANGKEAW, R.; NGAMPRASERTSITH, S. A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25, p. 97-108, 2013.

SILLS, D. L.; VAN DOREN, L. G.; BEAL, C.; RAYNOR, E. The effect of functional unit and co-product handling methods on life cycle assessment of an algal biorefinery. **Algal Research**, v. 46, p. 101770, 2020.

SPALVINS, K.; BLUMBERGA, D. Single cell oil production from waste biomass: review of applicable agricultural by-products, **Agronomy Research**, v. 17, n. 3, p. 833-849, 2019.

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.

SZCZĘSNA-ANTCZAK, M.; STRUSZCZYK-ŚWITA, K.; RZYSKA, M.; SZELAĞ, J.; STANČZYK, Ł.; ANTCZAK, T. Oil accumulation and in situ trans/esterification by lipolytic fungal biomass. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 110-118, 2018.

TANG, X.; CHEN, H.; CHEN, Y. Q.; CHEN, W.; GARRE, V.; SONG, Y.; RATLEDGE, C. Comparison of biochemical activities between high and low lipid-producing strains of *Mucor circinelloides*: an explanation for the high oleaginity of strain WJ11. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

TANG, X.; ZAN, X.; ZHAO, L.; CHEN, H.; CHEN, Y. Q.; CHEN, W.; RATLEDGE, C. Proteomics analysis of high lipid-producing strain *Mucor circinelloides* WJ11: an explanation for the mechanism of lipid accumulation at the proteomic level. **Microbial Cell Factories**, v.15, p.35, 2016.

THLIVEROS, P.; KIRAN, E.U.; WEBB, C. Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. **Bioresource Technology**, v.157, p.181 – 187, 2014.

TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* ESP-

31 for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst. **Bioresource Technology**, v.135, p.213-221, 2013.

UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W. H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122585, 2020.

UNICADATA. União da Indústria de Cana-de-açúcar. Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol. Disponível em: <https://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2>. Acesso em: 05 Jan.2020.

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.

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.

VONGSANGNAK, W.; KLANCHUI, A.; TAWORNSAMRETKIT, I.; TATIYABORWORNCHAI, W.; LAOTENG, K.; MEECHAI, A. Genome-scale metabolic modeling of *Mucor circinelloides* and comparative analysis with other oleaginous species. **Gene**, v.583, p.121-129, 2016.

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 alpine*. **Microbiology**, v. 147, p. 2857-2864, 2001ZAN et al., 2016.

ZAN, X.; TANG, X.; CHU, L.; ZHAO, L.; CHEN, H.; CHEN, Y. Q.; SONG, Y. Lipase genes in *Mucor circinelloides*: identification, sub-cellular location, phylogenetic analysis and expression profiling during growth and lipid accumulation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.43, p.1467-1480, 2016.

ZHANG, Y.; NAVARRO, E.; CÁNOVAS-MÁRQUEZ, J. T.; ALMAGRO, L.; CHEN, H.; CHEN, Y. Q.; GARRE, V. A new regulatory mechanism controlling carotenogenesis in the fungus *Mucor circinelloides* as a target to generate β -carotene over-producing strains by genetic engineering. **Microbial Cell Factories**, v.15, p.99, 2016.

ZHANG, Y.; LUAN, X.; ZHANG, H.; GARRE, V.; SONG, Y.; RATLEDGE, C. Improved γ -linolenic acid production in *Mucor circinelloides* by homologous overexpressing of delta-12 and delta-6 desaturases. **Microbial Cell Factories**, v.16, p.113, 2017.

ZHANG, X.; YANG, H.; CUI, Z. *Mucor circinelloides*: efficiency of bioremediation response to heavy metal pollution. **Toxicology Research**, v.4, 2017.

ZININGA, J. T.; PURI, A. K.; GOVENDER, A.; SINGH, S.; PERMAUL, K. Concomitant production of chitosan and lipids from a newly isolated *Mucor circinelloides* ZSKP for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 545-551, 2019.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 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) e previamente selecionada como potencial fonte de lipídios (Carvalho, 2015). 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.

3.1.2 Fontes de carbono e nutrientes

Como fontes de carbono foram utilizadas: glicose (Vetec); frutose (Vetec), glicerol (Vetec), amido (Vetec), sacarose (Vetec) e xilose (Vetec). Também foram utilizados meios de cultivo elaborados com derivados da indústria sucroalcooleira nacional, como caldo de cana-de-açúcar (adquirido de fornecedor local na cidade de Lorena-SP), melaço de cana-de-açúcar (fornecido por Mellaço de Cana, Saltinho-SP) e melado de cana-de-açúcar comercial (Caseiro e Natural Alimentos Ltda).

Como nutrientes foram utilizados: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma-Aldrich), cloridrato de tiamina (Sigma-Aldrich), ácido nicotínico (Synth), ácido glutâmico (Sigma-Aldrich) e extrato de levedura (Sigma-Aldrich).

3.1.3 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: heteropoliácido suportado em alumina ($\text{H}_3\text{PMo}/\text{Al}_2\text{O}_3$) preparado pelo método *Incipient Wetness Impregnation* de acordo com metodologia descrita por Conceição et al., 2019. Na reação de hidrólise foi utilizada a lipase microbiana de *Candida rugosa* (Tipo VII) na forma solúvel (atividade hidrolítica = 15800 U g^{-1}) adquirida da Sigma-Aldrich.

3.1.4 Outros materiais

Outros reagentes utilizados foram clorofórmio (Cromoline), heptano (Cromoline), metanol anidro (Vetec), etanol anidro (Cromoline), etanol 96% (Cromoline), sulfato de sódio anidro (Cromoline), triton 100-X (VETEC), argila Chamotte e padrões cromatográficos para quantificação dos ácidos graxos (Sigma-Aldrich).

3.1.5 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados foram: cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Agilent); Cromatógrafo a gás modelo GC-3800 (Varian, Estados Unidos), viscosímetro (Modelo Brookfield LV-DV-II), reator de micro-ondas (Modelo Discover/University-Wave, Cem Corporation), reator de micro-ondas (Titan MPS™ Perkin Elmer®), potenciômetro modelo mPA-210 (Sppencer), processador ultrassônico (Modelo UP2005 Hielscher), rota evaporador (Modelo 801, Fisatom), centrífuga (Modelo 206 BL, Excelsa II, Fanem), balança analítica acoplado com lâmpada de IV (Shimadzu Model MOC63u, EUA), placa provida de agitação magnética e temperatura controladas modelo 752A (Fisatom, Brasil), Karl Fisher (Modelo Koehler AKF5000), 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 de aço inoxidável (Parr Series 5500 Reactor System).

3.2 Metodologia Experimental

3.2.1 Preparo da suspensão de esporos

Após o crescimento das células em meio BDA (Batata Dextrose Agar), os esporos foram suspensos em 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^{-1} de meio de cultivo.

3.2.2 Cultivos em frascos agitados

Os meios foram compostos por 40 g L^{-1} de fonte de carbono suplementado com nutrientes (sulfato de amônia, 1,5 g L^{-1} ; ácido glutâmico, 1,5 g L^{-1} ; ácido nicotínico, 1 mg L^{-1} ; tiamina, 1 mg L^{-1} e extrato de levedura, 0,5 g L^{-1}).

Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo foram inoculados com uma suspensão 1×10^5 esporos mL^{-1} e incubados em *shaker* orbital (250 rpm) a 26 °C por um período máximo de 120 h. O pH do cultivo foi medido potenciômetro modelo mPA-210 (Spencer) e ajustado manualmente para 4,5 por meio da adição de NaOH 1,0 mol L^{-1} . Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Em períodos pré-determinados dois frascos eram retirados do *shaker* e o meio de cultura separado das células por filtração a vácuo. Na biomassa celular foi determinada a concentração de biomassa e teor de lipídios.

3.2.3 Cultivos 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 3.1).

No biorreator foram realizados cultivos com volume de 700 mL de meio, foi inoculado com uma suspensão de esporos de 1×10^5 esporos mL^{-1} e o cultivo 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 0,1 mol L⁻¹ ou H₂SO₄ 0,1 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)

Figura 3.1 – Biorreator utilizado nos cultivos de *Mucor circinelloides*

Fonte: Próprio autor.

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, assim como a concentração de açúcares residuais.

3.2.4 Extração de lipídios da biomassa de *M. circinelloides* URM 4182

Foram realizadas extrações conduzidas em três ciclos de 1 hora cada 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. A temperatura dentro da câmara foi controlada mediante variação automática da potência de micro-ondas sendo a máxima de 100 W. Os lipídios foram extraídos das células com umidade entre 70-85% e a extração foi realizada utilizando 0,5 g de biomassa fúngica (base seca) suspensa em 50 mL de etanol 96% utilizado como solvente, baseando-se na metodologia descrita por Carvalho et al. (2015). Os óleos extraídos foram analisados em função de sua composição em ácidos graxos.

3.2.5 Síntese de ésteres etílicos

A síntese de ésteres etílicos foi realizada via transesterificação dos lipídios de *M. circinelloides* URM 4182 com etanol via catálise heterogênea enzimática e química segundo metodologias previamente estabelecidas por Carvalho et al. (2017) e Carvalho et al. (2018).

3.2.5.1 Reações de transesterificação via enzimática

As reações enzimáticas foram realizadas sob irradiação de micro-ondas em um reator esférico de vidro (125 mL) contendo 10 g de meio reacional composto por óleo ou biomassa microbiana e etanol (razão molar óleo:álcool = 1:12) e 20% em massa de Novozym[®] 435 como catalisador em relação aos lipídios. Iso-octano foi utilizado como solvente e as reações foram realizadas a temperatura de 60 °C mantida por micro-ondas à potência máxima de 100 W por 12 h sob agitação magnética. Foi utilizado um reator de micro-ondas modelo Discover/University-Wave (Cem Corporation) acoplado com condensador de refluxo.

Após as reações, o catalisador foi separado da mistura contendo os produtos (ésteres etílicos) e reagentes por centrifugação a 1570 G por 15 min. O catalisador foi recuperado e a mistura remanescente foi purificada usando argila Chamotte para a remoção do glicerol, conforme descrito por Santos et al. (2017). O excesso de etanol foi removido em um rota-evaporador a 80 °C/ 30 min. Foi adicionado sulfato de sódio para remover vestígios de água do produto final (ésteres etílicos).

3.2.5.2 Reações de transesterificação via química

As reações químicas foram realizadas empregando a abordagem de transesterificação direta da biomassa oleaginosa, sem prévia extração, em um reator de aço inoxidável pressurizado (Reator Parr Series 5500) com agitação magnética (300 rpm) a 200 °C durante 6 h. O catalisador heteropoliácido suportado em alumina (HPMo/Al₂O₃) foi preparado pelo método de impregnação *incipient-wetness*. A massa do heteropoliácido (HPMo) foi dissolvida em solução alcoólica 70% m/m à temperatura ambiente, transferida para um cadinho contendo o suporte previamente calcinado (Al₂O₃) e misturada. O sólido catalítico foi seco à 100 °C por 1 h, seguida de calcinação à 300 °C por 4 h (CONCEIÇÃO et al., 2018). A impregnação foi realizada 3 vezes seguidas.

As influências dos parâmetros reacionais razão molar e concentração de catalisador foram avaliadas utilizando metodologia de superfície de resposta a partir de um planejamento fatorial de composição centrada. Os fatores selecionados e os níveis avaliados estão indicados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Níveis e fatores utilizados no planejamento fatorial aplicado às reações de transesterificação direta via catálise química

Variáveis	Nível		
	-1	0	+1
Razão Molar (etanol:óleo)	60	90	120
Concentração de Catalisador (%)	5	10	15

Fonte: Próprio autor.

3.2.6 Hidrólise enzimática do óleo de *M. circinelloides*

As reações de hidrólise foram realizadas em reatores de vidro de 50 mL contendo 2 g de óleo microbiano, tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ (pH 7,0) e Triton-X 100 como emulsificante. Hexano foi adicionado como solvente e a reação foi realizada por um período máximo de 3 horas a 40 °C sob agitação magnética. A influência da concentração de biocatalisador foi analisada pela aplicação de lipase de *Candida rugosa* nas concentrações de 10, 20 e 30% em relação a massa de óleo (CARVALHO et al., 2019).

