



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

CULTIVO DE *Meyerozyma guilliermondii* EM BATELADA E BATELADA
ALIMENTADA PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS A PARTIR DE GLICEROL
BRUTO

ENGENHEIRO QUÍMICO BRUNO LOUREIRO LADEIRA

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT
Orientador

PROF.^aDR.^a JANAÍNA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**CULTIVO DE *Meyerozyma guilliermondii* EM BATELADA E BATELADA
ALIMENTADA PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS A PARTIR DE GLICEROL
BRUTO**

MSc. BRUNO LOUREIRO LADEIRA

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT
Orientador

PROF.^aDR.^a JANAÍNA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Coorientadora

**RIO GRANDE, RS
2016**

L154c Ladeira, Bruno Loureiro.

Cultivo de *Meyerozyma guilliermondii* em batelada e batelada alimentada para produção de lipídios a partir de glicerol bruto / Bruno Loureiro Ladeira. – 2016.
85 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016.

Orientador: Dr. Carlos André Veiga Burkert.

Coorientador: Dr^a. Janaína Fernandes De Medeiros Burkert.

1. Leveduras oleaginosas. 2. Glicerol residual 3. Biodiesel
4. Batelada alimentada I. Burkert, Carlos André Veiga II. Burkert, Janaína Fernandes De Medeiros III. Título.

CDU 662.6

Dedico este trabalho às pessoas que são os maiores exemplos em minha vida, estiveram sempre presentes comigo: meu pai, Osmar Ladeira, e minhas queridas mães, Telka Ladeira e Neli Fossati.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Ao meu pai Osmar e minhas duas queridas mães Telka Ladeira e Neli Fossati, por sempre me apoiarem em tudo e acreditarem em mim, sem eles nada conseguiria; para elas meu eterno amor e gratidão.

A todos os meus irmãos, por sempre se fazerem presentes quando preciso, em especial a Ana Sanzo, por me ajudar nos momentos difíceis.

À minha amada esposa Niele Ayres, meu porto seguro que esteve presente ao longo desta trajetória sempre me dando suporte em qualquer circunstância com o seu amor, companheirismo, cumplicidade e carinho.

Ao meu orientador, chefe, amigão e paizão André, obrigado por ser essa pessoa maravilhosa e exemplar, não há palavras para agradecer a amizade, incentivo, paciência comigo e perseverança. À minha coorientadora e mãezona, Janaína por estar sempre disposta a me ajudar, pela sua dedicação e seus valiosos conselhos e esclarecimentos importantes com relação aos planejamentos experimentais.

À professora Susana e ao professor Pinto, pelas dicas importantes dadas na qualificação desse trabalho, aos componentes da banca de defesa, professora Leonor, Susan e Jamile, por disponibilizarem seu tempo precioso para contribuir com a conclusão desse trabalho. A pós-doutoranda Joana, uma excelente profissional, pelo seu suporte incondicional, sempre disposta a ajudar.

Aos estudantes de iniciação científica Sabrina, Tauane, Marina, Thaís e Bruna, pela ajuda nos experimentos. Não poderia esquecer de agradecer aos caros amigos e colegas da pós-graduação: Belkis, Daniela, Renata, Joice, Vanessa, Carina, Liliane e Michele, por serem pessoas maravilhosas e prestativas, por proporcionarem momentos felizes, pelo carisma e exemplo de pessoas competentes.

Ao pessoal da Microbiologia, Felipe, Élide, Thaís, Daiane e demais, pelo apoio que sempre me deram.

A alguns servidores e colegas de trabalho da FURG: a secretária Islanda, pelo suporte com a burocracia; a professora Eliana Furlong e a técnica Maristela, pela disponibilidade para as análises cromatográficas; os amigos Renato Dutra, João Vaz, Roque e Rafael, pelo apoio.

À FURG e à CAPES, pelo incentivo à qualificação.

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos
sempre depois de cada queda.”
Confúcio

RESUMO

A crescente produção de biodiesel em escala mundial transformou o glicerol bruto, o principal coproduto da reação, em uma *commodity* de baixo valor comercial, principalmente pelos altos custos envolvidos no processo de purificação e a incapacidade do mercado em absorver sua geração. Nesse contexto, esse trabalho vem contribuir na busca por alternativas tecnológicas visando agregar valor a este coproduto e garantir a sustentabilidade da cadeia produtiva do biodiesel, por meio do seu uso como fonte de carbono pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* para a produção de lipídios, com potencial para utilização como matéria-prima para gerar o biodiesel e como fonte de ácidos graxos essenciais. Um delineamento Plackett-Burman foi proposto, verificando-se que as variáveis mais influentes no processo foram as concentrações de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, extrato de levedura, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Com essas três últimas variáveis foi proposto um delineamento composto central rotacional, através do qual foi possível estabelecer modelos empíricos codificados para as respostas teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios na faixa de estudo realizada. As condições estabelecidas para o cultivo de *Meyerozyma guilliermondii* em batelada em frascos agitados foram: $5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $3 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $1 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ extrato de levedura; 30 g.L^{-1} glicerol; $0,0002 \text{ g.L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH inicial 5,5; temperatura 30°C . O perfil de ácidos graxos revelou a predominância de ácidos graxos poli-insaturados, incluindo os ácidos graxos essenciais linoleico e gama linolênicos, sendo que a composição do meio de cultivo exerceu influência nesse perfil. Parâmetros de qualidade importantes para comercialização de biodiesel foram estimados considerando a composição em metil ésteres de ácidos graxos e correlações empíricas, indicando valores de densidade, viscosidade, índice de saponificação e calor de combustão dentro das faixas recomendadas. Como objetivo de aumentar a produção de lipídios, diferentes estratégias de alimentação foram propostas em cultivos em batelada alimentada. A alimentação de um pulso contendo somente glicerol bruto em 48 h de cultivo levou a incrementos de 23%, 96,8%, 38,8% e 37,1% no teor de lipídios, lipídios totais, produtividade de lipídios e biomassa, respectivamente, em relação aos cultivos em batelada, atingindo valores de 18,70%, $2,42 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,0143 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $12,96 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chaves: Leveduras oleaginosas. Glicerol residual. Biodiesel. Batelada alimentada.

ABSTRACT

The growing production of biodiesel worldwide converted raw glycerol, the main byproduct of the reaction, in a low commercial value commodity, especially considering the high costs involved in the purification process and the market's inability to absorb its generation. In this context, this work contributes in the search for technological alternatives in order to add value to this byproduct and ensure the sustainability of the biodiesel production chain, through its use as a carbon source by *Meyerozyma guilliermondii* for the production of lipids, with potential as a feedstock to produce biodiesel and as a source of essential fatty acids. A Plackett-Burman design was proposed, verifying that the most important variables in the process were the concentrations of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, yeast extract, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. With the last three variables, a central composite rotational design was proposed. It was possible to establish empirical coded models for lipid content, total lipids and lipid productivity in the range of study. The conditions established for *Meyerozyma guilliermondii* batch cultivation in shaken flasks were: $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ yeast extract; $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glycerol; $0.0002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; initial pH 5.5; temperature 30°C . The fatty acid profile showed the predominance of polyunsaturated fatty acids, including linoleic and gamma linolenic essential fatty acids, and the composition of the culture medium exerted influence on this profile. Important quality parameters for commercialization of biodiesel were estimated considering the composition of fatty acids methyl esters and empirical correlations, indicating values for density, viscosity, saponification number and heat of combustion in the recommended range. In order to increase the production of lipids, different feeding strategies were proposed in fed-batch cultivations. The feeding of a pulse containing crude glycerol at 48 h cultivation led to increases of 23%, 96.8%, 38.8% and 37.1% in lipid content, total lipids, lipid productivity and biomass, respectively, when compared to batch cultivation, reaching values of 18.70%, $2.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.0143 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and $12.96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively.

Keywords: Oleaginous yeast. Raw glycerol. Biodiesel. Fed-batch cultivation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matérias-primas para produção de biodiesel	19
Tabela 2 - Principais diferenças de composição entre as três classificações do glicerol.20	
Tabela 3 - Teor de lipídios de algumas leveduras oleaginosas cultivadas com diferentes fontes de carbono.....	23
Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos de leveduras oleaginosas cultivadas em meio contendo glicerol como fonte de carbono.	25
Tabela 5 – Substratos renováveis e conteúdo de lipídios para leveduras oleaginosas. ..	27
Tabela 6 – Acúmulo de lipídios por leveduras usando diferentes substratos e estratégias de cultivo.	33
Tabela 7 - Variáveis e níveis do delineamento experimental Plackett – Burman (valores reais e codificados).	37
Tabela 8 - Variáveis e níveis do DCCR (valores reais e codificados).....	37
Tabela 9 – Caracterização do glicerol e extrato de levedura quanto à composição de carbono, hidrogênio e nitrogênio.....	42
Tabela 10 – Matriz do delineamento experimental Plackett – Burman e respostas obtidas.....	43
Tabela 11 – Efeitos estimados para o teor de lipídios (%).	47
Tabela 12 – Efeitos estimados para os lipídios totais (g.L ⁻¹).....	47
Tabela 13 – Efeitos estimados para a produtividade de lipídios (g.L ⁻¹ .h ⁻¹).....	48
Tabela 14 – Efeitos estimados com checagem de curvatura para o teor de lipídios (%).	49
Tabela 15 – Efeitos estimados com checagem de curvatura para os lipídios totais (g.L ⁻¹).....	50
Tabela 16 – Efeitos estimados com checagem de curvatura para produtividade de lipídios (g.L ⁻¹ .h ⁻¹).....	51
Tabela 17 - Composição dos meios de produção para estudo da produção de lipídios por <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	52
Tabela 18 – Comparação* entre os cultivos de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> em diferentes condições de cultivo.....	53
Tabela 19 – Matriz do delineamento composto central rotacional e respostas obtidas. 55	

Tabela 20 – Coeficientes de regressão significativos para construção dos modelos para teor de lipídios (%), lipídios totais produzidos (g.L ⁻¹) e produtividade de lipídios (g.L ⁻¹ .h ⁻¹).....	59
Tabela 21 –ANOVA para resposta teor de lipídios.....	59
Tabela 22 – ANOVA para resposta lipídios totais.....	59
Tabela 23 – ANOVA para resposta produtividade de lipídios.....	59
Tabela 24 – Diferentes composições* de meio de produção no cultivo de <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	61
Tabela 25 –Resultados obtidos* para o teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios no cultivo de <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	62
Tabela 26 – Perfil de ácidos graxos dos lipídios da biomassa de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> cultivada em meio contendo glicerol bruto em diferentes condições de cultivo.....	65
Tabela 27 - Valores de propriedades individuais dos metil ésteres de ácidos graxos encontrados na produção de lipídios pela levedura <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	68
Tabela 28 – Valores de propriedades estimadas do biodiesel para os Ensaios 1, 2 e 3.....	68
Tabela 29 - Limites estabelecidos pelos padrões ASTM, EM e ANP para comercialização do biodiesel.....	69
Tabela 30 – Ensaios de batelada alimentada e respostas obtidas*.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da reação de transesterificação da produção do biodiesel.....	18
Figura 2 - Indução ao acúmulo de lipídios por micro-organismos oleaginosos.....	24
Figura 3 - Via de degradação do glicerol por leveduras oleaginosas. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: A. fosfofrutoquinase; B. piruvato quinase; C. isocitrato desidrogenase; D. citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos). E: piruvato desidrogenase; F: piruvato carboxilase. Fonte: Adaptado de Fontes; Amaral; Coelho (2008).....	28
Figura 4 - Acompanhamento da biomassa de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ao longo dos cultivos. (a) Ensaios 1 ao 10; (b) Ensaios 11 ao 20.....	44
Figura 5 - Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos. (a) Ensaios 1 ao 10; (b) Ensaios 11 ao 20.....	45
Figura 6 - Acompanhamento da biomassa de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ao longo dos cultivos para os Ensaios 1, 2 e 3.....	53
Figura 7 - Acompanhamento da biomassa de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ao longo dos cultivos. (a) Ensaios 1 ao 9. (b) Ensaios 10 ao 18.....	56
Figura 8 - Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos. (a) Ensaios 1 ao 9; (b) Ensaios 10 ao 18.....	57
Figura 9 - Curvas de contorno para (a) teor de lipídios; (b) lipídios totais produzidos; (c) produtividade de lipídios. Concentração de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ de $0,011 \text{ g.L}^{-1}$ (Nível 0). 60	
Figura 10 - Acompanhamento da biomassa de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ao longo dos cultivos para os Ensaios 1, 2 e 3.....	63
Figura 11 - Evolução do pH ao longo do tempo para os Ensaios 1, 2 e 3.....	64
Figura 12 - Acompanhamento da biomassa de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ao longo dos cultivos em batelada alimentada.....	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 BIODIESEL	18
3.2 GLICEROL	20
3.3 LEVEDURAS OLEAGINOSAS	21
3.4 SUBSTRATOS RENOVÁVEIS NO CULTIVO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS	25
3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM O ACÚMULO DE LIPÍDIOS EM LEVEDURAS	29
3.6 CULTIVO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS EM BATELADA ALIMENTADA	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MICRO-ORGANISMOS E MANUTENÇÃO	35
4.2 GLICEROL BRUTO	35
4.3 ANÁLISE ELEMENTAR CHN	35
4.4 PREPARO DO INÓCULO	35
4.5 CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS NO MODO BATELADA.....	36
4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN.....	36
4.7 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	37
4.8 CULTIVOS EM BATELADA ALIMENTADA	38
4.9 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	38
4.9.1. Determinação da biomassa	38
4.9.2. Determinação do pH	39
4.9.3.Determinação de lipídios	39
4.9.4.Perfil de ácidos graxos	39
4.9.5. Predição das propriedades do biodiesel	40

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS	42
5.2 DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN	42
5.2.1 Acompanhamento da biomassa ao longo dos cultivos	44
5.2.2 Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos	45
5.2.3 Avaliação dos efeitos das variáveis na produção de lipídios	46
5.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	54
5.3.1 Acompanhamento da biomassa ao longo dos cultivos	55
5.3.2 Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos	57
5.3.3 Avaliação da produção de lipídios através do DCCR	58
5.4 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	61
5.5 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	64
5.6 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES DO BIODIESEL	66
5.7 CULTIVOS EM BATELADA ALIMENTADA	70
6 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
APÊNDICE	82
ANEXO	85

1. INTRODUÇÃO

Devido à crise energética global e aos danos ambientais gerados pelos combustíveis fósseis, a busca por fontes alternativas de energia limpa e sustentável é urgente (POLI et al., 2014). O Brasil se destaca por apresentar 39,4% de sua matriz energética constituída por fontes renováveis de energia em relação aos padrões mundiais (13,2%), e uma importante parcela desta é representada pelos biocombustíveis, em que se destaca o biodiesel (BEN, 2015).