3.2.7 Metodologias analíticas

3.2.7.1 Cálculo dos parâmetros de cultivo

A eficiência da produção de lipídios microbianos foi calculada com base nos resultados de concentração de biomassa (CB) e o rendimento de lipídio ($\%L$) obtidos nos cultivos de *M. circinelloides* URM 4182 nos diferentes meios, conforme equações 1 e 2, respectivamente.

$$CB = \frac{\text{massa seca da biomassa celular (g)}}{\text{volume do caldo de fermentação (L)}} \quad (1)$$

$$\%L = \frac{\text{massa de lipídio (g)}}{\text{massa da biomassa celular}} \times 100 \quad (2)$$

Os resultados dos diferentes cultivos também foram analisados considerando os seguintes parâmetros: produtividade volumétrica em relação à biomassa (Q_X) (Equação 3) e produtividade volumétrica em relação ao lipídio (Q_P) (Equação 4). Os parâmetros foram calculados com os dados obtidos em 120 h de cultivo das células.

$$Q_X = \left(\frac{\Delta X}{\Delta t} \right) = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (3)$$

$$Q_P = \left(\frac{\Delta P}{\Delta t} \right) = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (4)$$

Em que:

X_i e X_f = concentração inicial e final de biomassa.

P_i e P_f = concentração inicial e final de lipídio.

P_i e P_f = concentração inicial e final de lipídio.

t_i e t_f = tempo inicial e final da fermentação.

3.2.7.2 Perfil dos ácidos graxos dos óleos microbianos extraídos

A composição em ácidos graxos dos óleos foi determinada por cromatografia gasosa de acordo com o método oficial AOCS Ce 1-62, utilizando cromatógrafo com auto injetor CP 3800 Varian, equipado com Detector de Ionização de Chama (FID), apresentando as seguintes características: coluna capilar TR FAME com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de filme. A programação de temperatura utilizada foi de T_1 150 °C por 1 min, aquecimento até T_2 180 °C com rampa de R_1 7,5 °C min^{-1} e permanência por 2 min, após, aquecimento à T_3 240 °C com rampa de R_2 10 °C min^{-1} , e manutenção por 3 min. As amostras foram injetadas usando um auto injetor CP 8410, com modo de injeção *splitless*.

3.2.7.3 Caracterização dos meios de cultivo utilizados

A caracterização dos açúcares presentes nos meios de cultivo foi realizada em função da presença de mono e oligossacarídeos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo Agilent 1200 Infinity Series equipado com detector de índice de refração RID e coluna “BIO-RAD Aminex” HP X-87H (300 x 7,8 mm). O sistema foi operado a 35 °C, utilizando-se ácido sulfúrico 0,005 mol L^{-1} como eluente, a um fluxo de 0,60 mL min^{-1} e um volume de injeção de 20 μL . Todas as amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro de membrana 0,45 μm (Millipore, EUA).

O monitoramento do consumo de açúcares totais foi efetuado por espectrometria de acordo com a metodologia Fenol-Ácido Sulfúrico descrita por Dubois et al. (1956).

Os componentes adquiridos sem especificação (caldo de cana-de-açúcar e melado de cana-de-açúcar), foram analisados em relação seus principais cátions e ânions por cromatografia de íons utilizando o sistema Metrohm 940 Professional IC Vario equipado com a coluna Metrohm A Supp 7 para ânions e coluna C4 para cátions, com as suas respectivas colunas de proteção. Carbonato (5,5 mmol L^{-1}) foi empregado como fase móvel para os ânions e para a análise de cátions foram utilizados ácido tartárico (600 mg L^{-1}) e ácido 2,6-piridinodicarboxílico (125 mg L^{-1}). As amostras foram injetadas pelo auto injetor 858 Professional Sample Processor. Os dados foram analisados pelo software Metrohm®.

3.2.7.4. Análise dos ésteres etílicos sintetizados

O teor de ésteres etílicos no produto foi determinado tomando por base os dados gerados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN¹H) 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) conforme metodologia descrita por Andrade et al. (2014).

As sínteses enzimáticas foram acompanhadas ao decorrer do tempo pela retirada de alíquotas que foram analisadas por cromatografia em fase gasosa (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA), equipado com detector ionização de chama e coluna empacotada de aço inoxidável do tipo 5% DEGS CHR-WHP 80/100 mesh 6ft 2.0mm ID e 1/8"OD (Restek, Frankel Commerce of Analytic Instruments Ltda, SP, Brasil). Nitrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo de 25 mL min⁻¹. A coluna foi submetida a uma rampa de temperatura de 90°C (3 min), 120°C (10 min) e 170°C (15 min), numa taxa de aquecimento de 25°C/min. A coleta de dados foi realizada utilizando o *software* Galaxie Chromatography Data System version 1.9. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL contendo hexanol como padrão interno (URIESTE et al., 2008).

3.2.7.5 Análise dos produtos de hidrólise do óleo microbiano

O monitoramento das reações de hidrólise foi realizado pela retirada de alíquotas a cada 30 min que foram analisadas em função da liberação de ácidos graxos livres por titulação com solução padronizada de NaOH 20 mmol L⁻¹ utilizando fenolftaleína como indicador. O grau de hidrólise, definido como a porcentagem em massa de ácidos graxos livres na amostra em relação à quantidade máxima teórica, foi calculado de acordo com Rooney e Weatherley (2001) seguindo a equação 5.

$$\%H = \frac{V_{KOH} \times M_{KOH} \times MM}{m \times f} \times 100 \quad (5)$$

Em que: V_{KOH} = volume de solução de KOH requerida na titulação; M_{KOH} = molaridade da solução de KOH ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$); MM = massa molecular média dos ácidos graxos presentes no óleo (g mol^{-1}); m = massa de amostra analisada; f = fração de óleo no início da reação.

Ao final da reação foram adicionados 45 mL de clorofórmio e 5 mL de ácido acético sob agitação, e em seguida a mistura foi transferida para um funil de separação e lavada com água. Após separação do glicerol, o hidrolisado foi metilado de acordo com AOCS usando BF_3 como catalisador e o produto formado analisado em função do perfil de ácidos graxos conforme descrito em 3.2.7.2.

A velocidade inicial de hidrólise também foi calculada utilizando a equação 6 descrita por Bredda et al. (2018).

$$r_0 = \frac{10^4 S_0}{MM} \left(\frac{dX}{dt} \right) \quad (6)$$

Onde: r_0 = taxa inicial de hidrólise ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$); S_0 = concentração inicial de óleo (g L^{-1}); (dX/dt) = inclinação da reta do *grau de hidrólise x tempo*.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th ed. Champaign: AOCS, 2004.
- ANDRADE, G. S. S.; CARVALHO, A. K. F.; ROMERO, C. M.; OLIVEIRA, P. C.; DE 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.
- BREDDA, E. H.; SILVA, M. B.; DE CASTRO, H. F.; DA SILVA, A. P. T.; DA RÓS, P. C. M. Microalgae as a source of functional pufas: a green low-cost pathway via enzymatic hydrolysis. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, 1-13, 2018.
- 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, 2015.
- CARVALHO, A. K. F.; DA CONCEIÇÃO, L. R. V.; SILVA J. P. V.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel production from *Mucor circinelloides* using ethanol and heteropolyacid in one and two-step transesterification. **Fuel**, v. 202, p. 503–11, 2017.
- CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B. S.; IZÁRIO FILHO, H. J.; DE CASTRO, H. F. Approaches to convert *Mucor circinelloides* lipid into biodiesel by enzymatic synthesis assisted by microwave irradiations. **Renewable Energy**, 125, 747–754, 2018.
- CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B.; REIS, C. E.; DE CASTRO, H. F. Sustainable enzymatic approaches in a fungal lipid biorefinery based in sugarcane bagasse hydrolysate as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 269-275, 2019.
- CONCEIÇÃO, L. R. V.; CARNEIRO, L. M.; WETLER, T. C.; CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F. Application of alumina-supported 12-molybdophosphoric acid as heterogeneous catalyst for biodiesel synthesis from non-edible oil, p. 64-68 . In: COBEQ, 2018, São Paulo. **Anais...** DOI 10.5151/cobeq2018-PT.0018.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- 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.
- ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid–liquid reactor. **Process Biochemistry**, v.36, 947–953, 2001.

SANTOS, F. D.; DA CONCEIÇÃO, L. R. V.; CERON, A.; DE CASTRO, H. F. Chamotte clay as potential low cost adsorbent to be used in the palm kernel biodiesel purification. **Applied Clay Science**, v. 149, p. 41-50, 2017.

URIOSTE, D., CASTRO, M., BIAGGIO, F. C., DE CASTRO, H. F. Synthesis of chromatographic standards and establishment of a method for the quantification of the fatty ester composition of biodiesel from babassu oil. **Química Nova**, v. 31, p. 407–412, 2008.

4. SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO PARA CULTIVO DO FUNGO

4.1 Introdução

A integração de processos industriais incorpora a principal alternativa para viabilizar a implementação de produção industrial de óleos microbianos inseridos em biorrefinarias, tendo em vista que a viabilidade econômica da produção de óleo microbiano é fortemente dependente do custo da matéria-prima principal (fonte de carbono e energia), da produtividade do biorreator e da geração de coprodutos de alto valor agregado. Segundo Kountinas et al. 2014, a glicose representa 35% do custo de produção. Assim, reduzir este custo é essencial. Desta forma, o aproveitamento de subprodutos e resíduos agroindustriais se destaca como uma estratégia viável para promover redução dos custos globais de produção, além de gerar contribuições ambientais significativas devido às amplas escalas de produção industrial (SPALVINS; BLUMBERGA, 2019; CAROTA et al., 2018).

Dentre os principais subprodutos agroindustriais, destacam-se os resíduos lignocelulósicos, amiláceos e sacaríneos, contendo fontes de carbono que podem ser aproveitadas para o crescimento de microrganismos e geração de produtos de elevado valor agregado. Diversos estudos na literatura tratam do aproveitamento de subprodutos agroindustriais para o cultivo de fungos filamentosos com geração de produtos biotecnológicos de interesse industrial (WU et al., 2019; CARVALHO et al., 2019; YANG; WANG, 2019, PILI et al., 2013; PATEL et al., 2018; DAMASO et al., 2008).

Estudos anteriores consolidaram-se dados da potencialidade da estirpe de *Mucor circinelloides* URM 4182 para a produção de biomassa oleaginosa (single cell oil) em meio contendo glicose como única fonte de carbono. Os experimentos foram conduzidos em shaker orbital e alcançaram produtividade de biomassa (Qx) de 0,43 g L⁻¹.dia⁻¹ com um rendimento em lipídio da ordem de 44% (CARVALHO et al., 2015).

Sabendo-se a priori do potencial do fungo *M. circinelloides* URM 4182 para produzir lipídios em meios sintéticos, o objetivo deste capítulo foi utilizar diferentes fontes de carbono, tais como, sacarose, xilose, frutose, amido de milho, e glicerol, como substratos em substituição à glicose para a produção de lipídios. Essas fontes de carbono foram selecionadas, devido ao seu conhecido potencial para a

produção de lipídio microbiano descrito na literatura e também porque se encontram disponíveis em grandes quantidades nos resíduos agroindustrias como o melaço de cana-de-açúcar e materiais lignocelulósicos (HUANG et al., 2013; REIS; ZHANG; HU, 2014; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011; BOTHA et al., 1997).

Os resultados foram analisados em função da produtividade de lipídios, composição em ácidos graxos e propriedades estimadas do biodiesel com auxílio do programa Biodiesel Analyzer® (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014).

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Crescimento celular e acúmulo de lipídios

O microrganismo estudado foi capaz de assimilar todas as fontes de carbono testadas, promovendo diferentes produtividades lipídicas. As biomassas cultivadas em todos os meios apresentaram aspecto semelhante com cor amarelada, conforme pode ser visto na Figura 4.1.

Figura 4.1- Imagens do cultivo de *M. circinelloides* URM 4182 (a) e de sua biomassa filtrada (b)

Fonte: Próprio autor.

De acordo com a Tabela 4.1 é possível observar que a espécie fúngica utilizada assimilou bem os açúcares (sacarose, frutose e xilose) e o polissacarídeo (amido solúvel) testados como fontes de carbono, apresentando produtividade de biomassa (Q_x) superior a $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e produtividade lipídica (Q_P) entre $0,6$ a $0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, com destaque para a sacarose, que proporcionou o alcance da produtividade mais elevada. No entanto, embora a biomassa obtida no cultivo em meio contendo glicerol como única fonte de carbono, tenha alcançado rendimentos lipídicos de 14%, este cultivo apresentou baixa produtividade de biomassa (Q_x) bem como baixa produtividade lipídica (Q_P) da ordem de $0,20$ e $0,025 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 4.1- Cultivos de *M. circinelloides* URM4182 realizados em frascos agitados utilizando diferentes fontes de carbono.

Parâmetro	Fonte de Carbono					
	Glicose	Frutose	Glicerol	Amido	Sacarose	Xilose
Biomassa, X (g L^{-1})	$6,5 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,4$
Lipídio, P (g L^{-1})	$2,8 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,08$	$2,1 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,03$	$1,9 \pm 0,04$
% Lipídio (g g^{-1} biomassa)	$43,0 \pm 0,3$	$42,0 \pm 0,5$	$14,0 \pm 0,5$	$31,0 \pm 0,2$	$41,0 \pm 0,8$	$35,0 \pm 0,3$
Q_x ($\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	$1,6 \pm 0,05$	$1,5 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,05$	$1,7 \pm 0,05$	$2,0 \pm 0,05$	$1,3 \pm 0,05$
Q_P ($\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	$0,7 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,01$	$0,5 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,01$	$0,5 \pm 0,01$

Fonte: Próprio autor.

Estes resultados são similares aos encontrados por Botha et al., (1997), que 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 e também em amido solúvel. No entanto, o fungo em questão não assimilou de maneira satisfatória poliálcoois com três ou quatro átomos de carbono, assim como o glicerol, o que explica a baixa produtividade de biomassa encontrada no presente trabalho.

Pode-se notar também na Tabela 4.1 que os cultivos utilizando frutose e xilose forneceram concentrações mais elevadas de lipídios ($>16\%$, m/m) em relação as demais fontes de carbono testadas. Portanto, pode-se constatar 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 e frutose podem ser usados como fontes de carbono, uma vez que estes açúcares apresentam potencial para a industrialização da produção SCO e são encontrados em grandes quantidades em resíduos agroindustriais, tais como o melaço e biomassa lignocelulósica. O melaço obtido a partir de cana-de-açúcar ou de beterraba, é um subproduto industrial da fabricação de açúcar. Geralmente, o melaço contém frutose, sacarose, glicose e, por conseguinte, é considerado 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 produção industrial de etanol. As fontes de biomassa lignocelulósica, como palha, bagaço e sabugo de milho são também de baixo custo, relativamente fáceis de adquirir e podem ser utilizadas para a produção de SCO (INTASIT et al., 2020; HUANG et al., 2013).

Estes resultados se assemelham aos descritos por Reis et al., (2014) que estudaram a produção de lipídio por *Mucor circinelloides* (ATCC1216B) cultivado em meios contendo diferentes fontes de carbono incluindo glicose, frutose, manose, galactose e xilose obtendo satisfatórios rendimentos lipídicos. Para efeito de comparação com os cultivos contendo meios sintéticos, estes autores cultivaram a mesma espécie de fungo em meio contendo, como substrato alternativo, hidrolisado de palha de milho com elevada quantidade de xilose ($22,29 \text{ g L}^{-1}$) alcançando rendimentos lipídicos satisfatórios da ordem de $29,10\%$ m/m. Confirmando, portanto, que os coprodutos 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, visando a competitividade com outros processos industriais de produção de óleos microbianos.

4.2.2 Composição em ácidos graxos dos óleos microbianos

Os lipídios microbianos obtidos em cada cultivo extraídos com etanol sob irradiação de micro-ondas foram analisados por cromatografia em fase gasosa. Os resultados das análises contidos na Tabela 4-2 mostram semelhança na composição em ácidos graxos dos óleos microbianos, independente da fonte de carbono utilizada no cultivo. É possível ainda notar que todos os óleos analisados apresentaram composição majoritária de ácido mirístico (C16:0) e ácido oleico (C18:1), seguido dos ácidos graxos poli-insaturados (C18:2 e C18:3), composição adequada para a síntese de biodiesel (CARVALHO et al., 2015). Os lipídios obtidos nos cultivos contendo glicerol e amido solúvel apresentaram concentrações mais elevadas em ácido láurico (C12:0) que os demais analisados.

Deve-se destacar os elevados percentuais em relação ao ácido γ -linolênico (C18:3, cis-9,12,15-octadecatienoico ou GLA), atingindo valores entre 12,6 e 18,1%, um ácido graxo importante por seu valor nutricional e aplicações medicinais. Estes valores são semelhantes aos encontrados em outros cultivos de *M. circinelloides* (TANG et al., 2015; CERTÍK; ADAMECHOVÁ, GUOTHOVÁ, 2013; VICENTE et al., 2010; CERTIK; BALTESZOVA; SAJBIDOR, 1997).

A composição dos lipídios acumulados pelo fungo *M. circinelloides* URM4182 está de acordo com a relatada na literatura. Assim como a maior parte dos microrganismos, a biossíntese de ácidos graxos culmina na formação dos ácidos graxos saturados C16:0 ou C18:0, que são então modificados por uma sequência de desaturases e elongases para a formação de ácidos graxos C18:1, C18:2 e C18:3. Os ácidos graxos são ainda convertidos à triacilgliceróis via ácido fosfático e subsequente desfosforilação a um diacilglicerol e seguido por uma etapa final de acilação (RATLEDGE, 2004, RATLEDGE; WYNN, 2002).

Uma visão geral da composição em ácidos graxos dos óleos microbianos obtidos a partir das diversas fontes de carbono pode ser vista na Figura 4.2, que indica que todos os óleos possuem potencial de aplicação na síntese de biodiesel, sendo os cultivos em sacarose com menores teores de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), apresentando um equilíbrio entre os ácidos graxos saturados (SFAs) e monoinsaturados (MUFAs) que fornece melhores propriedades ao biocombustível, semelhantes a diversos óleos vegetais aplicados para esta mesma

utilidade (CARVALHO et al., 2013). A presença de ácidos graxos poli-insaturados em matérias-primas convertidas a biodiesel forma ésteres suscetíveis a oxidação, diminuindo a estabilidade oxidativa do combustível, porém, uma pequena parcela destes ácidos graxos é essencial para conferir melhor fluidez a baixas temperaturas (RAMOS et al., 2009).

Tabela 4.2- Composição em ácidos graxos dos lipídios microbianos obtidos em frascos agitados utilizando diferentes fontes de carbono.

Composição em ácidos graxos (%)	Fonte de carbono					
	Glicose	Frutose	Glicerol	Amido	Sacarose	Xilose
C8:0	0,5 ± 0,2	1,9 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1
C10:0	1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,5	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,2
C12:0	4,3 ± 0,3	2,0 ± 0,3	11,8 ± 0,8	11,3 ± 1,1	3,8 ± 0,4	1,9 ± 0,2
C14:0	2,4 ± 0,4	4,9 ± 0,5	7,2 ± 0,8	5,6 ± 0,8	4,7 ± 0,6	3,5 ± 0,5
C16:0	25,5 ± 1,2	31,7 ± 1,4	28,9 ± 1,5	21,7 ± 1,3	30,9 ± 1,2	35,2 ± 1,7
C18:0	3,4 ± 0,3	4,5 ± 0,7	2,7 ± 0,3	4,3 ± 0,6	4,1 ± 0,4	4,8 ± 0,6
C18:1	29,6 ± 1,3	33,8 ± 1,2	21,7 ± 1,2	25,4 ± 1,9	34,9 ± 0,9	28,7 ± 0,9
C18:2	15,1 ± 0,8	5,6 ± 0,4	10,8 ± 0,9	15,4 ± 0,6	6,5 ± 0,4	9,7 ± 0,7
C18:3	18,1 ± 1,1	14,8 ± 0,8	13,9 ± 0,9	13,3 ± 1,0	12,6 ± 1,3	14,5 ± 0,8

Fonte: Próprio autor.

Entretanto, óleos microbianos contendo elevada proporção de ácidos graxos poli-insaturados apresentam potencial nutracêutico e alto valor agregado (BÉLIGON et al., 2016), sendo glicose a fonte de carbono mais adequada para cultivo do fungo visando obtenção de óleo com elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados.

Ratledge (2004) sugeriu que as produções de ácidos graxos poli-insaturados por fungos e microalgas são as mais interessantes comercialmente, uma vez que a composição lipídica em leveduras é limitada, com C18:3 atingindo valores inferiores a 10%. Dentre estes microrganismos, algumas microalgas fotossintetizantes não apresentam triacilgliceróis como principal componente lipídico, e sim numerosos tipos de moléculas que estão envolvidas nos sistemas de membrana fotossintetizantes, apresentando uma complexidade de lipídios que

limita seu uso comercial. Desta forma, os resultados indicam que o uso de fungos filamentosos se destaca como ferramenta versátil na produção de lipídios para aplicação em biorrefinarias, podendo apresentar diferentes perfis de ácidos graxos de acordo com o meio de cultivo utilizado.

Figura 4.2 – Composição dos ácidos graxos presentes nos lipídios microbianos obtidos utilizando diferentes fontes de carbono

Fonte: Próprio autor.

4.2.3 Estimativa das propriedades do biodiesel obtido dos lipídios de *M. circinelloides* URM 4182

Os parâmetros principais que determinam a qualidade do biodiesel incluem: densidade, viscosidade, número de cetano, índice de iodo e estabilidade oxidativa. Estes parâmetros possuem limites estabelecidos por normas internacionais, incluindo normas Americana (ASTM D6715), da União Européia (EN 14214) e Brasileira (ANP 30/2016), e são fundamentais para determinar a viabilidade do biodiesel obtido a partir dos óleos microbianos.

Estas propriedades são determinadas pelas características estruturais das moléculas de ácidos graxos e do agente acilante (álcool) empregados na produção dos ésteres. Algumas das características estruturais que influenciam nas

propriedades do biocombustível incluem o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações nas moléculas de ácidos graxos (KNOTHE; MATHEAUS; RYAN III, 2003), mostrando a importância da caracterização das matérias-primas utilizadas em função de sua composição em ácidos graxos devido sua relação com as propriedades finais do biodiesel.

A utilização de modelos matemáticos e softwares de simulação são ferramentas importantes na estimativa destes parâmetros, reduzindo tempo e custo de análises e gerando dados de alta confiabilidade (TALEBI et al., 2014). Desta forma, o *software* Biodiesel Analyzer® foi utilizado para estimar os valores de índice de iodo (II), índice de saponificação (IS), número de cetano (NC) e estabilidade oxidativa (OS) a partir da composição em ácidos graxos dos lipídios produzidos por *Mucor circinelloides* cultivado nas diferentes fontes de carbono. Os resultados dos dados estimados pelo *software* podem ser visualizados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Propriedades estimadas dos biocombustíveis de acordo com o *software* Biodiesel Analyzer®.

Propriedade	Fonte de Carbono						Limite (Especificação)
	Glicose	Frutose	Glicerol	Amido	Sacarose	Xilose	
Viscosidade (mm ² s ⁻¹)	4,45	4,52	4,23	4,27	4,52	4,56	1,9 -6,0 (ASTM D6751)
Densidade (kg cm ⁻³)	878	876	876	877	875	876	850 - 900 (ASTM D6751)
IS, (mg g ⁻¹)*	211	213	222	219	214	211	*** ***
II, (g 100 g ⁻¹)*	103	81	77	87	78	83	120, min, (EN 14214)
NC*	48	54	53	51	54	53	47, min, (ASTM D6751)
EO, (h)*	6,1	8,4	7,4	6,7	8,7	7,5	3, min, (ASTM D6751)

*IS: índice de saponificação, II: Índice de iodo, NC: Número de Cetano, EO: Estabilidade oxidativa
Fonte: Próprio autor.

Viscosidade e densidade são propriedades importantes para serem analisados em amostras de biodiesel, visto que os parâmetros estabelecidos são essenciais para garantir seu bom funcionamento em motores ciclo diesel. As amostras apresentaram valores de viscosidade e densidade muito próximos entre si e dentro dos limites estabelecidos pela norma ASTM D6751 (1,9-6,0 mm² s⁻¹).

O índice de iodo (II) é uma medida relacionada ao total de ésteres de ácidos graxos insaturados (ácidos graxos mono- e poli-insaturados) na amostra de biodiesel. Um alto valor deste índice indica baixa estabilidade ou maior potencial de degradação do biodiesel. Além disso, o índice de iodo está associado à formação de compostos parcialmente oxidados que promovem depósito no sistema de injeção do motor (RAMOS et al., 2009; KNOTHE, 2005).

Os valores de II estimados para o biodiesel de *M. circinelloides* apresentou valores entre 77 e 103 g 100 g⁻¹, indicando o potencial de aplicação de todas as fontes de carbono empregadas, uma vez que são valores inferiores ao limite exigido pela norma EN14214 (120 g 100 g⁻¹).

O número de cetano (NC) mede a qualidade de combustão do biodiesel como combustível, sendo que elevados valores de NC indicam menores intervalos de ignição em motores convencionais (RAMOS et al., 2009; KNOTHE, 2005). Todas as amostras apresentaram valores de NC superiores ao limite mínimo estabelecido pela norma ASTM D6751 (47 mínimo).