Conforme dados da Agência Nacional de Petróleo (ANP), a quantidade de biodiesel produzida em todo território brasileiro no ano de 2015 foi de 24.978.032 m³, enquanto que no estado do Rio Grande do Sul foram produzidos cerca de 7.069.165 m³. No contexto mundial a produção de biodiesel a partir de oleaginosas e gordura animal vem aumentando significativamente, entretanto a produção não satisfaz a demanda mundial. A síntese gera o glicerol bruto como subproduto indesejável, em proporções apreciáveis (cerca de 10%), sendo que o mercado atual não consegue absorvê-lo em sua totalidade (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; CHANG et al., 2013; MENEZES et al., 2013).

A disposição do glicerol bruto no meio ambiente pode causar sérios problemas ambientais, enquanto que um processo de purificação de forma a permitir sua utilização em diversos setores industriais (cosméticos, alimentos, produtos farmacêuticos, entre outros) é economicamente inviável, considerando seu baixo valor comercial (LEONETI et al., 2012). Dessa forma é necessário encontrar alternativas para converter o glicerol bruto em produtos de maior valor agregado, contribuindo para a sustentabilidade da cadeia produtiva do biodiesel. O glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono por diferentes micro-organismos para obtenção de diversos produtos, tais como: 1,3 – propanodiol (CHATZIFRAGKOU et al., 2011), ácido cítrico (PAPANIKOLAOU et al., 2008), ácido succínico (ZHANG; SHANMUGAM; INGRAM, 2010), *single cell protein* (SANTOS et al., 2013), *single cell oil* (SPIER; BUFFON; BURKERT, 2015) e carotenóides (SILVA et al., 2012).

A produção de lipídios microbianos, também denominados *single cell oil*, tem sido investigada por inúmeros pesquisadores, utilizando diferentes substratos, sobretudo pela necessidade de se dispor de biomassas alternativas como fonte de lipídios, que possam ser empregadas na produção de biodiesel, já que o incremento das áreas de plantio de oleaginosas para suprir a cadeia produtiva do biodiesel tem causado

uma competição por terras aráveis entre a produção de biocombustíveis e a produção de alimentos (MENEZES et al., 2013). Neste contexto, o uso de glicerol bruto como fonte de carbono para o cultivo de leveduras oleaginosas representa a possibilidade de o mesmo ser reciclado na cadeia produtiva, minimizando a geração de resíduos e contribuindo para uma produção sustentável (MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010; MEULLEMIESTRE et al., 2016). Além disso, os lipídios microbianos podem constituir uma importante fonte de ácidos graxos essenciais, com importância na alimentação humana e animal (CAZETTA; CELLIGOI, 2005).

No processo de produção de biomassa microbiana, os aspectos que devem ser observados dizem respeito à seleção do micro-organismo, o qual pode ser obtido por isolamento ou aquisição junto a coleções de cultura, aos substratos nutricionalmente importantes para o desenvolvimento desses micro-organismos e aos processos que serão utilizados na produção (MORAES et al., 2001).

Por outro lado, com a imposição de minimizar custos de processo é necessário analisar previamente a implantação do sistema de produção, como o objetivo de determinar faixas ótimas de operação que garantam um bom rendimento e produtividade, situação esta imprescindível para a viabilidade de um processo. Em cultivos microbianos geralmente se observa a influência de muitas variáveis, onde a importância de cada variável deve ser determinada, incluindo as concentrações dos componentes do meio de produção, pH inicial e temperatura.

Dessa forma, a otimização baseada na técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta é uma estratégia muito útil para melhor compreensão do sistema, permitindo a análise individual do efeito de cada variável (sinérgico ou antagônico), visando à maximização do rendimento e produtividade do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Apesar dessas vantagens, é escassa na literatura a utilização desta técnica na produção de biomassa microbiana como fonte de lipídios.

Um dos fatores mais importantes e estudados na produção de lipídios microbianos é a relação carbono/nitrogênio (C/N) do meio de cultivo, pois o acúmulo de lipídios pelas células é positivamente influenciado pelo excesso da fonte de carbono (BEOPOULOS et al., 2009). Entretanto, elevadas concentrações de glicerol inibem o crescimento microbiano em cultivos em batelada, dessa forma tem sido proposta a batelada alimentada, a fim de fornecer uma quantidade adicional de glicerol sem a ocorrência da inibição (RAIMONDI et al., 2014). O cultivo em batelada alimentada pode ser efetivo no incremento da densidade celular e teor de lipídios em micro-

organismos oleaginosos. As vantagens desse processo incluem a redução da inibição pelo substrato, a expansão da fase lipogênica e a maior produtividade de lipídios (CHANG et al., 2013; RAIMONDI et al., 2014). Dessa forma, diferentes estratégias de alimentação devem ser avaliadas, visando à melhoria do desempenho da produção lipídica.

A composição do meio de cultivo influi na composição dos ácidos graxos presentes nos lipídios produzidos pelo micro-organismo (ATHENSTAEDT et al., 2006). As fontes de carbono, hidrogênio, íons metálico, temperatura e pH são fatores que podem afetar a sua composição. Isto implica que a composição dos lipídios pode ser manipulada resultando em elevadas porcentagens dos ácidos graxos de interesse (DYAL; NARINE, 2005). Por outro lado, a composição de ácidos graxos influencia diretamente nas propriedades do biodiesel, sendo que características como o comprimento da cadeia e grau de insaturação exercem um papel fundamental na qualidade do biodiesel a ser produzido. A predição das propriedades do biodiesel com base na composição de ácidos graxos dos lipídios microbianos permite avaliar a potencialidade destes para a produção do biodiesel (DUARTE; MAUGERI, 2014).

Portanto, a presente tese visa elucidar alguns aspectos da produção de lipídios pela levedura *Meyerozyma guilliermondii*, isolada e identificada por Spier (2014) como potencial produtora de lipídios microbianos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da presente tese foi avaliar a produção de lipídios a partir da levedura *Meyerozyma guilliermondii* utilizando glicerol residual como fonte de carbono, nos modos batelada e batelada alimentada.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar as variáveis de processo mais influentes na produção de lipídios durante o cultivo da levedura *Meyerozyma guilliermondii* em frascos agitados em batelada;
- Estabelecer as condições de cultivo para a produção de lipídios por *Meyerozyma guilliermondii* em frascos agitados em batelada;
- Determinar o perfil de ácidos graxos dos lipídios produzidos;
- Predizer, com base na composição em ácidos graxos, as propriedades do biodiesel que pode ser obtido a partir do óleo microbiano produzido;
- Avaliar o processo de produção de lipídios no modo batelada alimentada pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* a partir das condições estabelecidas em cultivo em batelada, avaliando diferentes estratégias de alimentação.

3. REVISÃO DA LITERATURA

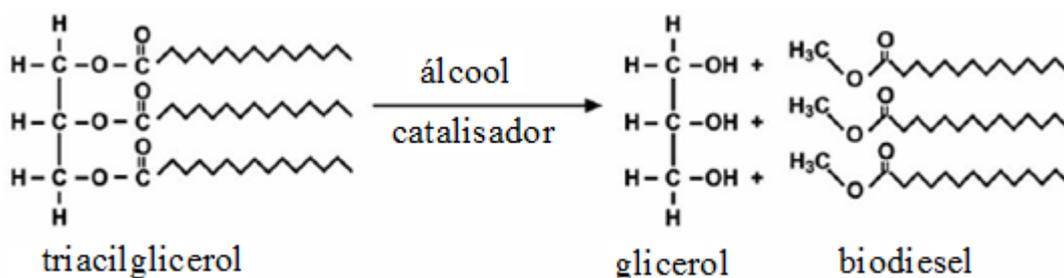
3.1. BIODIESEL

As preocupações com a segurança energética, alterações climáticas e aumento dos preços do petróleo estão impulsionando políticos e cientistas na busca por alternativas energéticas que permitam romper a dependência do petróleo fóssil. Combustíveis derivados de recursos renováveis constituem uma das melhores opções para liderar a transição dos combustíveis de petróleo a curto prazo (PINZI et al., 2009).

Nesse contexto, o biodiesel é uma das fontes de energia alternativa de grande prioridade e promissora para a substituição do óleo diesel, uma vez que é ambientalmente seguro, não tóxico e biodegradável, com propriedades semelhantes ao combustível diesel convencional produzido a partir do petróleo bruto, podendo ser utilizado em motores a diesel convencional sem qualquer transformação na motorização (PINZI et al., 2009).

Além disso, sua produção é versátil, no sentido de que pode ser produzido a partir de sementes de plantas, micro-organismos oleaginosos ou gorduras animais, através de reações de transesterificação ou craqueamento (MEULLEMIESTRE et al., 2016). A Figura 1 apresenta a reação clássica de transesterificação de um triacilglicerol presente em óleos ou gorduras com um álcool na presença de um catalisador. Os produtos dessa reação são ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol.

Figura 1 - Esquema da reação de transesterificação da produção do biodiesel.



Fonte: Leoneti et al. 2012

Existem várias matérias-primas essenciais para a produção de biodiesel. A Tabela 1 apresenta diversas fontes disponíveis adequadas para a produção do biocombustível. Os óleos não comestíveis, quando comparados aos óleos comestíveis, apresentam-se como matérias-primas mais promissoras, visto que não competem com as necessidades alimentares das pessoas e podem ser obtidos a partir de plantas cultivadas em terrenos baldios, limites de campos agrícolas, canais de irrigação e em florestas (PINZI et al., 2009; VERMA et al., 2016).

No entanto, o uso de gorduras animais comestíveis ou óleos vegetais para produção de biodiesel pode não ser sustentável por duas principais razões: a competição com a produção de alimentos, que pode provocar algumas dificuldades sociais, e o elevado preço de gordura animal ou óleo vegetal como matéria prima, que aumenta significativamente o custo de produção de biodiesel (MANEERUNG et al., 2016).

Tabela 1– Matérias-primas para produção de biodiesel

Fontes de óleos comestíveis	Fontes de óleos não comestíveis	Fontes biotecnológicas	Outras fontes
Coco	Jatropha	Leveduras	Resíduos de óleo de cozinha
Soja	Pongamia	Microalgas	Gorduras animais
Mamona	Mahua	Bactérias	Sebo bovino
Mostarda	Neem	Fungos	
Amendoim	Eucalipto		
Palma			

Fonte: Adaptado de Verma et al. (2016)

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de biodiesel, uma vez que grandes extensões de seu território apresentam condições climáticas favoráveis para o cultivo de oleaginosas, tem grande área de terras aráveis ainda não exploradas e uma longa tradição na cultura brasileira no uso de álcool como biocombustível em automóveis (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Em 2010, o país se tornou o segundo produtor mundial de biodiesel com uma produção na ordem de 2,4 milhões de m³ no ano, ficando apenas atrás da Alemanha. Já em 2014 os Estados Unidos foram o maior produtor de biodiesel

(4,7 milhões de m³), seguidos por Brasil e Alemanha, com semelhantes 3,4 milhões de m³ (BERGMANN et al., 2013).

Conforme dados da Agência Nacional do Petróleo (ANP), a quantidade de biodiesel produzida em todo território brasileiro no ano de 2015 foi de 24.978.032 m³, enquanto que no estado do Rio Grande do Sul foram produzidos cerca de 7.069.165 m³.

3.2. GLICEROL

Glicerol ou 1,2,3 – propano triol é um composto orgânico de fórmula molecular C₃H₈O₃, com muitas aplicações em diversos setores industriais (cosméticos, automotivo, farmacêutico, papel e celulose, couro, alimentos e têxteis). O glicerol pode ser classificado em três categorias glicerol bruto, purificado/refinado e sintetizado (GHOLAMI; ABDULLAH; LEE, 2014). O glicerol, na sua forma pura, é um líquido incolor, inodoro, viscoso, de pH neutro, solúvel em água e de baixa toxicidade (TAN; ABDUL AZIS; AROUA, 2013; RAIMONDI et al., 2014). A Tabela 2 apresenta algumas diferenças entre os três tipos de glicerol.

Tabela 2- Principais diferenças de composição entre as três classificações do glicerol.

Parâmetro	Glicerol bruto	Glicerol purificado	Glicerol refinado/comercial
Teor de glicerol (%)	60 – 80	99,1 – 99,8	99,20 – 99,98
Teor de umidade (%)	1,5 – 6,5	0,11 – 0,8	0,14 – 0,29
Cinzas (%)	1,5 – 2,5	0,054	< 0,002
Sabões (%)	3,0 – 5,0	0,1 – 0,16	0,04 – 0,07
Acidez (pH)	0,7 – 1,3	0,10 – 0,16	0,04 – 0,07
Cloro (ppm)	Não detectado	1,0	0,6 – 9,5
Cor (APHA)	Escuro	34 - 45	1,8 – 10,3

Fonte: Adaptado de Gholami, Abdullah e Lee (2014)

O glicerol bruto é o principal subproduto da cadeia do biodiesel, sendo que o recente crescimento da produção do biodiesel tem resultado em um aumento significativo no glicerol produzido (em média a cada 100 kg de biodiesel produzido é gerado 10 kg de glicerol bruto). A falta de destino para a grande quantidade de glicerol bruto gerado acarreta em acúmulo deste subproduto com conseqüente encarecimento da

produção do biodiesel, constituindo também um problema ambiental, pois seu descarte inadequado causa danos ao meio ambiente (GHOLAMI; ABDULLAH; LEE, 2014; POLI et al., 2014).