A estabilidade oxidativa é uma das principais propriedades de biodiesel adotada como critério de qualidade, este parâmetro indica a resistência à degradação durante a estocagem, está diretamente relacionado com a quantidade de ésteres insaturados, um maior grau de insaturação aumenta a suscetibilidade à oxidação (PULLEN; SAEED, 2012). Os valores preditos de estabilidade oxidativa para os produtos analisados apresentaram elevados resultados, acima dos limites estabelecidos pela ASTM D6751.

Apesar de todas as fontes de carbono utilizadas terem apresentado resultados promissores na síntese de biodiesel, os meios contendo sacarose forneceram óleos microbianos com composições mais adequadas para a síntese de biodiesel, comprovado pela análise dos parâmetros listados na Tabela 4-3,

apresentando o maior Número de Cetano (54) e a melhor estabilidade oxidativa (8,7 h).

4.3 Conclusões

Os resultados apresentados neste capítulo mostraram que o fungo *Mucor circinelloides* URM 4182 é capaz de assimilar diferentes fontes de carbono e produzir lipídios com diferentes características e propriedades, indicando ser um microrganismo de grande interesse podendo integrar processos em diferentes contextos de biorrefinarias a partir do aproveitamento de subprodutos e resíduos agroindustriais que apresentam as fontes de carbono aqui analisadas.

A seleção da fonte de carbono se mostrou essencial para adequar as propriedades dos lipídios gerados às aplicações desejadas. A demanda de mercado e a oferta de matéria-prima são fatores que devem ser levados em consideração na escolha das rotas biotecnológicas aplicadas, visto que estas podem ser adequadas de acordo com as necessidades. Os lipídios obtidos a partir do crescimento de *M. circinelloides* em meio de cultivo contendo sacarose como fonte de carbono apresentaram características desejáveis para a produção de biodiesel, comprovado pelas análises estimadas pelo *software* Biodiesel Analyzer®.

REFERÊNCIAS

- BELIGON, V.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Microbial lipids as potential source to food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 35-42, 2016.
- 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.
- CAROTA, E.; CROGNALE, S.; D'ANNIBALE, A.; PETRUCCIOLI, M. Bioconversion of agro-industrial waste into microbial oils by filamentous fungi. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 117, p. 143-151, 2018.
- 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.; RIVALDI, J. D.; BARBOSA, J. C.; CASTRO, H. F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides* – A sustainable pathway for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 47–53, 2015.
- CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B.; REIS, C. E.; DE CASTRO, H. F. Sustainable enzymatic approaches in a fungal lipid biorefinery based in sugarcane bagasse hydrolysate as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 269-275, 2019.
- 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.
- DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C. D.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agro industrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, 676-681, 2008.
- DE OLIVEIRA GUSMÃO, R.; DE ASSIS, F. G. D. V.; DA CRUZ, A. R.; SOLIDADE, L. S.; FERREIRA, L. F. A. A.; LEAL, P. L. Filamentous fungi producing enzymes under fermentation in cassava liquid waste. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 40, p. 41512-41512, 2018.

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.

INTASIT, R.; CHEIRSILP, B.; LOUHASAKUL, Y.; BOONSAWANG, P.; CHAIPRAPAT, S.; YEESANG, J. Valorization of palm biomass wastes for biodiesel feedstock and clean solid biofuel through non-sterile repeated solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 298, 122551, 2020.

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.; 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.

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.

PATEL, A.; MATSAKAS, L.; PRUTHI, P. A.; PRUTHI, V. Potential of aquatic oomycete as a novel feedstock for microbial oil grown on waste sugarcane bagasse. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 33443-33454, 2018.

PILI, J.; DANIELLI, A.; NYARI, N. L.; ZENI, J.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; VALDUGA, E. Biotechnological potential of agro-industrial waste in the synthesis of pectin lyase from *Aspergillus brasiliensis*. **Food Science and Technology International**, v. 24, 97-109, 2018.

PULLEN, J.; SAEED, K. An overview of biodiesel oxidation stability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p.5924-5950, 2012.

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. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, p.807–815, 2004.

RATLEDGE C.; WYNN J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 5, p.1-51, 2002.

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.

SPALVINS, K.; BLUMBERGA, D. Single cell oil production from waste biomass: review of applicable agricultural by-products, **Agronomy Research**, v. 17, n. 3, p. 833-849, 2019.

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 high and low lipid-producing strains of *Mucor circinelloides*: an explanation for the high oleaginicacy of strain WJ11. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

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.

WU, N., TIAN, F., MOODLEY, O., SONG, B., JIA, C., YE, J., LV, R., QIN, Z., LI, C. Optimization of agro-residues as substrates for *Pleurotus pulmonarius* production. **AMB Express**, v. 9, p. 184, 2019.

YANG, L.; LI, H.; WANG, Q. A novel one-step method for oil-rich biomass production and harvesting by co-cultivating microalgae with filamentous fungi in molasses wastewater. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 35-43, 2019.

5. PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS A PARTIR DE DERIVADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

5.1 Introdução

A aplicação industrial dos óleos microbianos pode ser limitada pelos altos custos nos processos de fermentação para obtenção de biomassa oleaginosa. A fonte de carbono utilizada para o cultivo de SCO é responsável por grande parte dos custos de produção. Geralmente para o cultivo de fungos com concomitante acúmulo de lipídio são utilizadas fontes de carbono convencionais, tais como a glicose, no entanto, a introdução de substratos alternativos surge como uma interessante opção para reduzir os custos de processo (LIANG; JIANG, 2015).

Os resultados descritos no Capítulo 4 indicaram que sacarose sintética é uma potencial fonte de carbono para cultivo do fungo *M. circinelloides* URM 4182 visando a obtenção de óleos microbianos com composição adequada em ácidos graxos para síntese de biodiesel. A relevância desses resultados é referente a possibilidade de integrar o processo com uma indústria já bem estabelecida facilitando a viabilização da produção de SCO. Intermediários e subprodutos da indústria sucroalcooleira estão disponíveis em grande quantidade e baixo custo no mercado de países tropicais produtores de cana-de-açúcar como o Brasil, sendo uma alternativa sustentável com forte apelo no contexto de biorrefinarias com exploração de fungos oleaginosos (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; AHMED; SOUAD; TIJANI, 2014).

No presente capítulo buscou-se avaliar a utilização de meios de cultivo baseados em sacarose obtida de diferentes fontes derivadas da agroindústria de cana-de-açúcar para a produção de lipídios pelo fungo *Mucor circinelloides* URM4182. Foram utilizados açúcar bruto (açúcar cristal não refinado), caldo de cana-de-açúcar, melado de cana-de-açúcar e melaço de cana-de-açúcar. Os lipídios produzidos foram avaliados quanto a composição em ácidos graxos e na sequência submetidos a reação de transesterificação enzimática usando etanol como doador do grupo acila sob irradiação de micro-ondas.

A rota enzimática significa oportunidade concreta de recuperação do catalisador, elimina os problemas de separação, índice de acidez e teor de sódio verificados no processo químico. Além disso, a utilização de etanol, como agente

acilante, e de enzimas, como catalisadores da reação de transesterificação, tornam o biocombustível produzido totalmente de origem renovável e com o menor prejuízo ambiental possível, sendo a rota mais sustentável de produção (ADEWALE; DUMONTN; NGADI, 2015; LOURINHO; BRITO, 2014).

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Caracterização da matéria-prima e parâmetros de cultivo em biorreator

Os principais compostos presentes nos derivados da cana-de-açúcar encontram-se indicados na Tabela 5-1. Com relação aos açúcares, verifica-se que o caldo de cana era composto exclusivamente de sacarose ($165,5 \text{ g L}^{-1}$), enquanto o melado e o melaço de cana-de-açúcar apresentaram composição em açúcares contendo além da sacarose (463 e 399 g L^{-1} , respectivamente), glicose e frutose. O melado de cana continha 283 g L^{-1} de glicose e 277 g L^{-1} de frutose, enquanto o melaço, por se tratar de resíduo gerado na etapa de cristalização do processo de produção do açúcar continha apenas 55 e 75 g L^{-1} de glicose e frutose, respectivamente.

Os derivados sacaríneos apresentaram também teores de sais de origem intrínseca da cana-de-açúcar. As concentrações mais elevadas encontradas no melado e no melaço (Tabela 5.1) se deve ao fato de serem coprodutos obtidos após a etapa de evaporação e concentração, elevando o teor dos compostos presentes. A presença de íons metálicos em meios de cultivo é interessante do ponto de vista bioquímico, pois participam do mecanismo de funcionamento das células e enzimas envolvidas, contribuindo em algumas rotas metabólicas e favorecendo o crescimento microbiano (BELIGON et al., 2016).

Todos os meios de cultura preparados (açúcar bruto, caldo de cana-de-açúcar, melado e melaço de cana-de-açúcar) foram capazes de suportar o crescimento do fungo e fornecer elevadas concentrações de biomassa e lipídios, conforme ilustrado nos perfis de crescimento de biomassa e acúmulo de lipídios, bem como consumo dos açúcares para os meios aplicados (Figuras 5.2 a 5.5).

Tabela 5.1 – Características das matérias-primas sacaríneas utilizadas.

Componentes	Caldo de cana-de-açúcar	Melado	Melaço de cana-de-açúcar*
Açúcares	165 g L ⁻¹ sacarose	463 g L ⁻¹ sacarose 283 g L ⁻¹ glicose 277 g L ⁻¹ frutose	399 g L ⁻¹ sacarose 55 g L ⁻¹ glicose 75 g L ⁻¹ frutose
Composição mineral			
	65 mg L ⁻¹ Ca ²⁺	490 mg L ⁻¹ Ca ²⁺	11,4 g kg ⁻¹ Ca ²⁺
	27 mg L ⁻¹ Mg ²⁺	745 mg L ⁻¹ Mg ²⁺	4,1 mg kg ⁻¹ Mg ²⁺
	4 mg L ⁻¹ Cl ⁻	3045 mg L ⁻¹ Cl ⁻	1,5 mg kg ⁻¹ Co
	52 mg L ⁻¹ NO ₃ ⁻	554 mg L ⁻¹ NO ₃ ⁻	3,6 mg kg ⁻¹ Cu
	114 mg L ⁻¹ PO ₄ ³⁻	987 mg L ⁻¹ PO ₄ ³⁻	62 mg kg ⁻¹ Fe
	164 mg L ⁻¹ SO ₄ ²⁻	2836 mg L ⁻¹ SO ₄ ²⁻	1,26 mg L ⁻¹ P total
	297 mg L ⁻¹ NH ₄ ⁺	3021 mg L ⁻¹ NH ₄ ⁺	28 mg kg ⁻¹ Mn
	102 mg L ⁻¹ Na ⁺	304 mg L ⁻¹ Na ⁺	25,6 g kg ⁻¹ K

*Composição fornecida pela empresa Mellaço de Cana (Saltinho-SP).

Fonte: Próprio autor.

É possível verificar que todos os perfis forneceram características típicas de curvas de crescimento de microrganismos, apresentando a fase exponencial entre 24 e 72 h, e atingindo a fase estacionária entre 96 e 120 h de cultivo. Os parâmetros dos cultivos são sumarizados na Tabela 5.2.

Em todos os derivados de cana-de-açúcar utilizados, valores semelhantes de biomassa e lipídios foram encontrados, com exceção da biomassa obtida no meio melado e do teor de lipídios alcançados em meio composto de açúcar bruto. A maior concentração de biomassa obtida no cultivo em meio melado pode estar relacionada com a composição mais rica em glicose e frutose deste meio de cultivo em relação aos outros meios. Esse fato, provavelmente favoreceu o consumo preferencial desses açúcares simples promovendo maior crescimento da biomassa fúngica.

Figura 5.1- Curvas de crescimento, acúmulo de lipídios e consumo de açúcares por *M. circinelloides* URM4182 cultivos em meio com açúcar bruto

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.2- Curvas de crescimento, acúmulo de lipídios e consumo de açúcares por *M. circinelloides* URM4182 cultivos em meio com caldo de cana-de-açúcar

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.3- Curvas de crescimento, acúmulo de lipídios e consumo de açúcares por *M. circinelloides* URM4182 cultivos com melado

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.4- Curvas de crescimento, acúmulo de lipídios e consumo de açúcares por *M. circinelloides* URM 4182 cultivado em meio com melaço de cana-de-açúcar

Fonte: Próprio autor.