Esse subproduto, por possuir impurezas oriundas da produção do biodiesel, precisa ser submetido a um processo de purificação que requer procedimentos físico-químicos de elevado custo e consumo de energia, a fim de que possa ser utilizado pelas indústrias com variadas finalidades. Entretanto, devido ao crescimento exponencial da produção de biodiesel, o mercado não mais absorve esta produção nos seus usos tradicionais, contribuindo para a redução de seu valor comercial (TAN; ABDUL AZIZ; AROUA, 2013; RAIMONDI et al., 2014).

Para contornar essa situação, muitas pesquisas têm sido direcionadas para conversão microbiana desse substrato em produtos de maior valor agregado. O glicerol bruto tem sido utilizado como única fonte de carbono por diferentes microalgas, leveduras, bolores e bactérias, tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas (RYWINSKA et al., 2013), para a produção de produtos de valor agregado tais como: 1,3- propanodiol (CHATZIFRAGKOU et al., 2011), ácido cítrico (PAPANIKOLAU et al., 2008), biopolímeros (ASHBY; SOLAIMAN; STRAHAM, 2011), ácido succínico (ZHANG; SHANMUGAM; INGRAM, 2010), *single cell protein* (TACCARI et al., 2012) e *single cell oil* (PAPANIKOLAU; AGGELIS, 2002; SAENGE et al., 2011).

Nos últimos anos uma crescente atenção tem sido dada à produção de *single cell oil* (lipídios microbianos) usando glicerol bruto como fonte de carbono em cultivos microbianos, verificando-se que muitos organismos tais como algas, leveduras, bactérias e fungos possuem capacidade de acumular óleo sob condições apropriadas de cultivo. Esses lipídios consistem de triacil gliceróis (80 – 90%) com composição semelhante a muitos óleos vegetais, o que os torna atrativos como matéria-prima potencial para a produção do biodiesel, fazendo com que o glicerol possa ser reciclado na cadeia produtiva do biodiesel de forma a contribuir para sua produção sustentável (CHANG et al., 2015; MEULLEMIESTRE et al., 2016; CANONICO et al., 2016).

3.3. LEVEDURAS OLEAGINOSAS

Leveduras oleaginosas são micro-organismos unicelulares que possuem capacidade de acumular mais de 20% em massa de lipídios armazenados em uma região específica da célula microbiana denominada corpo lipídico (MENG et al., 2009). O

corpo lipídico é composto basicamente por um núcleo lipídico inserido em uma camada de fosfolipídios, onde muitas proteínas com diversas funções estão incorporadas (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Os lipídios produzidos por esses micro-organismos são denominados lipídios neutros, basicamente compostos por uma pequena fração de ésteres de esterol, e em maior proporção (80 a 90%) por triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia longa com composição semelhante à encontrada em óleos vegetais, o que os tornam úteis para a produção de biodiesel (MENG et al., 2009; BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Existe um grande número de leveduras oleaginosas descobertas, e atualmente, dentre essas, destacam-se cinco espécies: *Cryptococcus curvatus* (também conhecida como *Candida curvata* ou *Apiotrichum curvatum*), *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyi* e *Yarrowia lipolytica* (BEOPOULOS et al., 2009; AGEITOS et al., 2011). A Tabela 3 apresenta o conteúdo de lipídios das principais leveduras oleaginosas, cultivadas com diferentes fontes de carbono, encontradas na literatura recente.

As leveduras oleaginosas possuem vantagens em relação a outras fontes oleaginosas, podendo-se citar: apresentam altas taxas de crescimento, o cultivo não é afetado por condições climáticas e não necessitam de grandes áreas e também podem ser cultivadas com substratos de baixo custo, como resíduos e subprodutos agrícolas e industriais (AGEITOS et al., 2011; ZHAO et al., 2011).

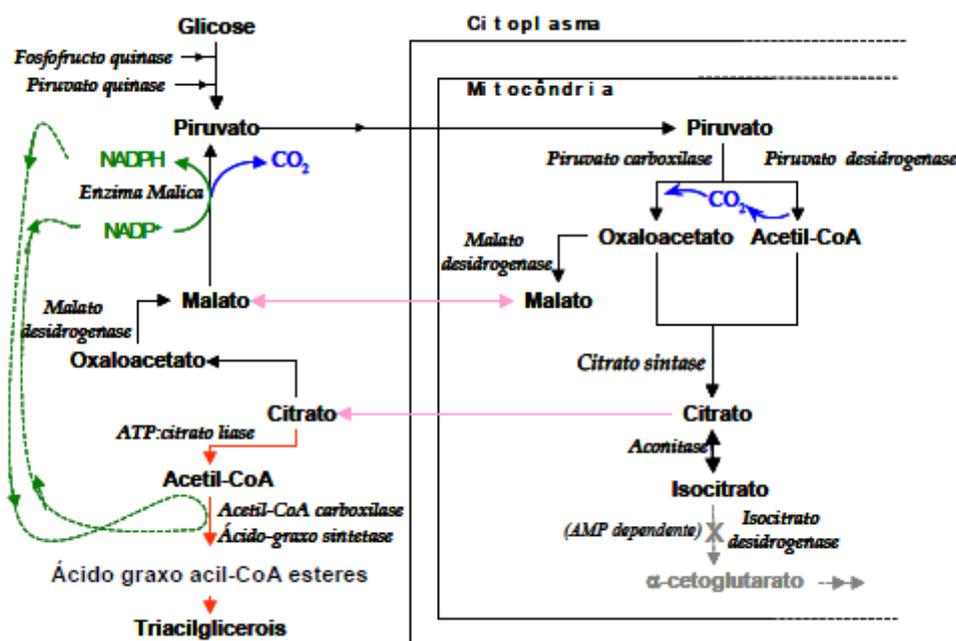
Em relação ao metabolismo do micro-organismo, a síntese dos lipídios pode ocorrer por duas vias metabólicas diferentes: a primeira, conhecida como via *denovo*, envolve a síntese de precursores de ácidos graxos, como acetil e melonil – CoA e sua subsequente alongação a um nível intermediário (C14 – C16), dependendo das enzimas presentes no micro-organismo. Estes precursores então alimentam a via de estocagem de lipídios, onde são formados os triacilgliceróis e ésteres de esterol. Os lipídios neutros são então estocados dentro de corpos lipídicos para servir como reserva de energia (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Tabela 3- Teor de lipídios de algumas leveduras oleaginosas cultivadas com diferentes fontes de carbono.

Levedura	Lipídios (% m/m)	Fonte de carbono	Referência
<i>Candida freyschussii</i>	33	Glicerol	RAIMONDI et al. (2014)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	65,1	Glicose	ZHANG et al. (2011 ^a)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	39,7	Celobiose e glicose	YU et al. (2014)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	30	Glicose	WILD et al. (2010)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	61,5	Glicose e xilose	ZHAO et al. (2008)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	58,3	Glicose e manose	YANG et al. (2014)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	39,0	Glicose e xilose	ZHANG et al. (2011b)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	21	Xilose e glicerol	EASTERLING et al.(2009)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	38,94	Xilose	PAN et al. (2009)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	48,2	Ácido acético	HUANG et al. (2016)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	76,1	Glicose	LI et al. (2006)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	30,1	Glicerol	POLI et al. (2014)

A segunda via metabólica para a síntese de lipídios se dá através da quebra de ácidos graxos, óleos e ocasionalmente alcanos a partir de meio de cultura, incorporação desses substratos e subsequente modificação para estocagem e acúmulo. Esta via, conhecida como *ex novo*, requer hidrólise de substrato hidrofóbico e incorporação/transporte de ácidos graxos na forma de tioésteres-CoA para dentro da célula, os quais alimentam as vias de estocagem de lipídios dentro de corpos lipídicos, para gerar acúmulo de lipídios neutros (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011). A via metabólica do acúmulo de lipídios por micro-organismos oleaginosos a partir de glicose como fonte de carbono está representada na Figura 2.

Figura 2—Via metabólica do acúmulo de lipídios por micro-organismos oleaginosos.



Fonte: Garzón (2009)

A literatura reporta que, além do conteúdo lipídico acumulado, o perfil dos ácidos graxos gerados pelas leveduras oleaginosas varia entre as espécies, e mesmo entre diferentes composições de meio e/ou condições de cultivo. Ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) são os principais ácidos graxos presentes nos lipídios microbianos (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011). A Tabela 4 ilustra o perfil de ácidos graxos de algumas leveduras oleaginosas cultivadas em meio contendo glicerol bruto.

Outro aspecto interessante é que o perfil de ácidos graxos produzidos pelas leveduras oleaginosas em geral apresenta semelhança como o perfil de ácidos graxos encontrados em óleos vegetais, logo esses lipídios microbianos podem ser usados para produzir biodiesel (PINZI et al., 2009).

Há relatos de que a composição dos ácidos graxos presentes nos lipídios microbianos influencia nas propriedades e na qualidade do biodiesel e que algumas das propriedades mais importantes podem ser previstas pela análise da estrutura química individual dos ácidos graxos presentes no óleo microbiano. Entre os parâmetros mais importantes estão o comprimento da cadeia, o número de ramificações e o grau de insaturação, capazes de prever propriedades importantes, tais como: índice de cetano,

índice de iodo, densidade, viscosidade cinemática, estabilidade oxidativa e calor de combustão (PINZI et al., 2009; PRATAS et al., 2011; DUARTE; MAUGERI, 2014).

Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos de leveduras oleaginosas cultivadas em meio contendo glicerol como fonte de carbono.

Levedura	Resíduos majoritários de ácidos graxos (%m/m)					Referência
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
<i>Candida freyschussii</i>	17,5	6,1	32,5	24,7	6,9	RAIMONDI et al. (2014)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	23	16,7	39,6	15,2	0,66	LIANG et al. (2010)*
<i>Lipomyces starkeyi</i>	39,3	-	7,8	42,5	4,2	SPIER; BUFFON; BURKERT (2015)*
<i>Lipomyces lipofer</i>	35,1	-	8,2	43,1	3,7	SPIER; BUFFON; BURKERT (2015)*
<i>Metschnikowia</i> sp.	21,2	9,3	32,9	10,5	1,8	CANONICO et al. (2016)*
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	22,2	5,7	21,3	39,5	6,7	GAO et al. (2016)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	16,01	21,86	18,05	15,91	1,76	EASTERLING et al. (2009)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	19,18	18,76	45,48	7,93	-	POLI et al. (2014)

* Glicerol bruto.

3.4. SUBSTRATOS RENOVÁVEIS NO CULTIVO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS

Vários tipos de substratos têm sido testados como fonte de carbono para avaliar o crescimento celular e a produção de lipídios pelas leveduras oleaginosas. O carbono orgânico proveniente de diferentes tipos de matérias-primas, quando usado como substrato em meios de cultivo por leveduras oleaginosas, pode influenciar

significativamente na taxa de crescimento celular, na biomassa microbiana e no teor de lipídios formado na biomassa dessas leveduras (SUBRAMANIAM et al., 2010).

Diferentes substratos (hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino, glicerol bruto, hidrolisado de sabugo de milho e resíduo de lodo ativado) foram estudados no cultivo de *Cryptococcus curvatus*, atingindo-se, respectivamente, biomassa de 10,83 g.L⁻¹ (LIANG et al., 2012), 7,11 g.L⁻¹ (CUI; BLACKBURN; LIANG, 2010), 12,60 g.L⁻¹ (CHANG et al., 2015) e 9,84 g.L⁻¹ (SEO; LEE; HAN, 2013).

Também foi estudado o uso de hidrolisado de amido de mandioca (WANG et al., 2012) e efluente de bioetanol (ZHOU et al., 2013) no cultivo de *Rhodospiridium toruloides*, atingindo-se biomassa de, respectivamente, 18,5 g.L⁻¹ e 3,8 g.L⁻¹.

Melaço de beterraba foi usado no cultivo de *Rhodotorula glutinis*, obtendo-se biomassa de 16,2 g.L⁻¹ (TASKIN et al., 2016). O uso de hidrolisado de bagaço de cana como fonte de carbono foi testado com *Yarrowia lipolytica*, obtendo-se biomassa microbiana de 11,42 g.L⁻¹ (TSIGIE et al., 2011).

Yuet al. (2011) estudaram o uso do hidrolisado de palha de trigo para a produção de biomassa de *Cryptococcus curvatus*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis* e *Yarrowia lipolytica*, obtendo valores de biomassa de 17,2 g.L⁻¹, 14,7 g.L⁻¹, 13,8 g.L⁻¹ e 7,8 g.L⁻¹, respectivamente.

Ykema et al. (1988) avaliaram o crescimento e produção de lipídios por *Apiotrichum curvatum* utilizando permeado de soro de leite em diferentes condições. Conseguiram obter valores próximos a 50% de lipídios com uma relação C/N de 70 em modo contínuo de cultivo.

Huang et al. (2012) utilizaram hidrolisado de sabugo de milho detoxificado para produção de lipídios por *Trichosporon fermentans*, obtendo 24,4 g.L⁻¹ de biomassa com teor de lipídios de 40,1%. Bialy, Gomma e Azab (2011) utilizaram resíduos de óleo de fritura de produtos cárneos e vegetais para produção de lipídios por *Yarrowia lipolytica*, obtendo 57,89% de lipídios.

A Tabela 5 apresenta alguns substratos renováveis utilizados no cultivo das principais leveduras oleaginosas, bem com os respectivos percentuais de lipídios obtidos.

O uso de glicerol bruto como substrato para produção de óleos microbianos tem sido de grande interesse para os pesquisadores, uma vez que é um substrato de baixo custo com alto teor de carbono e algumas de suas impurezas possuem efeitos positivos na produção de lipídios (GAO et al., 2016). Além disso, o glicerol bruto

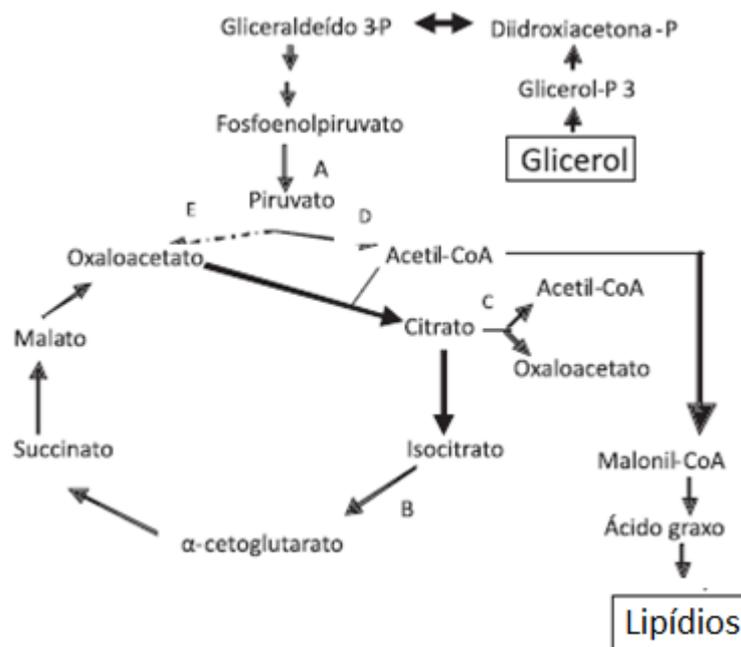
contém elementos nutricionais, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que podem ser utilizados por micro-organismos para o seu crescimento durante cultivos microbianos (THOMPSON; HE, 2006).

Tabela 5– Substratos renováveis e conteúdo de lipídios para leveduras oleaginosas.

Levedura	Substrato	Lipídios (% m/m)	Referência
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino	73,23	LIANG et al.(2012)
<i>Cryptococcus</i> sp.	Hidrolisado de sabugo de milho	60,2	CHANG et al.(2015)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glicerol bruto	41,3	CUI; BLACKBURN; LIANG (2012)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glicerol bruto	44,2	LIANG et al. (2010)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Lodo ativado pré- tratado	23	SEO; LEE; HAN (2013)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Sorgo sacarino sacarificado	47,3	MATSAKAS et al. (2014)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Hidrolisado de palha de trigo	31,2	YU et al. (2011)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Efluente de bioetanol	34,9	ZHOU et al. (2013)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Hidrolisado de amido de mandioca	63,2	WANG et al. (2012)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Glicerol bruto	41,76	GAO et al. (2016)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Melaço de beterraba	64,8	TASKIN et al. (2016)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Efluente de cervejaria	40,0	SCHNEIDER et al. (2013)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glicerol bruto	22,1	POLI et al. (2014)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Bagaço de cana hidrolisado	58,5	TSIGIE et al. (2011)

A Figura 3 apresenta o metabolismo intermediário das leveduras relacionado à síntese de lipídios a partir da degradação do glicerol. Quando o glicerol é utilizado como substrato hidrofílico, este é degradado até gliceraldeído 3-fosfato, um intermediário da via glicolítica. O piruvato resultante da glicólise então é convertido a acetil-CoA, que unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo, um dos precursores para a síntese de lipídios (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

Figura 3 - Via de degradação do glicerol por leveduras oleaginosas. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: A. piruvato quinase; B. isocitrato desidrogenase; C. citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos). D: piruvato desidrogenase; E: piruvato carboxilase.



Fonte: Adaptado de Fontes; Amaral; Coelho (2008)

Spier, Buffon e Burkert (2015) avaliaram o uso de glicerol bruto como substrato por doze cepas de leveduras diferentes em relação à capacidade de acúmulo de lipídios, sendo que *Lipomyces lipofer* NRRL Y-1155 se destacou das demais ao alcançar 57,64% de conteúdo lipídico. Gao et al.(2016) realizaram um estudo comparativo para produção de lipídios por *Rhodospiridium toruloides* através de cultivos sob as mesmas condições e apenas variando fontes de carbono (glicerol bruto, glicerol puro e glicose). Constataram que a produção de lipídios com glicerol bruto foi

maior em relação às demais fontes de carbono, tendo alcançado teores de lipídios de 41,76%, 36,32% e 34,25%, respectivamente, quando usado glicerol bruto, glicose e glicerol puro.

Canonico et al. (2016) investigaram a produção de lipídios usando glicerol bruto por nove linhagens de *Metschnikowia* sp. e seis linhagens de *Yarrowia lipolytica*, sendo selecionadas as cepas *Metschnikowia* sp. 271 e *Yarrowia lipolytica* 347, atingindo-se teores de lipídios equivalentes a 10,7% e 32,6%, respectivamente.

Gao et al. (2016) investigaram o efeito das quatro principais impurezas presentes no glicerol bruto (oleato de metila, oleato de sódio, cloreto de sódio e metanol) e constataram que, em relação ao glicerol puro, a presença das impurezas oleato de metila, oleato de sódio e cloreto de sódio presentes no glicerol bruto, quando analisadas separadamente, geraram um incremento na produção de lipídios de, respectivamente, 47%, 68% e 64%, enquanto o metanol diminuiu a produção em 17,7%, porém esse último, quando misturado a outras impurezas, teve o efeito inibidor atenuado.

Duarte et al. (2013) estudaram a produção de lipídios por leveduras silvestres pré-selecionadas, isoladas do bioma brasileiro, em meio contendo glicerol bruto e glicerol puro. A levedura *Candida* sp., isolada do Pantanal, destacou-se entre os diferentes isolados, apresentando teor de lipídios de 20,46% e 56,58% quando cultivada utilizando glicerol puro e glicerol bruto, respectivamente. Logo, é possível verificar a potencialidade do glicerol bruto devido às suas impurezas.

Estes dados obtidos pelos pesquisadores, em relação à comparação entre glicerol puro e glicerol bruto, são interessantes, uma vez que indicam, além da possibilidade de uso do glicerol bruto sem qualquer tratamento prévio, o que é vantajoso em termos de custo, a possibilidade de incrementar os teores de lipídios, uma vez que as impurezas presentes podem favorecer o seu acúmulo.

3.5. FATORES QUE INFLUENCIAM O ACÚMULO DE LIPÍDIOS EM LEVEDURAS

O acúmulo de lipídios pelas leveduras oleaginosas depende de alguns fatores, como: composição do meio de cultivo (como a relação carbono/nitrogênio e a concentração de sais inorgânicos), condições de cultivo (como temperatura e pH), e modos de operação, que podem ser principalmente em batelada ou batelada alimentada

(BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011; AGEITOS et al., 2011; CHANG et al., 2015).

Durante a fase de crescimento, o fluxo de carbono é distribuído para síntese de macromoléculas (carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas). O nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, requeridos para a proliferação celular. Este processo é, portanto, retardado pela limitação de nitrogênio. No entanto, em condições de limitação de nitrogênio, a taxa de crescimento diminui rapidamente, enquanto que a taxa de assimilação de carbono diminui mais gradualmente. Isto resulta na canalização preferencial do fluxo de carbono para a síntese lipídica, conduzindo a um acúmulo de triacilgliceróis dentro de corpos lipídicos nas células. Durante a transição entre a fase de crescimento (crescimento com a produção de biomassa) e a fase de acúmulo de lipídios (diminuição da taxa de crescimento devido à limitação de nutrientes e o desvio do excesso de carbono para a produção de lipídios), algumas vias são reprimidas (síntese de ácidos nucleicos e proteínas), enquanto outras são induzidas (síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis). Esta transição é induzida pelo estabelecimento da limitação de nitrogênio (BEOPOULOS et al., 2009).

O acúmulo de lipídios pelas leveduras oleaginosas ocorre somente quando a fonte de nitrogênio no meio é esgotada. Além disso, o tipo de fonte de nitrogênio (orgânico ou inorgânico) e a relação C/N são fatores importantes para a produção de lipídios. O meio de cultivo deve ser formulado com uma relação C/N de modo a garantir que o nitrogênio seja consumido enquanto outros nutrientes, incluindo carbono, permaneçam no meio de cultivo (DUARTE et al., 2013). Em geral a produção de lipídios por leveduras requer excesso de quantidade de carbono (açúcares ou outras fontes de carbono como glicerol e resíduos em geral) e limitada fonte de nitrogênio (BEOPOULOS et al., 2009).

Um aumento adequado da relação C/N (alta concentração de carbono em relação ao nitrogênio), pode levar ao acúmulo de ácido cítrico ao diminuir a atividade do ciclo de Krebs, e o ácido cítrico acumulado pode ser usado para sintetizar lipídios. No entanto, uma relação C/N excessivamente elevada pode limitar o crescimento da levedura e levar a uma liberação do ácido acético, ao invés de utilizá-lo para a síntese de lipídios, diminuindo o rendimento em lipídios (HUANG et al., 2016).

Angerbauer et al. (2010) estudaram a influência de diferentes relações C/N no acúmulo de lipídios pela levedura *Lipomyces starkeyi* em meio contendo lodo de

esgoto tratado, sendo que maior teor de lipídios (68%) foi atingido na relação C/N de 150. Já numa relação C/N de 60 o teor de lipídios foi de 40%.

Poli et al. (2014) estudaram o efeito de diferentes relações C/N (18,36, 184,276 e 368) no crescimento e acúmulo de lipídios pela levedura *Yarrowia lipolytica* QU21 em meio contendo glicerol como fonte de carbono, obtendo maior biomassa nas relações C/N de 276 (5,1 g.L⁻¹) e 184 (4,9 g.L⁻¹), que não diferiram entre si, e maior teor de lipídios (em torno de 30%) numa relação C/N de 184. Estes resultados estão de acordo com Chen et al. (2013), que observaram um comportamento semelhante com *Trichosporon cutaneum* em várias relações C/N. Canonico et al. (2016) fizeram o mesmo estudo como a mesma levedura porém usaram glicerol como fonte de carbono, obtendo uma biomassa máxima de 2,60 g.L⁻¹ com uma relação C/N de 118 e teor de lipídios maior (32,6%) em uma relação C/N de 63.

A temperatura e o pH também são parâmetros importantes que têm sido avaliados na produção de lipídios por leveduras oleaginosas. Karatay e Donmez (2010) estudaram a variação do pH entre 4 a 7 no acúmulo de lipídios pelas leveduras *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis* e *Rhodotorula mucilaginosa*, e obtiveram teor de lipídios de 59,9%, 46,8% e 69,5%, respectivamente, em pH ótimo de 5,0 a 30°C. Angerbauer et al. (2008) avaliaram pHs entre 5,0 e 7,5 no cultivo da levedura *Lipomyces starkeyi* usando lodo de esgoto, observando em pH 5,0 a 30°C o maior teor de lipídios (56%), com decréscimo acentuado do teor de lipídios em pH 7,0 (7%).

Fei et al. (2011) demonstraram o efeito do pH no acúmulo de lipídios pela levedura *Cryptococcus albidus*, variando o mesmo na faixa de 2,5 a 8,5. Constataram uma grande inibição no teor de lipídios (em torno 5%) em pH abaixo de 4,0, entretanto para faixa de pH 5,5 – 7,0 observaram bom acúmulo de lipídios, atingindo 26,7% em pH 6,0.

De acordo com a literatura micro-organismos oleaginosos podem ser divididos em dois grupos quanto à temperatura: baixa temperatura (25–30°C) e alta temperatura (35 – 40°C) (MORITA et al., 2000). Fei et al. (2011) estudaram o efeito da temperatura no acúmulo de lipídios por *Cryptococcus albidus*, testando 20, 25,30 e 35°C, sendo que a máxima produção de lipídios (0,27 g.L⁻¹) e o máximo teor de lipídios (25,9%) foram obtidos a 25°C, sendo que a 35°C não houve acúmulo de lipídios.

Minerais como magnésio, potássio e cálcio são geralmente considerados essenciais para o crescimento da levedura ou acúmulo de lipídios. Li et al. (2006)

reportam que o conteúdo lipídico de *Rhodospiridium toruloides* foi aumentado (76,1%) pela otimização das concentrações de Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} no meio.

3.6. CULTIVO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS EM BATELADA ALIMENTADA

Várias estratégias de cultivo têm sido empregadas, incluindo processos em batelada, batelada alimentada e contínua. Em geral a produção de lipídios por leveduras oleaginosas depende fundamentalmente de duas etapas: a fase de crescimento da levedura e a fase de acúmulo de lipídios. O processo em batelada alimentada é uma estratégia interessante porque torna possível controlar as fases de crescimento e de acúmulo de lipídios ao modificar a alimentação ao longo do cultivo (ZHAO et al., 2011; ANSCHAU et al., 2014).

Em teoria, quando se opera um processo em batelada simples, há um consumo total das fontes de nitrogênio disponíveis no meio de cultivo por parte dos micro-organismos na fase final de crescimento exponencial. Isso tende a levar a uma redução na taxa de produção de biomassa e nesse momento, na tentativa de evitar essa redução, o micro-organismo começa a acumular, por um determinado tempo, o carbono disponível do meio na forma de lipídios. Porém, conforme a necessidade metabólica, esse micro-organismo começa a consumir o próprio lipídio armazenado e a taxa de crescimento celular tende a voltar a cair (ZHAO et al., 2011; ANSCHAU et al., 2014).

Já no processo em batelada alimentada (através de adição de fontes de carbono e nitrogênio em tempos determinados), é possível adiar esse esgotamento das fontes de nitrogênio e em tese a taxa de crescimento aumenta e o micro-organismo consegue acumular maior quantidade de lipídios (ZHAO et al., 2011; CHANG et al., 2013; ANSCHAU et al., 2014). Diferentes estratégias de cultivo com leveduras oleaginosas associadas ao uso de diferentes substratos têm sido realizadas a fim de se obter elevada produtividade de lipídios e, com isso, tornar mais eficiente sua produção. A Tabela 6 apresenta o acúmulo de lipídios por algumas leveduras oleaginosas utilizando diferentes substratos e estratégias de cultivo (modo batelada alimentada e contínuo).

Tabela 6 – Acúmulo de lipídios por leveduras usando diferentes substratos e estratégias de cultivo.