Com relação ao consumo dos açúcares as figuras 5.1 a 5.4 indicam que os meios contendo apenas sacarose como fonte de carbono (açúcar bruto e caldo de cana-de-açúcar) forneceram perfis similares (figuras 5.1 e 5.2), constatando-se consumo praticamente total da sacarose em 120 h (valores inferiores 5 g L⁻¹). Em relação aos meios mais complexos (melado e melaço), os monossacarídeos glicose e frutose foram assimilados preferencialmente em ambos os casos, sendo metabolizados totalmente com 24 h de cultivo para o melaço, e com 48 h de cultivo para o melado, indicando consumo preferencial do fungo na sequência: glicose > frutose > sacarose.

Desta forma, constata-se valores residuais mais elevados de sacarose em torno de 10 g L⁻¹ para o meio contendo melado e da ordem de 5 g L⁻¹ para o meio melaço. O consumo de sacarose foi mais lento uma vez que seu consumo requer a produção de enzimas intrínsecas para realizar a hidrólise gerando os monossacarídeos glicose e frutose, prontamente assimiláveis.

Tabela 5.2 - Cultivos de *M. circinelloides* URM4182 em biorreator utilizando meios de cultivo contendo sacarose a partir de derivados industriais da cana-de-açúcar

Parâmetro	Fonte de Sacarose			
	Açúcar bruto	Caldo de cana	Melado	Melaço de cana-de-açúcar
Biomassa, X (g L⁻¹)	11,91±0,08	12,04±0,15	18,10±0,20	11,20 ± 0,3
Lipídio, P (g L⁻¹)	4,67±0,03	3,46±0,04	3,59±0,04	3,25 ± 0,15
% Lipídio (g g⁻¹ biomassa)	39,20±0,4	29,10±0,7	20,00±0,5	29,10±0,2
Q_x (g L⁻¹ dia⁻¹)	2,38±0,02	2,41±0,03	3,62±0,04	2,24 ± 0,06
Q_P (g L⁻¹ dia⁻¹)	0,93±0,01	0,70±0,01	0,73±0,01	0,66 ± 0,02

Fonte: próprio autor

As concentrações de biomassa obtidas foram consideravelmente superiores às apresentadas no meio contendo sacarose P.A (em média $7,8 \text{ g L}^{-1}$), este aumento está potencialmente relacionado com a mudança da estratégia de cultivo substituindo o cultivo em frascos agitados por cultivo em biorreator, vale ressaltar que o cultivo em biorreator foi realizado com controle automático de pH e aeração constante, favorecendo a manutenção das condições de cultivo e aumentando a produção de biomassa.

Em relação aos teores de lipídios presentes na biomassa não houve alteração em função da estratégia de cultivo aplicada. O teor de lipídios alcançado com a utilização do meio açúcar bruto foi similar aos obtidos em meio contendo sacarose sintética (39,2% e 41,0%, respectivamente), porém as concentrações mais elevadas de biomassa favoreceram o aumento da produtividade lipídica (Q_P), ou seja, em torno de 45% superior quando comparado a produtividade alcançada em meio sacarose. Esses dados confirmam resultados descritos por Carvalho et al. (2017) que constataram aumento de biomassa de $6,6 \text{ g L}^{-1}$ para $13,3 \text{ g L}^{-1}$ e teor de lipídios semelhantes (44% e 40%) quando o cultivo desta mesma linhagem de fungo em frascos agitados foi substituído por cultivo em biorreator.

Apesar da menor produtividade lipídica do meio composto por melaço de cana-de-açúcar, o valor obtido ($0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foi semelhante ao obtido pelo meio contendo sacarose cultivado em frascos agitados ($0,64 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), indicando ser uma alternativa interessante para a produção de SCO, por ser um subproduto da produção de açúcar e apresentar alta disponibilidade e baixo custo.

As biomassas recuperadas após a filtração podem ser vistas nas imagens da Figura 5.5, que indicam que o aspecto visual, e consequentemente a produção de pigmentos diretamente relacionada com a composição do meio de cultivo empregado. A biomassa fúngica cultivada a partir do açúcar bruto apresentou a coloração fortemente amarelada característica do fungo *M. circinelloides* quando cultivado em meios definidos compostos por fontes de carbono livre de impurezas (CARVALHO et al., 2015), a cor amarela é proveniente dos carotenoides conhecidamente produzidos por esta espécie (CARVALHO et al., 2019). Os meios derivados das demais fontes sacaríneas produziram biomassa visualmente com

menor pigmentação, apresentando coloração mais próxima ao marrom ou bege, conforme ilustrado nas imagens (b, c, d).

Figura 5.5- Imagens das biomassas obtidas a partir dos meios com diferentes fontes sacaríneas (a: açúcar bruto, b: caldo de cana, c: melado, d: melaço de cana-de-açúcar)

Fonte: Próprio autor.

5.2.2 Composição em ácidos graxos dos óleos obtidos nos cultivos em biorreator

Os lipídios obtidos a partir de cada meio de cultivo foram caracterizados em função de sua composição de ácidos graxos, os resultados estão indicados na Tabela 5.3.

Todos os óleos analisados apresentaram ácido palmítico (C16:0) e ácido oleico (C18:1) como principais constituintes, característicos de óleos microbianos, sobretudo de *Mucor circinelloides* conforme descrito anteriormente (Capítulo 4 deste trabalho) e por diversos autores na literatura (SONOWAL; CHIKKAPUTTAIAH; VELMURUGAN, 2019; CERTIK; ADAMECHOVA; GUOTHOVA, 2013; ARJUNA, 2014; KLEMPOVA et al., 2013). A presença majoritária destes ácidos indica que todos os lipídios obtidos podem ser utilizados como matéria-prima na produção de biodiesel fornecendo boas propriedades ao biocombustível final (RAMOS et al., 2009).

Tabela 5.3 - Composição em ácidos graxos dos óleos microbianos obtidos a partir de cultivos efetuados em meios com diferentes fontes sacaríneas

Composição em Ácidos graxos	Fonte de Carbono			
	Açúcar bruto	Caldo de cana	Melado	Melaço de cana-de-açúcar
C8:0	0,9 ± 0,2	0,1 ± 0,1	3,7 ± 0,3	3,0 ± 0,15
C10:0	1,7 ± 0,2	2,9 ± 0,2	4,4 ± 0,3	6,3 ± 0,22
C12:0	2,6 ± 0,4	2,8 ± 0,2	8,0 ± 0,5	3,0 ± 0,12
C14:0	4,9 ± 0,6	4,2 ± 0,1	7,5 ± 0,4	5,5 ± 0,19
C16:0	29,8 ± 1,2	30,4 ± 0,8	25,8 ± 0,9	27,7 ± 1,25
C16:1	0	3,4 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,30
C18:0	4,2 ± 0,4	2,6 ± 0,3	6,5 ± 0,1	2,0 ± 0,28
C18:1	34,6 ± 0,9	21,1 ± 0,5	19,7 ± 0,8	20,1 ± 1,05
C18:2	8,7 ± 0,4	18,5 ± 0,4	10,4 ± 0,6	10,5 ± 0,98
C18:3	12,6 ± 1,3	14,0 ± 0,3	8,2 ± 0,6	18,7 ± 0,85
C20:0	0	0	2,6 ± 0,2	0

Fonte: Próprio autor.

Os lipídios produzidos pelo fungo cultivado em meio contendo melaço apresentaram o maior teor de ácido α -linolênico (C18:3), atingindo 18,72%, indicando ser um óleo de elevado valor nutricional e medicinal. No geral, apenas os lipídios obtidos pelo cultivo a partir do açúcar bruto seguiram a mesma tendência de composição que o cultivo a partir de sacarose padrão apresentada no Capítulo 4. Estes resultados revelam que a composição dos ácidos graxos presentes depende não só das fontes de carbono utilizadas, mas também de demais compostos presentes, nutrientes ou inibidores, que podem afetar as rotas metabólicas envolvidas na biossíntese de lipídios. As diferenças em relação ao perfil de saturação dos ácidos graxos presentes nos lipídios obtidos são apresentadas na Figura 5.6.

Os lipídios obtidos nos cultivos com caldo de cana-de-açúcar e melaço apresentaram os maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados (32,5% e 29,2% respectivamente), podendo fornecer produtos de elevado valor agregado para as indústrias farmacêutica e de alimentos.

Figura 5.6 - Composição dos ácidos graxos presentes nos lipídios microbianos obtidos a partir de diferentes fontes sacaríneas

Fonte: Próprio autor.

5.2.3 Transesterificação dos lipídios via catálise enzimática assistida por micro-ondas

A catálise enzimática apresenta vantagens em relação a via química, por exemplo o fato de atuarem em condições brandas de temperatura e pressão. Sua aplicação na síntese de biodiesel apresenta maior apelo ambiental que a síntese química por serem biodegradáveis e gerarem produtos de fácil purificação, diminuindo o gasto de água nesta etapa industrial. Apesar dessas vantagens as reações enzimáticas são lentas requerendo tempos superiores a 30 h para atingir conversões elevadas de lipídios em ésteres de alquila. A utilização de micro-ondas

nas sínteses enzimáticas tem demonstrado ser uma eficiente ferramenta para aumentar a velocidade de reação na transesterificação de diferentes óleos vegetais (JI; HUANG, 2019; CARVALHO et al, 2018; DA RÓS et al., 2013; DA RÓS et al., 2012).

Desta forma, a abordagem da reação de transesterificação assistida por irradiação de micro-ondas foi aplicada conforme descrito por Carvalho et al. (2018) para verificar a máxima potencialidade de aplicação dos lipídios obtidos a partir de cultivos em meios contendo os derivados da indústria de cana-de-açúcar.

As concentrações de ésteres formados nas diversas reações foram monitoradas em função do tempo para verificar os comportamentos cinéticos e os resultados obtidos podem ser analisados na Figura 5.7.

Figura 5.7 - Monitoramento da formação dos ésteres na transesterificação enzimática dos lipídios de *M. circinelloides* cultivado em meios sacaríneos

Fonte: Próprio autor

O biocatalisador aplicado (*Candida antarctica* na forma imobilizada em suporte acrílico, Novozym® 435) foi capaz de promover elevadas conversões em ésteres em 12 h de reação, independente da fonte de carbono utilizada na obtenção do óleo fúngico. Todavia, nota-se diferenças acentuadas nas velocidades iniciais de reação. A velocidade mais elevada foi observada com óleo obtido em açúcar bruto ($9,5 \text{ g ester h}^{-1}$), enquanto o sistema contendo lipídios produzidos a partir de melado atingiu apenas $6,5 \text{ g ester h}^{-1}$.

As amostras purificadas de biodiesel foram analisadas pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN¹H) e comparadas com a análise de RMN¹H do óleo extraído de *M. circinelloides*. O espectro do óleo encontra-se na Figura 5.8 e os espectros das amostras de biodiesel estão apresentadas na Figura 5.9.

Figura 5.8 - Espectro de RMN¹H do óleo extraído de *M. circinelloides* URM 4182

Fonte: Próprio autor.

É possível notar a diferença dos espectros dos produtos reacionais comparados com o espectro gerado da análise do óleo de *M. circinelloides* URM4182, a análise do óleo resultou em sinais de um duplo quarteto entre 4,0-4,4 ppm associados com os triacilgliceróis presentes. A elevada conversão dos lipídios em ésteres etílicos é revelada pela presença de um quarteto em 4,1 ppm referente ao desdobramento do pico correspondente aos hidrogênios metilênicos presentes na porção alcoólica dos ésteres (PAIVA et al., 2013; SHARMA et al., 2013).

Figura 5.9 - Espectros de RMN¹H dos produtos de transesterificação enzimática obtidos dos lipídios obtidos de cultivo em meio contendo: a) açúcar bruto; b) caldo de cana; c) melado; d) melaço de cana-de-açúcar

Fonte: Próprio autor.

O desaparecimento dos sinais em 4,2 ppm correspondentes aos hidrogênios dos grupamentos CH_2 do glicerol também são sinais da conversão dos triacilgliceróis e mostram a eficiência da purificação. Esta mudança nos espectros antes e após as reações comprova os rendimentos satisfatórios alcançados (PAIVA et al., 2013; SHARMA et al., 2013).

Os teores de ésteres foram calculados de acordo com Paiva et al. (2013) e os resultados obtidos estão indicados na Tabela 5.4. Verificou-se que as reações dos lipídios obtidos a partir dos cultivos contendo derivados de cana-de-açúcar exibiram elevados teores de ésteres etílicos em todos os casos após 12 h (95,3 – 97,1%), indicando o potencial de aplicação como matéria-prima lipídica para produção de biodiesel.

Tabela 5.4- Perfil do produto purificado da transesterificação enzimática de óleo de *M. circinelloides* URM 4182 cultivado em meios sacaríneos.