Estratégia de cultivo	Substrato	Levedura	Lipídios (% m/m)	Referência
Batelada alimentada	Glicose	<i>Rhodotorula glutinis</i>	40	ZHAO et al. (2011)
Batelada alimentada	Glicose	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	67,5	ZHAO et al. (2011)
Batelada alimentada	Hidrolisado de sabugo de milho	<i>Cryptococcus</i> .sp	61,4	CHANG et al. (2013)
Batelada alimentada	Xilose e glicose	<i>Lipomyces starkeyi</i>	49,9	ANSCHAU et al. (2014)
Contínuo	Xilose e glicose	<i>Lipomyces starkeyi</i>	48,4	ANSCHAU et al. (2014)
Batelada alimentada	Glicose	<i>Cryptococcus curvatus</i>	82,7	ZHANG et al. (2011a)
Contínuo	Hidrolisado hemicelulósico	<i>Lipomyces starkeyi</i>	26,7	ANSCHAU et al. (2014)
Contínuo	Glicerol bruto	<i>Yarrowia lipolytica</i>	43	PAPANIKOLAOU ; AGGELIS (2002)
Contínuo	Permeado de soro	<i>Apiotrichum curvatum</i>	50	YKEMA et al. (1988)

Embora existam poucos relatos na literatura sobre produção de lipídios em batelada alimentada, essa estratégia tem demonstrado resultados eficientes. Chang et al. (2013) compararam a produção de lipídios microbianos por batelada e batelada alimentada pela levedura oleaginosa *Cryptococcus* sp. 5505 fazendo uso de glicose e hidrolisado de sabugo de milho como fontes de carbono. Os autores constataram que no processo em batelada ocorreu um efeito inibitório na produção de biomassa e de lipídios em concentrações de glicose acima de 6%, porém quando utilizaram a estratégia de cultivo em batelada alimentada foi possível diminuir o efeito inibitório do substrato na produção de lipídios. Esta estratégia envolveu o uso de uma concentração inicial de

glicose de 2% ou 4%, seguida de uma alimentação de glicose de 2% após 48 h de cultivo, sendo com esta última possível atingir biomassa, teor de lipídios e lipídios totais de 11,4 g.L⁻¹, 63,6% e 7,3 g.L⁻¹, respectivamente. Comportamento similar foi observado com o hidrolisado de sabugo de milho.

Anschau et al. (2014) estudaram diferentes estratégias de cultivo na produção de lipídios pela levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 (batelada, batelada alimentada, batelada alimentada repetida e contínuo) utilizando uma mistura de glicose e xilose como fonte de carbono. Constataram maior produção de biomassa (cerca de 85 g.L⁻¹) e lipídios totais (cerca de 40 g.L⁻¹) com os cultivos em batelada e batelada alimentada repetida, bem superiores ao cultivo em batelada (32,4 g.L⁻¹ e 10,3 g.L⁻¹, respectivamente).

Zhang et al. (2011a) investigaram a capacidade de síntese de lipídios pela levedura *Cryptococcus curvatus* O3 usando glicose como fonte de carbono em cultivos em batelada e batelada alimentada. No cultivo em batelada obtiveram concentração de biomassa de 51,8 g.L⁻¹ e teor de lipídios de 65,1%, porém no cultivo em batelada alimentada obtiveram 104,1 g.L⁻¹ e 82,7% para concentração de biomassa e teor de lipídios, respectivamente. Portanto, fica evidente que o emprego de estratégias de condução do cultivo da levedura oleaginosa possibilita a obtenção de resultados positivos quanto ao acúmulo de lipídios.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MICRO-ORGANISMOS E MANUTENÇÃO

A levedura *Meyerozyma guilliermondii*, previamente isolada e identificada por Spier (2014), foi mantida em tubos contendo meio YM (*Yeast Malt Agar*) sob refrigeração (4°C). O meio apresentava a seguinte composição (g.L⁻¹): 10,0 glicose; 5,0 peptona; 3,0 extrato de malte; 3,0 extrato de levedura; 20,0 ágar. Para a reativação, a partir das culturas estoques foram realizados repiques sucessivos para tubos contendo ágar YM, sendo incubados em estufa com temperatura controlada (30°C) por 48 h.

4.2. GLICEROL BRUTO

Utilizou-se glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel a partir do óleo degomado de soja por via metanólica, fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo – RS. De acordo com o laudo técnico da empresa, em anexo, o glicerol bruto continha (%): 6,51 cinzas; 6,18 cloreto de sódio; 9,78 umidade; 1,22 matéria glicerídica; orgânica não 82,49 glicerol e pH 4,91.

4.3. ANÁLISE ELEMENTAR CHN

Amostras do glicerol bruto e do extrato de levedura (fontes de carbono e nitrogênio) usados nos cultivos foram submetidas a uma análise elementar CHN. As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, utilizando um Analisador Elementar de CHN Modelo 2400 (Perkin Elmer, EUA).

4.4. PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado usando dois tubos de cultura microbiana reativada, sendo que cada tubo foi raspado com 10mL de água peptonada 0,1%, sendo após transferidos para frasco Erlenmeyer de 500mL contendo 180mL de caldo YM. A

suspensão foi incubada a 30°C em incubadora rotatória a 180rpm, monitorando o cultivo por contagem de células em câmara de Neubauer (SANTOS, 2009).

4.5. CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS NO MODO BATELADA

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume inicial de 200 mL, resultante da adição do meio de cultivo, suspensão de leveduras (inóculo) e água destilada estéril, e cuja composição foi definida de acordo com o delineamento experimental. Os frascos foram inoculados com o volume de inóculo necessário, calculado a partir de contagem realizada em câmara de Neubauer, para que se atingisse uma concentração inicial de 10^7 células.mL⁻¹, sendo mantidos em agitador orbital (Tecnal TE- 424) na temperatura determinada pelo delineamento experimental e com agitação de 180 rpm.

Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-definidos, sendo centrifugadas a 3000 rpm por 15 min para determinação de pH (sobrenadante), biomassa e lipídios (sedimento), este último apenas ao término do cultivo (120 h).

4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN

A fim de selecionar as variáveis que exercem os maiores efeitos sobre a produção de lipídios pela levedura *Meyerozyma guilliermondii*, foi proposto um delineamento experimental Plackett-Burmann, com 10 variáveis independentes, totalizando 20 ensaios, conforme Rodrigues e Iemma (2009).

As variáveis independentes estudadas, bem como seus níveis codificados e reais, estão apresentadas na Tabela 7, e a matriz do delineamento experimental Plackett – Burmann está apresentada na Tabela 10. Os pontos centrais correspondem às condições de cultivo propostas por Evans e Ratledge (1983): 50,0 g.L⁻¹ glicerol; 7,0 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 2,0 g.L⁻¹ Na₂HPO₄; 1,5 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,1 g.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 0,008 g.L⁻¹ FeCl₃.6H₂O; 0,0001 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 0,8 g.L⁻¹ extrato de levedura; temperatura de 30°C; pH inicial ajustado em 5,5.

As respostas analisadas foram teor de lipídios em base seca (%), lipídios totais produzidos (g.L⁻¹) e produtividade de lipídios (g.L⁻¹.h⁻¹), sendo os dados obtidos tratados com o *software* Statistica 5.0 (Stat Soft Inc., EUA).

Tabela 7- Variáveis e níveis do delineamento experimental Plackett – Burman (valores reais e codificados).

Variável	Variável codificada	Nível		
		-1	0	+1
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	X ₁	5,0	7,0	9,0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	X ₂	0	1,5	3,0
Na ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	X ₃	1,0	2,0	3,0
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	X ₄	0,4	0,8	1,2
CaCl ₂ .2H ₂ O (g.L ⁻¹)	X ₅	0	0,1	0,2
Glicerol (g.L ⁻¹)	X ₆	30	50	70
pH inicial	X ₇	4,5	5,5	6,5
Temperatura (°C)	X ₈	25	30	35
ZnSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	X ₉	0	0,0001	0,0002
FeCl ₃ .6H ₂ O (g.L ⁻¹)	X ₁₀	0	0,008	0,016

4.7. DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

Com as variáveis selecionadas no delineamento Plackett – Burmann, um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi proposto, avaliando 3 variáveis independentes (concentrações de MgSO₄.7H₂O, extrato de levedura e ZnSO₄.H₂O), cujos níveis são apresentados na Tabela 8, totalizando os 17 ensaios indicados na Tabela 19. As respostas avaliadas foram teor de lipídios em base seca (%), lipídios totais produzidos (g.L⁻¹) e produtividade de lipídios (g.L⁻¹.h⁻¹), sendo os dados obtidos tratados com o *software* Statistica 5.0 (Stat Soft Inc, EUA).

Tabela 8 - Variáveis e níveis do DCCR (valores reais e codificados).

Variável	Variável codificada	Nível				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	X ₁	3,0	3,4	4,0	4,6	5,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	X ₂	0,002	0,0056	0,011	0,016	0,02
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	X ₃	1,2	1,96	3,1	3,46	5,0

4.8. CULTIVOS EM BATELADA ALIMENTADA

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL em agitador orbital com agitação de 180 rpm. As condições de cultivo de *Meyerozyma guilliermondii* foram aquelas estabelecidas nos cultivos em batelada. As estratégias de alimentação utilizadas basearam-se no procedimento descrito por Chang et al. (2013). Pulsos correspondentes a 10% do volume inicial, contendo somente glicerol bruto ou o meio de cultura conforme composição estabelecida no cultivo em batelada, foram alimentados após 48h ou 96h do início dos cultivos. As concentrações dos componentes nos pulsos foram estabelecidas de forma a fornecer a mesma quantidade de cada componente inicialmente adicionado ao meio.

Amostras foram coletadas em tempos pré-definidos, centrifugadas a 3000 rpm por 15 min para determinação da biomassa e lipídios, este último apenas ao término do cultivo. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo os dados obtidos tratados por análise de variância e teste de Tukey a 95% de confiança, a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os modos de cultivo estudados.

4.9. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.9.1. Determinação da biomassa

A biomassa foi determinada conforme metodologia descrita por Choi e Park (2003), com leitura de absorvância a 600 nm em espectrofotômetro (BiospectroSP 22, China) e posterior conversão à concentração mássica através de uma curva-padrão obtida para o micro-organismo. A Equação 1 apresenta a curva padrão para a levedura *Meyerozyma guilliermondii*, sendo esta apresentada no Apêndice.

$$Y = 0,345 * X - 0,0133 \quad R^2 = 0,9912 \quad (1)$$

Sendo:

Y: Concentração de biomassa (g.L⁻¹);

X: Absorvância em comprimento de onda de 600 nm.

4.9.2. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada no sobrenadante, através da leitura em medidor de pH, segundo AOAC (2000).

4.9.3. Determinação de lipídios

A concentração de lipídios foi determinada através do método Bligh; Dyer (1959), adaptado por Manirakiza, Covaci; Schepens (2001), através da extração dos lipídios polares e não polares da biomassa utilizando uma mistura de metanol e clorofórmio. A biomassa seca foi primeiramente tratada com solução de HCl 2 mol.L⁻¹ para rompimento da parede celular, posteriormente centrifugada a 1785 x g e o sobrenadante descartado. A biomassa foi misturada com metanol, clorofórmio e água para a extração dos lipídios, seguidos de centrifugação a 1785 x g por 10 min. Este procedimento foi repetido para a extração dos lipídios remanescentes na amostra. Com a mistura formaram-se três fases, onde os lipídios encontravam-se na fase inferior, dissolvidos em clorofórmio, que foi evaporado, e os lipídios quantificados por gravimetria, em massa seca.

Através das Equações 2,3 e 4, foi possível determinar o teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios.

$$\text{Teor de lipídios (\%)} = \frac{\text{Massa}_{\text{Balão+lipídios}} (g) - \text{Massa}_{\text{Balão}} (g)}{\text{Massa}_{\text{Biomassa}} (g)} * 100 \quad (2)$$

$$\text{Lipídios totais (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Teor de lipídios (\%)} * \text{Biomassa final (g.L}^{-1}\text{)}}{100} \quad (3)$$

$$\text{Produtividade de lipídios (g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Lipídios totais (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{Tempo (h)}} \quad (4)$$

4.9.4. Perfil de ácidos graxos

Para separar e quantificar os ácidos graxos, a fração lipídica foi esterificada pelo método adaptado de Metcalfe, SchmitzePelka (1966). As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo a gás (Shimadzu 2010 Plus, Japão), equipado com

injetor *split/splitless*, coluna capilar RTX[®]-1 (30 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25 µm) e detector por ionização de chama. O gás de arraste foi hélio em uma vazão de 1,25 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 260°C, sendo o volume injetado de 1 µL.

As condições cromatográficas de separação foram temperatura inicial da coluna 50°C, elevando-se para 200°C, em uma taxa de 6°C.min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 4 min. Na segunda rampa de aquecimento, a taxa de aumento foi de 2°C.min⁻¹ até 240°C, permanecendo por 10 min. A comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos foi usada para identificação do perfil de ácidos graxos das amostras, sendo quantificados pela normatização das áreas.

4.9.5. Predição das propriedades do biodiesel

A predição das propriedades do biodiesel que pode ser obtido a partir dos óleos microbianos foi realizada a partir das propriedades individuais dos metil ésteres de ácidos graxos que compõem os lipídios microbianos produzidos nesse trabalho, tendo como base os procedimentos propostos por Raimondi et al. (2014) e Duarte e Maugeri (2014). Para determinar as propriedades individuais de cada metil éster de ácido graxo que compõe o biodiesel, foram utilizadas as Equações 5, 6, 7 e 8, estabelecidas por Ramírez-Verduzco, Rodríguez-Rodríguez e Jaramillo-Jacob (2012).

$$CN_i = -7,8 + 0,302 \cdot M_i - 20 \cdot D_i \quad (5)$$

$$\rho_i = 0,8463 + \frac{4,9}{M_i} + 0,0118 \cdot D_i \quad (6)$$

$$\ln(v_i) = -12,503 + 2,496 \cdot \ln(M_i) - 0,178 \cdot D_i \quad (7)$$

$$\Delta H_{ci} = 46,19 - \frac{1794}{M_i} - 0,21 \cdot D_i \quad (8)$$

Sendo:

M_i : Massa molar do metil éster de ácido graxo (g.mol⁻¹);

D_i : Número de ligações duplas presentes no ácido graxo;

CN_i : Número de cetano do ácido graxo;

ρ_i : Densidade do ácido graxo (kg.m⁻³);

v_i : Viscosidade cinemática do ácido graxo (mm².s⁻¹);

ΔH_{ci} : Calor de combustão do ácido graxo (MJ.kg⁻¹);

As propriedades do biodiesel avaliadas foram: densidade, viscosidade cinemática, índice de saponificação, índice de iodo, número de cetano e calor de combustão. A predição dessas propriedades se deu através das Equações empíricas 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15, de acordo com os trabalhos de Raimondi et al. (2014) e Khot et al. (2012).

$$\rho_{mix} = \sum_i(c_i * \rho_i) \quad (9)$$

$$v_{mix} = \sum_i(c_i * v_i) \quad (10)$$

$$SN_{mix} = \sum_i(c_{i\%} * 560) / M_i \quad (11)$$

$$IS_{mix} = \sum_i(c_{i\%} * D_i * 254) / M_i \quad (12)$$

$$CN_{mix} = [1,608 * \sum_i(c_i * CN_i)] - 6,747 \quad (13)$$

$$\Delta H_{mix} = 49,43 - (0,041 * SN_{mix} + 0,015 * IV_{mix}) \quad (14)$$

Sendo:

mix: Mistura de ésteres de ácido graxo que compõe o lipídio;

ρ_{mix} : Densidade do biodiesel (kg.m^{-3});

c_i : Composição relativa em massa (fração mássica) dos ácidos graxos individuais que compõem o lipídio;

$c_{i\%}$: Composição relativa em massa (%) dos ácidos graxos individuais que compõem o lipídio;

v_{mix} : Viscosidade cinemática do biodiesel ($\text{mm}^2.\text{s}^{-1}$);

IS_{mix} : Índice de saponificação;

Π_{mix} : Índice de iodo;

CN_{mix} : Número de cetano do biodiesel;

ΔH_{mix} : Calor de combustão do biodiesel (kJ.g^{-1});

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS

A Tabela 9 apresenta a caracterização do glicerol bruto e do extrato de levedura quanto à composição de carbono, hidrogênio e nitrogênio.

Tabela 9 – Caracterização do glicerol e extrato de levedura quanto à composição de carbono, hidrogênio e nitrogênio

Elemento	Glicerol bruto	Extrato de levedura
Carbono (% m/m)	29,9 ± 0,7	38,9 ± 0,2
Hidrogênio (% m/m)	7,7 ± 0,2	6,7 ± 0,1
Nitrogênio (% m/m)	0,14 ± 0,02	10,6 ± 0,1

Spier (2014), ao caracterizar os substratos para o cultivo de leveduras oleaginosas, obteve como resultado 43,69% de carbono e 0,13% de nitrogênio para glicerol bruto e 39,27% de carbono 10,80% de nitrogênio para extrato de levedura, enquanto que Otero (2014), na caracterização de substratos utilizados para o cultivo de leveduras carotenogênicas, encontrou valores de 49,3% de carbono e 1,05% de nitrogênio para glicerol bruto e 38,40% de carbono e 10,67% de nitrogênio para extrato de levedura.

5.2. DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN

A influência das variáveis estudadas na produção de lipídios foi verificada através do delineamento experimental Plackett–Burman (Tabela 10), com uma variação de resultados de 1,52% (Ensaio 8) a 16,85% (média dos ensaios 17, 18, 19 e 20) para teor de lipídios; de 0,002 g.L⁻¹ (Ensaio 8) a 0,96 g.L⁻¹ (Ensaio 9) para lipídios totais produzidos; e inferior a 0,0001 g.L⁻¹.h⁻¹ (Ensaio 8 e Ensaio 12) a 0,0080 g.L⁻¹.h⁻¹ (Ensaio 9) para produtividade de lipídios. Portanto, a ampla variação observada é um indicativo de que as condições de cultivo exercem influência no acúmulo de lipídios.

Tabela 10 – Matriz do delineamento experimental Plackett – Burman e respostas obtidas

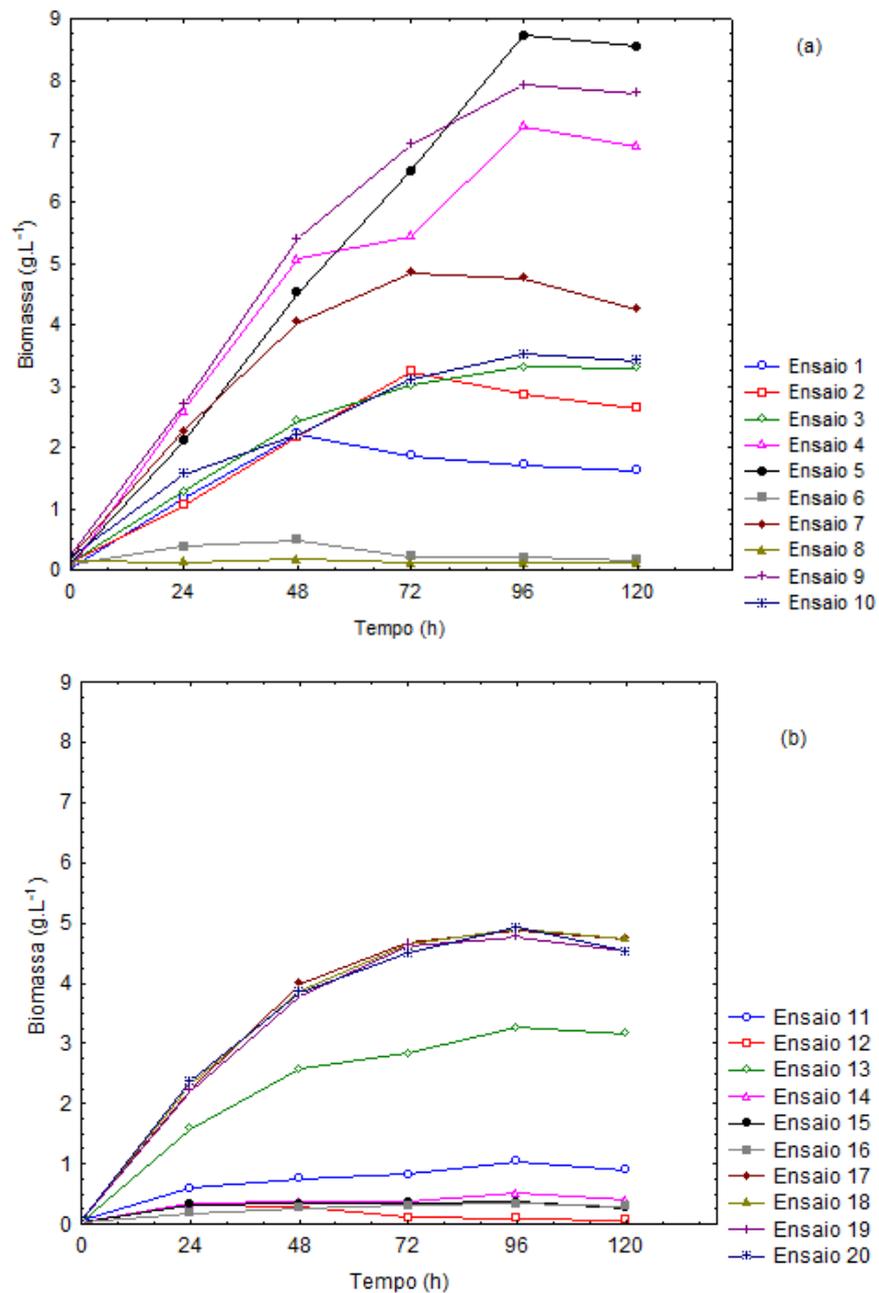
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	+1(9)	-1(0)	-1(1)	-1(0,4)	+1(0,2)	-1(30)	-1(4,5)	+1(35)	+1(0,0002)	-1(0)	9,26	0,15	0,0012
2	+1(9)	+1(3)	-1(1)	-1(0,4)	-1(0)	+1(70)	-1(4,5)	-1(25)	+1(0,0002)	+1(0,016)	13,49	0,36	0,0030
3	+1(9)	+1(3)	+1(3)	-1(0,4)	-1(0)	-1(30)	+1(6,5)	-1(25)	-1(0)	+1(0,016)	9,33	0,31	0,0026
4	+1(9)	+1(3)	+1(3)	+1(1,2)	-1(0)	-1(30)	-1(4,5)	+1(35)	-1(0)	-1(0)	8,31	0,57	0,0048
5	-1(5)	+1(3)	+1(3)	+1(1,2)	+1(0,2)	-1(30)	-1(4,5)	-1(25)	+1(0,0002)	-1(0)	9,72	0,83	0,0069
6	+1(9)	-1(0)	+1(3)	+1(1,2)	+1(0,2)	+1(70)	-1(4,5)	-1(25)	-1(0)	+1(0,016)	10,14	0,02	0,0001
7	-1(5)	+1(3)	-1(1)	+1(1,2)	+1(0,2)	+1(70)	+1(6,5)	-1(25)	-1(0)	-1(0)	9,00	0,38	0,0032
8	+1(9)	-1(0)	+1(3)	-1(0,4)	+1(0,2)	+1(70)	+1(6,5)	+1(35)	-1(0)	-1(0)	1,52	<0,01	<0,0001
9	+1(9)	+1(3)	-1(1)	+1(1,2)	-1(0)	+1(70)	+1(6,5)	+1(35)	+1(0,0002)	-1(0)	12,28	0,96	0,0080
10	-1(5)	+1(3)	+1(3)	-1(0,4)	+1(0,2)	-1(30)	+1(6,5)	+1(35)	+1(0,0002)	+1(0,016)	12,17	0,42	0,0035
11	-1(5)	-1(0)	+1(3)	+1(1,2)	-1(0)	+1(70)	-1(4,5)	+1(35)	+1(0,0002)	+1(0,016)	6,92	0,06	0,0005
12	+1(9)	-1(0)	-1(1)	+1(1,2)	+1(0,2)	-1(30)	+1(6,5)	-1(25)	+1(0,0002)	+1(0,016)	9,82	<0,01	<0,0001
13	-1(5)	+1(3)	-1(1)	-1(0,4)	+1(0,2)	+1(70)	-1(4,5)	+1(35)	-1(0)	+1(0,016)	13,07	0,41	0,0034
14	-1(5)	-1(0)	+1(3)	-1(0,4)	-1(0)	+1(70)	+1(6,5)	-1(25)	+1(0,0002)	-1(0)	11,58	0,04	0,0004
15	-1(5)	-1(0)	-1(1)	+1(1,2)	-1(0)	-1(30)	+1(6,5)	+1(35)	-1(0)	+1(0,016)	5,09	0,01	0,0001
16	-1(5)	-1(0)	-1(1)	-1(0,4)	-1(0)	-1(30)	-1(4,5)	-1(25)	-1(0)	-1(0)	7,88	0,02	0,0002
17	0(7)	0(1,5)	0(2)	0(0,8)	0(0,1)	0(50)	0(5,5)	0(30)	0(0,0001)	0(0,008)	16,92	0,80	0,0069
18	0(7)	0(1,5)	0(2)	0(0,8)	0(0,1)	0(50)	0(5,5)	0(30)	0(0,0001)	0(0,008)	17,08	0,81	0,0069
19	0(7)	0(1,5)	0(2)	0(0,8)	0(0,1)	0(50)	0(5,5)	0(30)	0(0,0001)	0(0,008)	17,02	0,77	0,0064
20	0(7)	0(1,5)	0(2)	0(0,8)	0(0,1)	0(50)	0(5,5)	0(30)	0(0,0001)	0(0,008)	16,39	0,74	0,0062

Variáveis: X₁: KH₂PO₄; X₂:MgSO₄.7H₂O; X₃: Na₂HPO₄; X₄: extrato de levedura; X₅: CaCl₂.2H₂O; X₆: glicerol; X₇: pH_{inicial}; X₈: temperatura; X₉: ZnSO₄.7H₂O; X₁₀: FeCl₃.6H₂O. **Respostas:** Y₁: Teor de lipídios em base seca (%); Y₂: Lipídios totais produzidos (g.L⁻¹); Y₃: Produtividade de lipídios (g.L⁻¹.h⁻¹).

5.2.1 Acompanhamento da biomassa ao longo dos cultivos

O acompanhamento da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* ao longo dos cultivos está apresentado nas Figuras 4 (a) para os ensaios 1 ao 10, e 4 (b) para os Ensaios 11 ao 20. Observa-se que as condições dos Ensaios 4,5 e 9 correspondem ao melhor crescimento celular de *Meyerozyma guilliermondii*, atingindo-se a biomassa máxima em 96 h de cultivo, sendo estas, respectivamente, 7,24, 8,73 e 7,92 g.L⁻¹.

Figura 4- Acompanhamento da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* ao longo dos cultivos. (a) Ensaios 1 ao 10; (b) Ensaios 11 ao 20.



Para a maioria dos ensaios a biomassa máxima foi atingida em 96 h, porém, para o Ensaio 12, foi atingida em 24 h, para os Ensaios 1, 6 e 8 em 48 h, e para os Ensaios 2 e 7 em 72 h de cultivo. Biomassa máxima entre 4,75 e 5,0 g.L⁻¹ foi atingida nas condições do ponto central do delineamento (Ensaios 17, 18, 19 e 20).

As condições que proporcionaram o menor crescimento celular de *Meyerozyma guilliermondii* foram as utilizadas nos Ensaios 6, 8, 12, 14, 15 e 16, destacando-se o Ensaio 8, com uma biomassa de 0,17 g.L⁻¹.

5.2.2 Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos

A evolução do pH está apresentada nas Figuras 5 (a), para os Ensaios 1 ao 10, e 5(b), para os Ensaios 11 ao 20. Praticamente em todos os ensaios o pH teve tendência de ficar constante nas últimas 24 h de cultivo, com exceção do Ensaio 6, em que observou-se a tendência de aumento de pH ao longo de todo cultivo, e do Ensaio 4, que apresentou variações bruscas de pH no período de 48 – 72h (aumento brusco), ficando constante entre 72- 96h e com queda acentuada até 120h.

Figura 5 - Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos. (a) Ensaios 1 ao 10; (b) Ensaios 11 ao 20.