	Fonte de sacarose			
	Açúcar bruto	Caldo de cana	Melado	Melaço de cana-de-açúcar
Teor de ésteres etílicos (%)	97,1±0,5	96,0±0,3	95,3±0,9	96,8 ±0,3
Monoacilgliceróis (%)	1,9±0,3	2,6±0,7	2,8±0,4	2,4±0,4
Diacilgliceróis (%)	1,0±0,1	1,4±0,2	1,9±0,2	0,8±0,1

Fonte: Próprio autor.

O lipídio que atingiu os valores mais elevados (97,1% teor de ésteres) foi o obtido do cultivo em meio contendo açúcar bruto, enquanto o menor rendimento foi em relação ao melado de cana-de-açúcar. Possivelmente, os meios mais complexos, ao contrário do meio contendo apenas açúcar bruto e nutrientes selecionados, podem ter gerado lipídios com a presença de compostos não transesterificáveis/esterificáveis pela lipase de *Candida antarctica*, diminuindo o acesso do substrato ao sítio ativo do biocatalisador, uma vez que os lipídios foram submetidos à reação sem prévia purificação ou qualquer método de refino.

Os mono- e diacilgliceróis residuais presentes nos produtos finais purificados foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os resultados se encontram na Tabela 5-4. A amostra referente ao produto da reação

utilizando lipídios produzidos em meio contendo açúcar bruto forneceu os menores valores de mono- e diacilgliceróis ($1,9 \pm 0,3\%$ e $1,0 \pm 0,1\%$, respectivamente), enquanto as demais amostras analisadas apresentaram valores superiores a 2,5% de monoacilgliceróis e 1,4% de diacilgliceróis. Apesar destes valores serem maiores que os limites estabelecidos pela ANP (0,80 e 0,20 % m/m respectivamente), as concentrações em éster podem ser melhoradas com técnicas de otimização reacional, aumentando por exemplo o tempo reacional possibilitando converter os glicerídeos residuais em ésteres.

As demais propriedades dos ésteres produzidos foram estimadas pelo *software* Biodiesel Analyzer® (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014) a partir da composição em ácidos graxos dos lipídios. Os resultados obtidos estão comparados com os limites estabelecidos pelas normas das principais agências reguladoras na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 -Parâmetros das amostras de biodiesel estimadas pela composição dos óleos de *M. circinelloides* cultivados em diferentes fontes de sacarose

Propriedade	Fonte de sacarose				Limites	Norma
	Açúcar bruto	Caldo de cana	Melado	Melaço de cana-de-açúcar		
Viscosidade ($\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$)	3,53	3,40	3,21	3,12	1,9 - 6,0	ASTM D6751
Densidade (kg m^{-3})	876,00	877,00	874,00	878,00	850,00 - 900,00	ASTM D6751
Índice de Saponificação, (mg g^{-1})	212,96	213,87	226,71	223,92	***	***
Índice de Iodo, ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	81,36	94,19	62,19	91,48	120, max,	EN 14214
Número de Cetano	53,62	50,63	56,38	50,09	47, min,	ASTM D6751
Estabilidade Oxidativa, (h)	8,13	6,22	8,93	6,62	3, min,	ASTM D6751

Fonte: Próprio autor.

As propriedades estimadas pelos lipídios e indicadas na Tabela 5.5, viscosidade, densidade, índice de iodo, número de cetano e estabilidade oxidativa, encontram-se dentro dos parâmetros estabelecidos pelas principais agências

reguladoras. Em relação à estabilidade oxidativa, pode-se verificar que os lipídios com maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados (caldo de cana-de-açúcar e melaço) apresentaram menores valores, porém ainda foram capazes de atender a norma ASTM D6751 (3 h, mínimo).

5.3 Conclusões

Todas as quatro fontes sacaríneas utilizadas foram assimiladas pelo fungo *Mucor circinelloides* URM 4182 fornecendo elevados valores de biomassa oleaginosa, atingindo até 39,2% de lipídios quando foi utilizado açúcar bruto como fonte de carbono. Os lipídios microbianos extraídos apresentaram composição em ácidos graxos semelhantes aos óleos vegetais, com propriedades indicadas para a produção de biodiesel. Os óleos obtidos apresentaram ainda elevadas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente a partir do caldo de cana-de-açúcar (32,5%) e do melaço (29,1%), indicando seu potencial de aplicação na produção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados de interesse das indústrias de alimentos e farmacêutica.

Os resultados obtidos comprovam a versatilidade do fungo *Mucor circinelloides* URM 4182 que pode ser inserido em diversas etapas da agroindústria de cana-de-açúcar, contribuindo para a integração de processos e estabelecendo uma cadeia de geração de diversos produtos com elevado valor agregado, viabilizando a implementação de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar. Vale destacar ainda que o subproduto de menor custo utilizado, o melaço, forneceu resultados semelhantes às fontes sacaríneas menos processadas (caldo de cana-de-açúcar) ou mais puras (açúcar bruto), indicando que não houve geração de inibidores durante o processamento que inviabilizassem sua utilização como meio de cultivo para a geração de lipídios microbianos.

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.
- AHMED, T.; SOUAD, A.; TIJANI, B. Energetic byproducts of sugar industry. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPOSITE MATERIALS & RENEWABLE ENERGY APPLICATIONS - ICCMREA, 2014, Sousse, **Anais...** DOI 10.1109/ICCMREA.2014.6843787.
- ARJUNA, A. Production of polyunsaturated fatty acids by fungi: a review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 5, p. 931-954, 2014.
- BELIGON, V.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Microbial lipids as potential source to food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 35-42, 2016.
- BEZERRA, T. L.; RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, p. 634-647, 2016.
- 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, 2015.
- CARVALHO, A. K. F.; DA CONCEIÇÃO, L. R. V.; SILVA J. P. V.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel production from *Mucor circinelloides* using ethanol and heteropolyacid in one and two-step transesterification. **Fuel**, v. 202, p. 503–11, 2017.
- CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B. S.; IZÁRIO FILHO, H. J.; DE CASTRO, H. F. Approaches to convert *Mucor circinelloides* lipid into biodiesel by enzymatic synthesis assisted by microwave irradiations. **Renewable Energy**, 125, 747–754, 2018.
- CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B.; REIS, C. E.; DE CASTRO, H. F. Sustainable enzymatic approaches in a fungal lipid biorefinery based in sugarcane bagasse hydrolysate as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 269-275, 2019.
- CARVALHO, A. K. F.; RIVALDI, J. D.; BARBOSA, J. C.; CASTRO, H. F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides* – A sustainable pathway for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 47–53, 2015.
- 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.

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

JI, X. J.; HUANG, H. Engineering microbes to produce polyunsaturated fatty acids. **Trends in Biotechnology**, v. 37, 344-346, 2019.

KLEMPOVA, T.; BASIL, E.; KUBATOVA, A.; CERTIK, M. Biosynthesis of gamma-linolenic acid and beta-carotene by Zygomycetes fungi. **Biotechnology Journal**, v. 8, p. 794-800, 2013.

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.

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.

SHARMA, A.; VERMA, A.; LUXAMI, V.; MELO, J. S.; D'SOUZA, S. F.; PRAKASH, N. T.; PRAKASH, R. New proton nuclear magnetic resonance-based derivation for quantification of alkyl esters generated using biocatalysis. **Energy & fuels**, v. 27, p. 2660-2664, 2013.

SONOWAL, S.; CHIKKAPUTTAIAH, C.; VELMURUGAN, N. Role of flow cytometry for the improvement of bioprocessing of oleaginous microorganisms. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.94, p. 1712-1726, 2019.

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.

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.

6. APLICAÇÃO DE LIPÍDIOS OBTIDOS EM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

6.1 Introdução

A utilização de melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e nutrientes para o crescimento microbiano apresenta uma vantajosa alternativa devido à sua abundância e baixo custo, uma vez que é um subproduto da produção de açúcar (JIRU et al., 2018; VIEIRA et al., 2016). Sua utilização como meio de cultivo de *Mucor circinelloides* URM 4182 se mostrou interessante devido à elevada produtividade lipídica alcançada (seção 4.2 deste trabalho), assim como sua aplicação na síntese enzimática de biodiesel (seção 5.2).

Entretanto, visando aumentar a competitividade da produção de biodiesel a partir de lipídios produzidos por *M. circinelloides* cultivado em meio baseado em melaço de cana-de-açúcar, neste capítulo foi avaliado a rota de produção de biodiesel via transesterificação direta da biomassa oleaginosa utilizando H_3PMo/Al_2O_3 como catalisador. A técnica de transesterificação direta de material oleaginoso, sem prévia extração, já revelou resultados promissores descritos na literatura para sementes oleaginosas (LIU et al., 2017; KOUTSOUKI et al., 2015; KARTIKA et al., 2013) e biomassas algais e fúngicas (THLIVEROS; UCKUNKIRAN; WEBB, 2014; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES., 2013; VICENTE et al., 2010), assim como o uso do catalisador heterogêneo H_3PMo/Al_2O_3 apresenta comprovada eficiência na transesterificação de óleos vegetais e microbianos com elevada acidez (CONCEIÇÃO et al., 2019; CARVALHO et al., 2017).

A composição dos lipídios obtidos por *M. circinelloides* URM4182 quando cultivado em melaço de cana-de-açúcar apresentou também elevada concentração de ácidos graxos poli-insaturados (seção 5.2). Desta forma, com o intuito de elucidar o potencial de geração de outros produtos de elevado valor agregado, neste capítulo foi avaliada também a produção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados a partir da hidrólise enzimática dos triacilgliceróis presentes no lipídio microbiano. Soluções concentradas de ácidos graxos poli-insaturados (como ácidos gama-linolênico e linoleico, C18:3 e C18:2, respectivamente) têm se destacado como produto de grande interesse industrial, principalmente das indústrias farmacêutica e alimentícia, devido às suas aplicações nutracêuticas. Esses compostos pertencem às classes ômega 3 (ω -3) e ômega 6 (ω -6) e

desempenham funções substanciais como precursores de prostaglandinas e componentes estruturais importantes para a saúde humana. São denominados ácidos graxos essenciais e como não são produzidos por mamíferos, seu consumo por dieta é imprescindível (BHARATHIRAJA et al., 2017).

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Avaliação da influência da razão molar e concentração de catalisador na transesterificação direta

Apesar dos promissores resultados alcançados no uso do catalisador H_3PMo/Al_2O_3 relatados na transesterificação direta de biomassa de *M. circinelloides* (CARVALHO et al., 2017), foram adotados parâmetros reacionais adaptados das condições aplicadas para óleos vegetais (CONCEIÇÃO et al., 2018). A influência de parâmetros importantes na transesterificação direta razão molar e concentração de catalisador, foram avaliadas por um planejamento fatorial completo com triplicata no ponto central. A matriz experimental e os resultados obtidos em função do teor de ésteres no produto final encontram-se na Tabela 6.1.

Com os dados obtidos foi possível verificar que o catalisador H_3PMo/Al_2O_3 foi capaz de fornecer elevados teores de ésteres em todas as reações analisadas (91,9-96,6%), sendo que o valor mais elevado foi alcançado aplicando razão molar (álcool: óleo) de 120:1 e 15% em massa de catalisador. A reação que forneceu o menor teor de ésteres foi efetuada na razão molar de 60:1 e 5% de catalisador, esses resultados indicam que tanto a razão molar como a concentração de catalisador exercem influência positiva na formação dos ésteres.

Os efeitos das variáveis independentes analisadas encontram-se indicados no diagrama de Pareto apresentado na Figura 6.1. É possível verificar que o termo linear referente a variável X_1 (Razão molar) foi o que apresentou a maior influência em função do teor de ésteres, seguido do termo linear referente a variável X_2 (% catalisador), o efeito positivo desses fatores indica que há uma tendência de aumento no teor de ésteres empregando razões molares e concentração de catalisador mais elevados. Os termos quadráticos significativos com efeitos negativos indicam que o modelo pode ser maximizado. A interação entre os fatores,

também significativa, apresentou efeito positivo menor que os termos lineares isolados.

Tabela 6.1 – Matriz experimental e teor de ésteres obtidos na transesterificação direta de biomassa de *M. circinelloides* URM4182 de acordo com o planejamento fatorial

Exp	Variáveis Independentes (Fatores)				Variável dependente (Resposta)
	Razão Molar X_1		Catalisador (%) X_2		Teor de ésteres (%)
1	+	120	+	15	96,6
2	+	120	-	5	93,7
3	-	60	+	15	93,2
4	-	60	-	5	91,9
5	0	90	0	10	94,5
6	0	90	0	10	94,7
7	0	90	0	10	94,8
8	+	120	0	10	95,6
9	-	60	0	10	92,8
10	0	90	+	15	95,6
11	0	90	-	5	93,4

Fonte: Próprio autor.