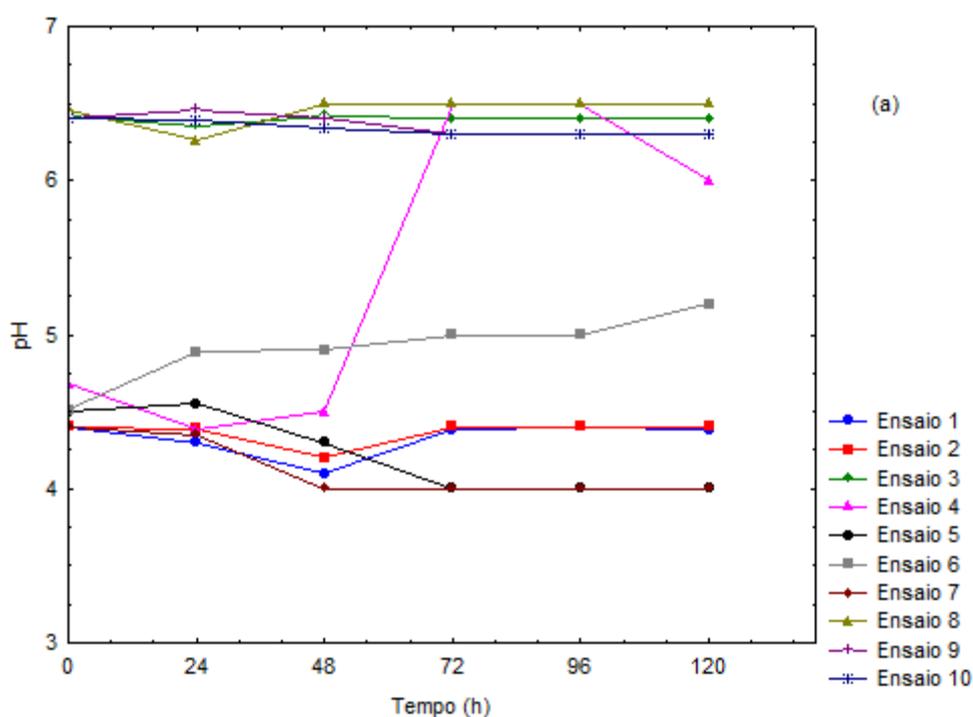
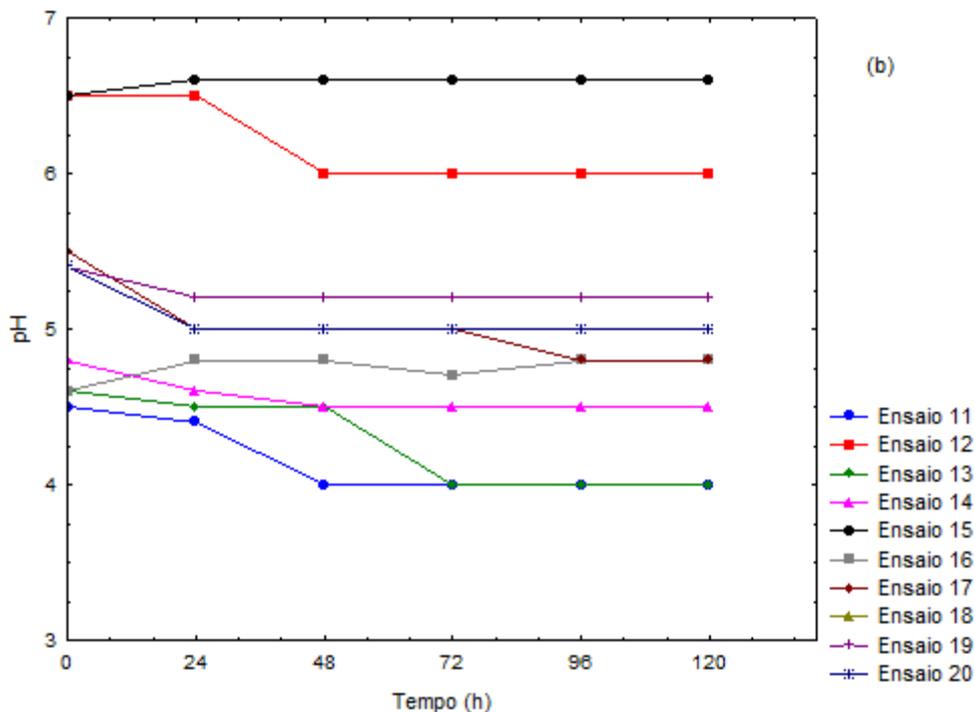


Figura 5 - Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos. (a) Ensaios 1 ao 10; (b) Ensaios 11 ao 20 (continuação).



No Ensaio 3, o pH manteve-se constante ao longo de todo o cultivo, enquanto que no Ensaio 15 observou-se uma tendência de aumento de pH nas primeiras 24h de cultivo e depois o mesmo manteve-se constante até 120 h. Por outro lado, nos Ensaios 1, 2, 5, 9, 10, 11, 12 e 14 e nos Ensaios 17, 18, 19 e 20, observou-se uma diminuição de pH nas primeiras 48 h de cultivo e esse permaneceu constante até término do cultivo.

A predominante tendência de redução de pH observada nos ensaios pode estar relacionada à produção de ácidos orgânicos como o ácido cítrico, conforme observado por Santos (2009) no cultivo de *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol bruto como fonte de carbono.

5.2.3 Avaliação dos efeitos das variáveis na produção de lipídios

As Tabelas 11, 12 e 13 apresentam as análises dos efeitos das variáveis sobre os parâmetros relacionados à produção de lipídios pela levedura *Meyerozyma guilliermondii*.

A Tabela 11 apresenta os efeitos estimados, obtidos no delineamento experimental Plackett-Burman, a um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$) para a resposta teor

de lipídios, sendo que nenhuma variável apresentou efeito significativo sobre o teor de lipídios.

Tabela 11 – Efeitos estimados para o teor de lipídios (%).

Fator	Efeito (%)	EP	t(9)	p-valor
Média	10,85	1,11	9,74	<0,0001
KH ₂ PO ₄	-0,15	2,48	-0,06	0,9506
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,14	2,48	1,26	0,2386
Na ₂ HPO ₄	-1,27	2,48	-0,51	0,6208
Extrato de levedura	-0,87	2,48	-0,35	0,7326
CaCl ₂ .2H ₂ O	-0,02	2,48	-0,01	0,9922
Glicerol	0,80	2,48	0,32	0,7540
pH	-0,99	2,48	-0,40	0,6978
Temperatura	-1,54	2,48	-0,62	0,5505
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,61	2,48	1,04	0,3212
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,31	2,48	0,52	0,6113

A Tabela 12 apresenta os efeitos estimados, obtidos no delineamento experimental Plackett-Burman, a um nível de confiança de 90% ($p \leq 0,1$), para a resposta lipídios totais.

Tabela 12 – Efeitos estimados para os lipídios totais (g.L⁻¹).

Fator	Efeito (g.L ⁻¹)	EP	t(9)	p-valor
Média	0,38	0,07	5,41	0,0004
KH ₂ PO ₄	0,02	0,16	0,14	0,8899
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,48	0,16	3,0	0,0129
Na ₂ HPO ₄	-0,05	0,16	-0,03	0,9718
Extrato de levedura	0,14	0,16	0,88	0,3966
CaCl ₂ .2H ₂ O	-0,01	0,16	-0,09	0,9261
Glicerol	-0,01	0,16	-0,06	0,9463
pH	-0,03	0,16	-0,23	0,8209
Temperatura	0,07	0,16	0,48	0,6377
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,13	0,16	0,85	0,4129
FeCl ₃ .6H ₂ O	-0,17	0,16	-1,08	0,3075

Conforme observado na Tabela 12, a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi a única variável que apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,1$) a 90% de confiança sobre a resposta lipídios totais, sendo que o incremento desta variável de 0 g.L^{-1} (sem adição) para 3 g.L^{-1} resultou num aumento significativo de $0,48 \text{ g.L}^{-1}$ nos lipídios totais.

A Tabela 13 apresenta os efeitos estimados obtidos no delineamento Plackett-Burman, a um nível de confiança 90% ($p < 0,1$), para a resposta produtividade de lipídios.

Tabela 13– Efeitos estimados para a produtividade de lipídios ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Fator	Efeito ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	EP	t(9)	p-valor
Média	0,0032	<0,001	5,41	0,0004
KH_2PO_4	0,0002	0,001	0,14	0,8899
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0041	0,001	3,08	0,0129
Na_2HPO_4	<-0,0001	0,001	-0,03	0,9718
Extrato de levedura	0,0012	0,001	0,88	0,3966
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-0,0001	0,001	-0,09	0,9261
Glicerol	<-0,0001	0,001	-0,06	0,9463
pH	-0,0003	0,001	-0,23	0,8209
Temperatura	0,0006	0,001	0,48	0,6377
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0011	0,001	0,85	0,4129
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-0,0014	0,001	-1,08	0,3075

De acordo com a Tabela 13, o mesmo comportamento foi observado, onde $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ apresentou efeito significativo ($p \leq 0,1$) a 90% de confiança sobre a resposta produtividade de lipídios, sendo que a sua passagem do nível -1 (sem adição) para o nível +1 (3 g.L^{-1}) incrementou a resposta produtividade em $0,0041 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Tendo em vista que o resultado da análise de efeitos no delineamento Plackett-Burman demonstrou que apenas uma variável apresentou efeito significativo ($p < 0,1$), e ao mesmo tempo em que os pontos centrais desse delineamento apresentaram valores superiores às condições dos outros ensaios, foi proposta uma análise de curvatura.

De acordo com Rodrigues e Iema (2009), em situações nas quais se utiliza o delineamento experimental Plackett – Burman para uma prévia seleção das variáveis, pode ocorrer que os pontos centrais apresentem valores tanto inferiores quanto superiores aos das outras condições dos ensaios. Quando isso ocorre, o erro padrão fica muito alto, pois na

verdade os resultados não se ajustam a um modelo de 1ª ordem, indicando possível existência de uma curvatura.

Assim, quando isto acontece, é importante na análise dos efeitos principais a checagem da curvatura. Se a curvatura for estatisticamente significativa, o erro padrão diminui, conseqüentemente o t_{cal} aumenta e o p -valor diminui e as variáveis estatisticamente significativas deixam de ficar “mascaradas” pelo erro padrão que estava alto por conta dos pontos centrais (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

As Tabelas 14, 15 e 16 apresentam os efeitos estimados, obtidos após checagem de curvatura, dos dados obtidos através do delineamento experimental Plackett-Burman, a um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$), para as respostas teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios.

De acordo com os dados da Tabela 14, observa-se que duas variáveis passam a ter efeito significativo sobre o teor de lipídios, sendo que o aumento das concentrações de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ do nível -1 (0 g.L^{-1}) para o nível +1 ($3 \text{ e } 0,0002 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente) gerou um incremento de 3,14% e 2,61%, respectivamente, no teor de lipídios.

Tabela 14 – Efeitos estimados com checagem de curvatura para o teor de lipídios (%).

Fator	Efeito (%)	EP	t(8)	p-valor
Média	9,35	0,58	16,14	<0,0001
Curvatura	15,00	2,59	5,79	0,0004
KH_2PO_4	-0,16	1,16	-0,13	0,8947
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,14	1,16	2,71	0,0266
Na_2HPO_4	-1,27	1,16	-1,10	0,3031
Extrato de levedura	-0,88	1,16	-0,76	0,4707
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	-0,02	1,16	-0,02	0,9833
Glicerol	0,80	1,16	0,69	0,5073
pH	-0,10	1,16	-0,86	0,4141
Temperatura	-1,54	1,16	-1,33	0,2194
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,61	1,16	2,25	0,0541
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	1,31	1,16	1,13	0,2908

De acordo com os dados da Tabela 15, além do sulfato de magnésio, mais três variáveis passaram a influenciar significativamente ($p < 0,1$) na resposta lipídios totais, sendo

que o aumento das concentrações de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, extrato de levedura e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ do nível -1 (0, 0,4 e 0 g.L^{-1} , respectivamente) para o nível +1 (3, 1,2 e 0,002 g.L^{-1} , respectivamente) gerou um incremento nos lipídios totais de 0,48 g.L^{-1} , 0,14 g.L^{-1} e 0,13 g.L^{-1} , respectivamente. Por outro lado, o aumento da concentração de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ do nível -1 (0 g.L^{-1}) para o nível +1 (0,016 g.L^{-1}) reduziu em 0,17 g.L^{-1} os lipídios totais.

Tabela 15 – Efeitos estimados com checagem de curvatura para os lipídios totais (g.L^{-1}).

Fator	Efeito (g.L^{-1})	EP	t(8)	p-valor
Média	0,28	0,03	9,44	0,0001
Curvatura	0,99	0,13	7,36	0,0001
KH_2PO_4	0,02	0,06	0,37	0,7179
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,48	0,06	8,12	0,0001
Na_2HPO_4	-0,05	0,06	-0,09	0,9263
Extrato de levedura	0,14	0,06	2,34	0,0474
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-0,01	0,06	-0,25	0,8084
Glicerol	-0,01	0,06	-0,18	0,8602
pH	-0,03	0,06	-0,61	0,5572
Temperatura	0,07	0,06	1,28	0,2361
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,13	0,06	2,26	0,0540
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-0,17	0,06	-2,84	0,0212

Comportamento semelhante aos lipídios totais foi verificado para a produtividade de lipídios, conforme observado na Tabela 16. As variáveis $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, extrato de levedura e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) sobre a produtividade de lipídios, incrementando esta resposta em 0,0041 $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 0,0012 $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e 0,0011 $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente, ao passar do nível -1 para o nível +1. Por outro lado a variável $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ apresentou um efeito significativo negativo ($p < 0,1$), reduzindo a produtividade de lipídios em 0,0014 $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ao passar do nível -1 para o nível +1. O incremento das demais variáveis nas faixas estudadas não influenciou significativamente ($p > 0,1$) a produção de lipídios com esta levedura, através das respostas avaliadas.

Tabela 16 – Efeitos estimados com checagem de curvatura para produtividade de lipídios (g.L⁻¹.h⁻¹).