Figura 6.1 - Diagrama de Pareto do planejamento aplicado a transesterificação direta de *M. circinelloides* URM4182

Fonte: Próprio autor.

A influência positiva do aumento da razão molar, ou seja, maior proporção de etanol no meio reacional pode estar relacionada com o fato do etanol atuar simultaneamente como solvente de extração e reagente da transesterificação. Desta forma, maior quantidade de etanol no meio aumenta sua disponibilidade, uma vez que ele é também consumido ao decorrer da reação, favorecendo os fenômenos de transferência de massa envolvidos e facilitando a atuação e acesso do catalisador sobre o substrato.

Os dados do planejamento foram analisados com auxílio do *software* Statistica versão 12 (StatSoft Inc., USA). A Tabela 6-2 mostra a análise de variância (ANOVA) dos dados analisados.

Tabela 6.2 – Análise de variância do planejamento aplicado a transesterificação direta de biomassa de *M. circinelloides* URM4182

Fator	Soma Quadrática (SQ)	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p<0,05
X₁ (L)	10,66667	1	10,66667	630,7054	0,000002
X₁ (Q)	0,80344	1	0,80344	47,5062	0,000984
X₂ (L)	6,82667	1	6,82667	403,6515	0,000006
X₂ (Q)	0,17544	1	0,17544	10,3734	0,023445
X₁*X₂	0,64000	1	0,64000	37,8423	0,001651
Erro	0,08456	5	0,01691		
SQ Total	19,48727	10			

Fonte: Próprio autor.

De acordo com os dados apresentados na ANOVA da Tabela 6-2 foi possível propor um modelo estatístico em que todos os termos lineares, quadráticos e de interação entre os fatores foram significativos sob um nível de significância de 95% ($p < 0,05$), indicando a rejeição das hipóteses nulas para os termos avaliados.

A equação do modelo proposto está indicada na Eq 7 e apresentou um coeficiente de correlação $R^2=0,99566$.

$$z = 84,851 + 0,131 \cdot X_1 - 0,001 \cdot X_1^2 + 0,184 \cdot X_2 - 0,011 \cdot X_2^2 + 0,003 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (7)$$

Em que: z = teor de ésteres no produto; X_1 = razão molar (álcool:óleo); X_2 = concentração de catalisador (% m/m).

A partir do modelo proposto pela equação 7 foi possível gerar a superfície de resposta apresentada na Figura 6.2. Pela superfície de resposta obtida fica visualmente possível perceber que as condições reacionais com maior concentração de etanol e catalisador favorecem a formação dos ésteres de etila.

Figura 6.2 - Superfície de resposta do modelo proposto pelo planejamento aplicado a transesterificação direta de *M. circinelloides* URM4182

Fonte: Próprio autor.

Para confirmar a adequação do modelo aos dados obtidos experimentalmente, um gráfico de correlação do modelo com os dados obtidos encontra-se disposto na Figura 6.3. É possível observar que o modelo proposto apresentou elevada correlação com todos os pontos experimentais aplicados no planejamento, corroborando com as demais análises.

Baseado nos resultados apresentados, a melhor condição aplicada experimentalmente foi de razão molar 120:1 e 15% de catalisador, atingindo 96,6% de teor de ésteres, que atende aos limites estabelecidos pelas principais normas internacionais (>96,5%).

Figura 6.3 - Correlação do modelo proposto pelo planejamento aplicado a transesterificação direta de *M. circinelloides* URM4182 com os dados experimentais obtidos

Fonte: Próprio autor.

Foram realizadas também reações utilizando razão molar 120:1 e avaliando um aumento na concentração de catalisador. A reação utilizando 20% de catalisador atingiu 96,7% de teor de ésteres enquanto a reação com 30% de $\text{H}_3\text{PMo}/\text{Al}_2\text{O}_3$ alcançou 96,9%, não demonstrando uma forte influência no resultado. Neste caso, considerando o erro experimental e o intervalo de confiança, foi utilizado 20% em massa de catalisador para garantir o teor de ésteres acima de 96,5% no produto final.

6.2.2 Transesterificação direta da biomassa oleaginosa de *Mucor circinelloides*

A abordagem de transesterificação direta da biomassa oleaginosa, sem prévia extração dos lipídios, apresenta vantagens na redução dos custos globais de processo ao integrar as etapas de extração e reação, possibilitando a incorporação

de um novo processo industrial biotecnológico inserido no contexto de biorrefinarias. Esta estratégia de reação direta de biomassa fúngica é ainda pouco relatada na literatura, sendo a catálise homogênea ácida a mais abordada, utilizando HCl, BF₃, cloreto de acetila e ácido sulfúrico (KAKKAD et al., 2015; KIM et al., 2015, MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2015, CHEIRSILP; LOUHASAKUL, 2013).

Utilizando os parâmetros estabelecidos anteriormente (seção 6.2.1 deste trabalho), a biomassa fúngica cultivada em meio baseado em melaço de cana-de-açúcar (seção 5.2 deste trabalho) foi avaliada como matéria-prima de baixo custo para a obtenção de biodiesel. As análises realizadas no produto final purificado da reação encontram-se sumarizadas na Tabela 6.3.

A reação utilizando 20% do catalisador H₃PMo/Al₂O₃ alcançou 96,7% em teor de ésteres, atendendo aos limites estabelecidos pelas principais normas de regulamentação (ANP, ASTM e EN). Os valores de monoacilgliceróis residuais presentes se mostraram superiores aos limites exigidos (3,2 > 0,8%), enquanto que os demais parâmetros analisados (teor de diacilgliceróis, densidade, viscosidade e teor de água) se adequaram às especificações, conforme pode ser verificado na Tabela 6.3. Estes resultados comprovam o potencial da conversão direta de biomassa oleaginosa de *Mucor circinelloides* URM 4182 em ésteres de etila e sua aplicação como biodiesel.

Tabela 6.3 -Análise do produto da transesterificação direta de biomassa de *M. circinelloides* cultivado em meio baseado em melaço

Parâmetro	Resultado experimental	Limites	Norma
Teor de ésteres (%)	96,7 ± 0,2	≥96,5	ASTM D6751
Monoacilgliceróis (%)	3,2 ± 0,2	<0,8	EN 14105
Diacilgliceróis (%)	0,1 ± 0,1	<0,2	EN 14105
Densidade a 20 °C (kg cm ⁻³)	881 ± 7,0	860 a 900	EN 14214
Viscosidade a 40 °C (mm ² s ⁻¹)	5,7 ± 0,2	1,6 a 6,0	ASTM D6751
Teor de água (mg kg ⁻¹)	482 ± 12,0	500 mg kg ⁻¹	EN 14214

Fonte: Próprio autor.

Para verificar a eficiência de extração durante a reação direta, as biomassas oleaginosas *in natura*, após extração de lipídio com etanol sob irradiação de micro-ondas e após a transesterificação direta, foram submetidas a análises de infravermelho com transformada de Fourier. Os espectros obtidos podem ser visualizados na Figura 6.4.

Os espectros das três amostras apresentaram perfis semelhantes, entretanto nas amostras residuais da extração de lipídio (linha azul) e da transesterificação direta (linha laranja) verifica-se redução ou desaparecimento de algumas bandas na região 2855 a 3010 cm^{-1} características das vibrações de estiramento de C-H, C=O e C-O-C presentes em ésteres (FORFANG et al., 2017). Nota-se ainda redução das bandas presentes em 2920 cm^{-1} e 2855 cm^{-1} relacionadas ao estiramento da ligação C-H em $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ características de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos.

Figura 6.4 - Análise de FTIR da biomassa de *M. circinelloides* sem modificação, após extração em micro-ondas e após transesterificação direta

Fonte: Próprio autor.

A banda em 1740 cm^{-1} presente na biomassa oleaginosa original (linha preta, sem tratamento) não foi observada nas amostras submetidas à extração e transesterificação direta. Esta banda pode ser associada ao estiramento de $\text{C}=\text{O}$ presente em ésteres indicando eficiência na extração de mono-, di- e triacilgliceróis presentes na biomassa oleaginosa. Verificou-se também o desaparecimento da banda presente em 3010 cm^{-1} relacionada aos estiramentos de $=\text{C}-\text{H}$ presentes em ácidos graxos insaturados, indicando total extração destes compostos nas duas amostras analisadas. Estes resultados comprovam a eficiência da extração durante a transesterificação direta, apresentando características semelhantes na análise por FTIR.

6.2.3 Aplicação de lipídios na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados

A hidrólise de triacilgliceróis poli-insaturados é uma estratégia eficiente para aumentar a concentração desses componentes nos lipídios, além de ter sido demonstrado que a absorção de PUFA's pelo homem é facilitada quando se apresentam na forma de ácidos graxos livres (WANG et al., 2012). As aplicações destinadas ao consumo humano geralmente possuem exigências mais rigorosas em relação à produção e purificação dos produtos (RAY; PRAMANIK; BERA, 2017), desta forma, neste trabalho, foi avaliada a aplicação de um biocatalisador na hidrólise dos triacilgliceróis presentes no lipídio microbiano. A lipase de *Candida rugosa* foi utilizada devido ao seu bom desempenho como catalisador da reação de hidrólise de triacilgliceróis de origem vegetal ou microbiano amplamente demonstrado na literatura (BREDDA et al., 2018).

Métodos não convencionais de aquecimento, como ondas de ultrassom e micro-ondas, têm sido estudados como uma atrativa ferramenta para acelerar as reações enzimáticas (GUDE et al., 2013). Desta forma, foi também avaliado a influência da utilização de ondas de ultrassom na cinética reacional da hidrólise enzimática de lipídios de *M. circinelloides*. A Figura 6-5a mostra o perfil das reações de hidrólise em função da variação da concentração de biocatalisador sob aquecimento convencional, apresentando um típico perfil de hidrólise com liberação de ácidos graxos livres por clivagem dos triacilgliceróis ao decorrer do tempo. É

possível observar na Figura 6.5 que a concentração de biocatalisador influenciou a cinética reacional apresentando valores de grau de hidrólise próximos à 100% com 120 min de reação quando aplicado 20 e 30% de biocatalisador, enquanto a reação utilizando 10% de biocatalisador atingiu 84,7% de grau de hidrólise no mesmo período.

Figura 6.5 - Perfil do grau de hidrólise em função do tempo com variação da concentração de catalisador e influência de a) aquecimento convencional e agitação magnética e b) utilização de banho de ultrassom

Fonte: Próprio autor.

As concentrações de 20 e 30% não ocasionaram diferenças consideráveis nos resultados de hidrólise, indicando limitação de substrato disponível no meio. Os elevados rendimentos de hidrólise obtidos indicam a eficiência do biocatalisador selecionado e confirmam que a lipase de *Candida rugosa* empregada é uma enzima não específica (FABER, 2011), capaz de atuar em qualquer posição da molécula do triacilglicerol, sem apresentar preferência por ácidos graxos específicos.

Os perfis das reações presentes na Figura 6.5b, mostram que a aplicação de ondas de ultrassom como aquecimento não convencional foi capaz de melhorar o desempenho da reação com 10% de lipase de *Candida rugosa*, atingindo resultados semelhantes às reações com 20 e 30% de biocatalisador sem a utilização de ondas de ultrassom. A utilização de ultrassom não ocasionou influência marcante nas reações com concentrações mais elevadas de catalisador, indicando que a cinética reacional já se encontrava elevada nestas condições.

A principal influência da aplicação de ondas de ultrassom pode ser vista nos tempos iniciais de reação (Figura 6.6), proporcionando aumento do grau de hidrólise da reação com 10% de biocatalisador em 67,1% em 15 min de reação. Estes dados indicam que o ultrassom apresenta capacidade de influenciar na taxa inicial da reação enzimática de hidrólise de triacilgliceróis microbianos. Desta forma, os valores das taxas iniciais de hidrólise foram calculados e podem ser comparados na Figura 6.6. Verifica-se a aplicação de ultrassom não influenciou de forma marcante as reações conduzidas com elevado carregamento enzimático (20 e 30% de biocatalisador), indicando apenas um leve aumento na taxa inicial da reação. Porém, nas hidrólises conduzidas com baixo carregamento enzimático (10% de biocatalisador) taxa inicial de hidrólise aumentou de $22,8 \times 10^3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ para $37,3 \times 10^3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, correspondendo incremento 63,6%. Estes resultados indicam que o uso de métodos de aquecimento não convencionais, como o ultrassom, pode contribuir positivamente para o aumento da velocidade de reação, permitindo alcançar resultados satisfatórios com menor concentração de biocatalisador.

Figura 6.6 - Taxas iniciais de hidrólise das reações com variação da concentração de catalisador e forma de aquecimento (convencional e ultrassom)

Fonte: Próprio autor.

Os produtos purificados das reações que atingiram graus levados de hidrólise (>98%) foram caracterizados em função do perfil de ácidos graxos para avaliar a concentração de PUFA's no produto. As amostras apresentaram em média 236 g L⁻¹ de ácidos graxos livres totais, sendo 10,7% de ácido linoleico (C18:2) e 19,4% de ácido gama-linolênico (C18:3), correspondendo a 30,1% de ácidos graxos poli-insaturados. Estes resultados mostram o potencial de produção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados obtidos a partir de lipídios de *M. circinelloides* URM4182 cultivado em meio de baixo custo baseado em melaço de cana-de-açúcar, permitindo a diversificação de produtos gerados a partir da integração da indústria de cana-de-açúcar dentro do conceito de biorrefinarias.

6.3 Conclusões

Apesar de o biodiesel ser um produto que apresenta forte tendência de aumento ao decorrer dos próximos anos, a diversificação de produtos industriais é essencial para garantir a adequação da produção à demanda de mercado, podendo gerar lucros em diferentes segmentos industriais. Os dados obtidos comprovaram

o potencial de aplicação dos lipídios sintetizados pelo fungo *Mucor circinelloides* cultivado em meio baseado em melaço de cana-de-açúcar.

A transesterificação direta da biomassa fúngica oleaginosa utilizando como catalisador $\text{H}_3\text{PMo}/\text{Al}_2\text{O}_3$ nas condições preditas pelo delineamento fatorial promoveu a formação de 96,7% de ésteres de etila, atendendo as normas internacionais de biodiesel, além de contribuir com a redução dos custos globais de processo ao associar as etapas de extração e de transesterificação utilizando etanol simultaneamente como solvente e reagente.

A produção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados também foi avaliada seguindo a rota de hidrólise enzimática dos triacilgliceróis presentes nos lipídios microbianos. Os resultados obtidos alcançaram valores próximos a 100% de grau de hidrólise com a utilização de 20% de lipase de *Candida rugosa* sob aquecimento convencional. Foi comprovado também que a aplicação de técnicas de aquecimento não convencionais, como ultrassom, pode ser interessante para o aumento da cinética reacional da hidrólise enzimática.

REFERENCIAS

- BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1716-1721, 2008.
- BHARATHIRAJA, B.; SOWMYA, V.; SRIDHARAN, S.; YUVARAJ, D.; JAYAMUTHUNAGAI, J.; PRAVEENKUMAR, R. Biodiesel production from microbial oil derived from wood isolate *Trichoderma reesei*. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 538-541, 2017.
- BREDDA, E. H.; SILVA, M. B.; DE CASTRO, H. F.; DA SILVA, A. P. T.; DA RÓS, P. C. M. Microalgae as a source of functional PUFAs: A green low-cost pathway via enzymatic hydrolysis. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, p.1-13, 2018
- CARVALHO, A. K. F.; DA CONCEIÇÃO, L. R. V.; SILVA J. P. V.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel production from *Mucor circinelloides* using ethanol and heteropolyacid in one and two-step transesterification. **Fuel**, v. 202, p. 503–11, 2017.
- CONCEIÇÃO, L. R. V; CARNEIRO, L. M; WETLER, T. C; CORTEZ, D. V ; DE CASTRO, H. F; Application of alumina-supported 12-molybdophosphoric acid as heterogeneous catalyst for biodiesel synthesis from non-edible oil, p. 64-68 . In: COBEQ, 2018, São Paulo. **Anais...** DOI 10.5151/cobeq2018-PT.0018.
- CHEIRSILP, B.; LOUHASAKUL, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 329-337, 2013.
- FABER, K. Berlin: **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**. 6rd ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, 2011. 436p.
- FORFANG, K., ZIMMERMANN, B., KOSA, G., KOHLER, A., SHAPAVAL, V. FTIR spectroscopy for evaluation and monitoring of lipid extraction efficiency for oleaginous fungi. **PloS One**, v. 12, DOI 10.1371/journal.pone.0170611, 2017.
- 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.
- GUDE, V.; PATIL, P.; MARTINEZ-GUERRA, E. Microwave energy potential for biodiesel production. **Sustainable Chemical Processes**, v.1 n.5, p. 1-31, 2013.
- HIDALGO, P.; TORO, C.; NAVIA, R. Advances in direct transesterification of microalgal biomass for biodiesel production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, p. 179-199, 2013.
- JIRU, T. M.; STEYN, L.; POHL, C.; ABATE, D. Production of single cell oil from cane molasses by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 as a biodiesel feedstock. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 91-98, 2018.

KAKKAD, H., KHOT, M., ZINJARDE, S., KUMAR, A.R. Biodiesel production by direct in situ transesterification of an oleaginous tropical mangrove fungus grown on untreated agro-residues and evaluation of its fuel properties. **Bioenergy Research**, v. 8, p. 1788–1799, 2015.

KARTIKA, I. A.; YANI, M.; ARIONO, D.; EVON, P.; RIGAL, L. Biodiesel production from jatropha seeds: solvent extraction and in situ transesterification in a single step. **Fuel**, v. 106, p. 111-117, 2013.

KIM, I.; SEO, Y. H.; KIM, G. Y.; HAN, J. I. Co-production of bioethanol and biodiesel from corn stover pretreated with nitric acid. **Fuel**, v. 143, p. 285-289, 2015.

KOUTSOUKI, A. A.; TEGOU, E.; KONTAKOS, S.; KONTOMINAS, M. G.; POMONIS, P. J.; MANOS, G. In situ transesterification of *Cynara cardunculus* L. seed oil via direct ultrasonication for the production of biodiesel. **Fuel Processing Technology**, v. 134, p. 122-129, 2015

LIU, Y.; TU, Q.; KNOTHE, G.; LU, M. Direct transesterification of spent coffee grounds for biodiesel production. **Fuel**, v. 199, p. 157-161, 2017.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; ROBLES-MEDINA, A.; HITA-PEÑA, E.; JIMÉNEZ-CALLEJÓN, M. J.; ESTÉBAN-CERDÁN, L.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; MOLINA-GRIMA, E. Biodiesel production from wet microalgal biomass by direct transesterification. **Fuel**, v. 150, p. 14-20, 2015

RAY, L.; PRAMANIK, S.; BERA, D. Enzymes-an existing and promising tool of food processing industry. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 58-71, 2016.

THLIVEROS P, UCKUNKIRAN E, WEBB C. Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. **Bioresource Technology**, v.157, p.181–187, 2014.

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.

VIEIRA, J. P. F.; IENCZAK, J. L.; COSTA, P. S.; ROSSELL, C. E. V.; FRANCO, T. T.; PRADELLA, J. G. C. Single cell oil production integrated to a sugarcane-mill: conceptual design, process specifications and economic analysis using molasses as raw material. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 478-485, 2016.

WANG, W.; LI, T.; NING, Z.; WANG, Y.; YANG, B.; MA, Y.; YANG, X. A process for the synthesis of PUFA-enriched triglycerides from high-acid crude fish oil. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 366-371, 2012.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A imprescindível necessidade da instauração de uma bioeconomia circular tem se firmado como atuante de um papel crítico ao enfrentar diversos desafios na manutenção de um futuro viável para a sociedade global. Diversos obstáculos como mudanças climáticas, aumento da população, limitação de recursos não renováveis e crescente demanda por alimentos, energia e materiais, podem ser contornados ou amenizados com a substituição do vigente sistema industrial de uso desenfreado de recursos naturais aliados à irresponsável geração de resíduos.

A implementação de biorrefinarias se destaca como uma das principais ferramentas na transformação do modelo industrial atual, estabelecendo um conceito de geração de produtos de interesse comercial a partir de matérias-primas renováveis por rotas de produção sustentáveis sem a geração de resíduos. Deste modo, isto é, redefinindo a abrangência do termo “resíduo” dentro de um contexto de aproveitamento dos coprodutos, é esperado que o impacto ambiental seja cada vez menor, contribuindo, por consequência direta, com o desenvolvimento econômico-social de comunidade envolvidas na implementação de novas rotas biotecnológicas.

Neste trabalho, foi comprovado o potencial de aplicação do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* URM 4182 como ferramenta robusta na conversão e aproveitamento de insumos renováveis para a geração de produtos de elevado valor agregado viabilizando a integração de processos. Adicionalmente, foi demonstrada a viabilidade de aproveitamento e integração de diversas cadeias processuais da agroindústria de cana-de-açúcar, com aproveitamento de subprodutos de baixo custo (melaço de cana-de-açúcar). A inserção das rotas de bioconversão dos coprodutos da indústria sucroalcooleira aliada com a versatilidade do fungo *Mucor circinelloides* permite a ampliação de agroindústrias bem estabelecidas atualmente, assim como a instalação de novas plantas totalmente baseadas em alternativas que atendem aos apelos da química verde e das necessidades socioambientais.

A técnica de transesterificação direta da biomassa oleaginosa se mostrou vantajosa como alternativa para reduzir custos de produção do biodiesel microbiano

ao associar as etapas de extração e conversão dos lipídios, utilizando etanol como agente acilante e solvente extrator, gerando um biocombustível de matriz renovável e de possível menor impacto ambiental. Este procedimento permite o aproveitamento de instalações industriais já estabelecidas, necessitando, portanto, menores custos de instalação, e consequentemente viabilizando uma transição rápida dos processos atuais para alternativas menos danosas ao meio-ambiente. A produção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados via hidrólise dos lipídios microbianos também foi demonstrada como alternativa de produto de interesse das indústrias de alimentos e farmacêuticas devido a seu conhecido potencial nutracêutico.

De uma forma geral, o presente trabalho contribuiu na avaliação de novas estratégias de produção de biodiesel e ácidos graxos de elevado valor agregado a partir da integração da cadeia industrial de cana-de-açúcar permitindo a estruturação e desenvolvimento de biorrefinarias baseadas em uma bioeconomia circular, demonstrando a viabilidade de integração de rotas enzimáticas e químicas na geração de produtos das indústrias de energia, alimentos e farmacêutica, utilizando o fungo filamentoso *M. circinelloides* URM 4182 como ferramenta de valorização de derivados e subprodutos agroindustriais. As principais conclusões obtidas foram:

- O microrganismo estudado *Mucor circinelloides* URM 4182 mostrou capacidade de assimilar diversas fontes de carbono presentes em subprodutos agroindustriais (glicose, frutose, xilose, sacarose, amido e glicerol) e gerar biomassa oleaginosa com potencial aplicação na produção de biodiesel e de ácidos graxos poli-insaturados;
- O fungo *M. circinelloides* URM 4182 foi capaz de assimilar sacarose presente em diferentes meios e em diferentes graus de pureza (açúcar bruto, caldo de cana, melado e melaço de cana-de-açúcar) sem a necessidade de adição externa de enzimas.
- A síntese enzimática de biodiesel assistida por micro-ondas a partir de lipídios obtidos pelo fungo estudado cultivado em meios baseados em sacarose atingiu elevados valores de teor de ésteres no produto final (95,3-97,1%), indicando ser uma rota atrativa industrialmente.

- Os lipídios obtidos a partir do meio contendo melaço de cana-de-açúcar mostraram potencial de aplicação na síntese direta de biodiesel via catálise química (atingindo 96,7% de teor de ésteres) e ainda como fonte de ácidos graxos poli-insaturados.
- A hidrólise enzimática dos triacilgliceróis presentes nos lipídios microbianos foi eficiente na produção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados, apresentando 30,1% de PUFA's no produto final.

A implementação industrial de novas rotas biotecnológicas, como a inserção do fungo *Mucor circinelloides* na cadeia produtiva, ainda apresenta diversos desafios e obstáculos a serem superados, como o aumento de escala e otimização das condições de todas as etapas de processo e o desenvolvimento de análises de cunho técnico econômico e de ciclo de vida envolvendo as principais etapas do processo.

Desta forma, como sugestão para trabalhos futuros recomenda-se:

Estudar o aumento de escala de cultivo do fungo *M. circinelloides* aliado ao desenvolvimento de análises técnico-econômica e de ciclo de vida, confirmando a viabilidade de implementação industrial dos processos propostos.

Estudar alternativas de aproveitamento da biomassa fúngica residual isenta de lipídios, como por exemplo, como fontes de proteína (ração animal), biocarvão, compósitos e adsorventes.