Fator	Efeito (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	EP	t(8)	p-valor
Média	0,0020	<0,001	9,44	<0,0001
Curvatura	0,0083	<0,001	7,36	<0,0001
KH ₂ PO ₄	0,0002	<0,001	0,37	0,7180
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0041	<0,001	8,12	<0,0001
Na ₂ HPO ₄	<-0,0001	<0,001	-0,09	0,9263
Extrato de levedura	0,0012	<0,001	2,34	0,0474
CaCl ₂ .2H ₂ O	-0,0001	<0,001	-0,25	0,8086
Glicerol	-0,0001	<0,001	-0,18	0,8602
pH	-0,0003	<0,001	-0,61	0,5572
Temperatura	0,0006	<0,001	1,28	0,2361
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0011	<0,001	2,26	0,054
FeCl ₃ .6H ₂ O	-0,0014	<0,001	-2,84	0,0217

Assim, a partir da influência dos diferentes constituintes do meio de produção e corroborando com a análise de efeitos foi possível verificar que o meio proposto deve conter MgSO₄.7H₂O, extrato de levedura e ZnSO₄.7H₂O em concentrações correspondentes aos níveis superiores (nível +1) por apresentarem efeitos positivos significativos para produção de lipídios. Em contrapartida, o FeCl₃.6H₂O, por apresentar efeito negativo, deve ser eliminado do meio (nível -1 ou 0 g.L⁻¹). As demais variáveis, por não apresentarem influência significativa, devem ser mantidas no nível inferior (nível -1) e o CaCl₂.2H₂O deve ser retirado da composição do meio de produção. Desta forma, o meio de cultivo estabelecido pelo delineamento Plackett-Burman foi (g.L⁻¹): 5 KH₂PO₄; 3 MgSO₄.7H₂O; 1 Na₂HPO₄; 30 glicerol; 0,0002 ZnSO₄.7H₂O; e pH inicial ajustado em 5,5.

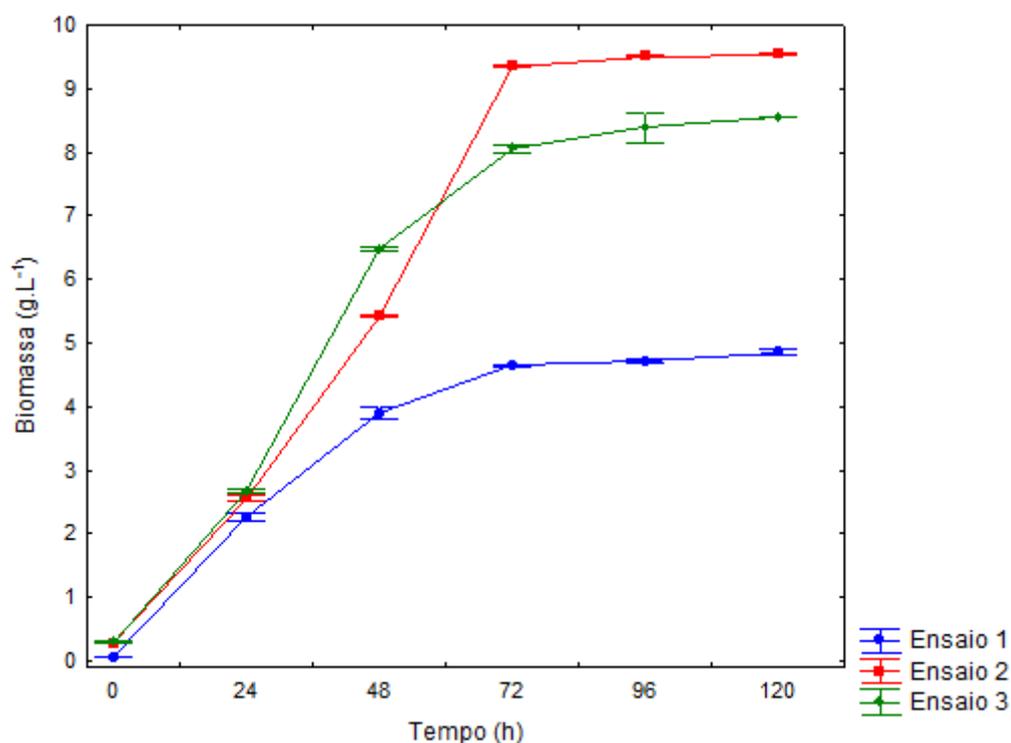
Entretanto, como o aumento da temperatura não foi significativo, mas os máximos teores de lipídios foram obtidos a 30°C (pontos centrais), e com a finalidade de confirmar essa condição de meio de produção não apresentada no delineamento experimental estudado, foram propostos ensaios em quadruplicata conforme a Tabela 17 considerando a composição de meio estabelecida pelo Plackett-Burman nas temperaturas de 25°C (Ensaio 2) e 30°C (Ensaio 3), bem como a melhor condição apresentada na matriz do Plackett-Burman (Ensaio 1), correspondente aos pontos centrais da Tabela 10 (Ensaio 17 ao 20).

Tabela 17 - Composição dos meios de produção para estudo da produção de lipídios por *Meyerozyma guilliermondii*

Ensaio	Meio de produção	pH	T (°C)
1	7 g.L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ ; 1,5 g.L ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O; 2 g.L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ ; 0,8 g.L ⁻¹ extrato de levedura; 50 g.L ⁻¹ glicerol; 0,0001 g.L ⁻¹ ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,1 g.L ⁻¹ CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,008 g.L ⁻¹ FeCl ₃ .6H ₂ O	5,5	30
2	5 g.L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ ; 3 g.L ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O; 1 g.L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ ; 1,2 g.L ⁻¹ extrato de levedura; 30 g.L ⁻¹ glicerol; 0,0002 g.L ⁻¹ ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,5	25
3	5 g.L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ ; 3 g.L ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O; 1 g.L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ ; 1,2 g.L ⁻¹ extrato de levedura; 30 g.L ⁻¹ glicerol; 0,0002 g.L ⁻¹ ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,5	30

A Figura 6 apresenta o acompanhamento da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* ao longo dos cultivos para os ensaios a 25°C e 30°C (Ensaio 2 e 3, respectivamente), bem como para as condições correspondentes ao ponto central do Plackett-Burman (Ensaio 1). Para ambos os Ensaio 2 e 3 pode-se constatar que biomassa máxima foi atingida em 96 h, com valores de $9,33 \pm 0,01$ g.L⁻¹ e $8,56 \pm 0,24$ g.L⁻¹ para os ensaios a 25 e 30°C, respectivamente, valores bem superiores aos obtidos para o Ensaio 1 ($4,8 \pm 0,04$ g.L⁻¹).

Figura 6 - Acompanhamento da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* ao longo dos cultivos para os Ensaio 1, 2 e 3.



A Tabela 18 apresenta os parâmetros referentes à produção lipídica para as três condições testadas.

Tabela 18 – Comparação* entre os cultivos de *Meyerozymaguilliermondii* em diferentes condições de cultivo.

Ensaio	Teor de lipídios (%)	Lipídios totais (g.L ⁻¹)	Produtividade de lipídios (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	RelaçãoC/N
1	16,80 ± 0,30 ^a	0,78±0,03 ^c	0,0061 ± 0,0002 ^c	4,8 ± 0,04	98,6
2	10,45 ± 0,30 ^c	0,98±0,03 ^b	0,0082 ± 0,0003 ^b	9,33 ± 0,01	55,8
3	15,04 ± 0,20 ^b	1,28±0,02 ^a	0,0101 ± 0,0002 ^a	8,56 ± 0,24	55,8

*Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

Conforme apresentado na Tabela 18, foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros obtidos nas condições experimentais testadas, sendo que o Ensaio 1 apresentou maior valor no teor de lipídios e o Ensaio 3 apresentou maiores valores para lipídios totais e produtividade de lipídios. Comparando então a condição indicada pelo delineamento Plackett-Burman nas duas temperaturas (Ensaio 2 e Ensaio 3) foi possível

verificar um incremento de aproximadamente 43%, 30% e 25% para teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios a 30°C, respectivamente, comparando a 25°C. Portanto, foi selecionada a temperatura de 30°C para continuidade do estudo.

Esta condição, porém, proporcionou um acúmulo inferior em cerca de 11% no teor de lipídios comparativamente aos pontos centrais do delineamento Plackett-Burman (Ensaio 1). Entretanto, priorizando as respostas lipídios totais, que leva em consideração a biomassa produzida durante o cultivo e o teor de lipídios, bem como a produtividade do processo de produção de lipídios, foi selecionada a temperatura de 30°C e o meio de produção indicado pelo delineamento experimental Plackett-Burman (Ensaio 3), para a seqüência do estudo.

Cabe salientar ainda que o maior valor de lipídios totais observado no Ensaio 3, principalmente quando comparado ao Ensaio 1, está relacionado a obtenção de um maior valor de biomassa e não a um maior teor de lipídios. Este fato pode ser justificado pela menor relação C/N do Ensaio 2 (55,8), quando comparada com o Ensaio 1 (98,6). Menores valores de relação C/N favorecem o crescimento celular. Adicionalmente, esta variação na relação C/N, de 55,8 para 98,6, teve um impacto de apenas cerca de 11% no teor de lipídios.

5.3. DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Com base nos resultados obtidos, e pelo fato de que o aumento das concentrações de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, extrato de levedura e $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ terem apresentado efeito positivo na produção de lipídios, foi proposto um delineamento composto central rotacional (DCCR) com as concentrações de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e extrato de levedura incrementadas, em relação ao delineamento Plackett-Burman, e as demais condições de cultivo fixadas em ($g \cdot L^{-1}$): 5 KH_2PO_4 ; 1 Na_2HPO_4 ; 30 glicerol; pH 5,5; temperatura de 30°C.

A Tabela 19 apresenta o DCCR e as respostas obtidas, com 3 pontos centrais e 8 pontos axiais, totalizando 17 ensaios, visando à otimização da composição do meio de cultivo para produção de lipídios.

O teor de lipídios variou de 3,57% (Ensaio 8) a 9,7% (Ensaio 13), os lipídios totais de 0,48 $g \cdot L^{-1}$ (Ensaio 1 e Ensaio 8) a 1,33 $g \cdot L^{-1}$ (Ensaio 11) e a produtividade de lipídios de 0,0040 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ (Ensaio 8) a 0,0111 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ (Ensaio 13), indicando resultados superiores para lipídios totais e produtividade de lipídios quando comparados aos obtidos no delineamento Plackett – Burman (Tabela 10).

Tabela 19 – Matriz do delineamento composto central rotacional e respostas obtidas.

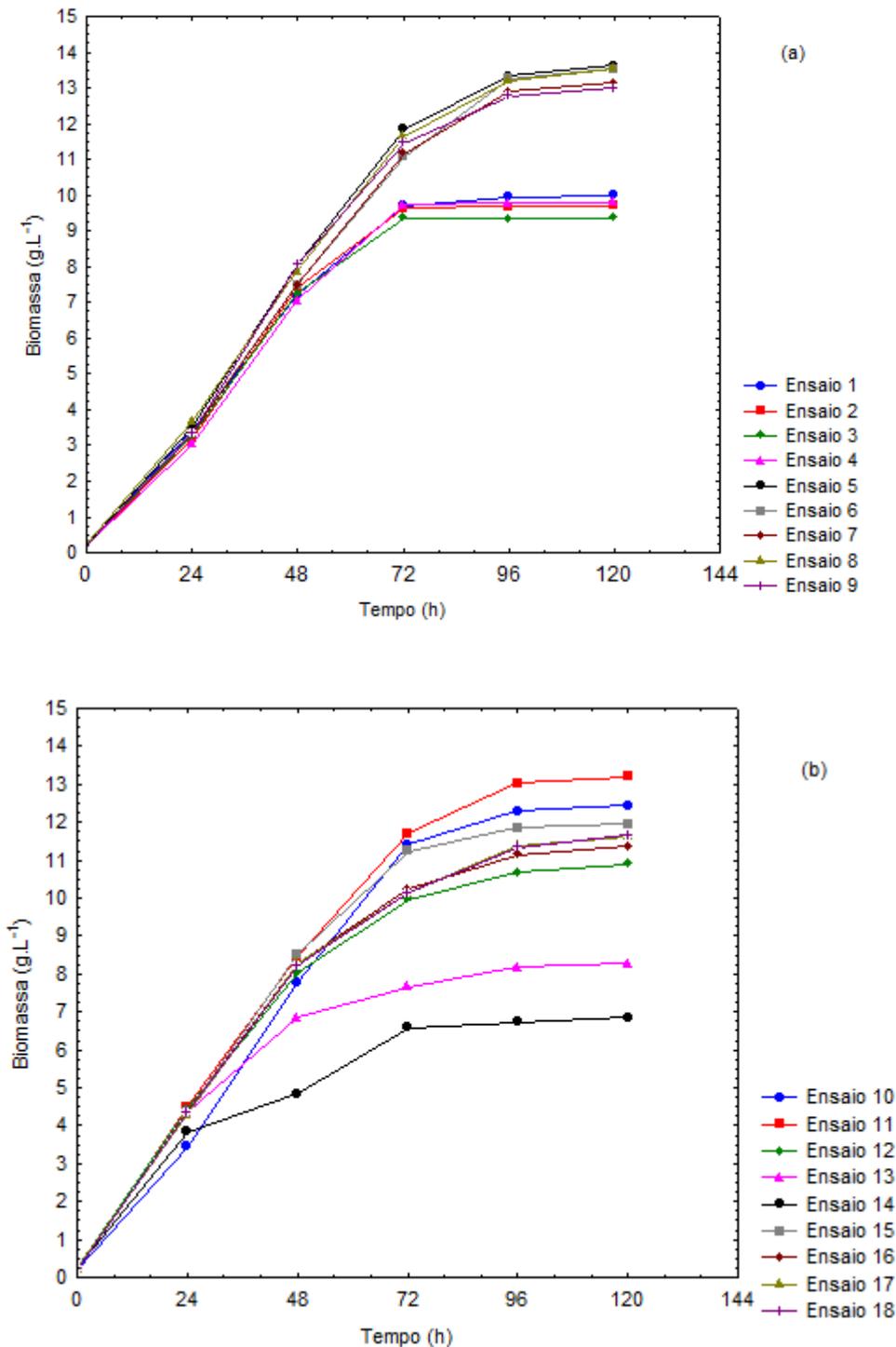
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	-1 (3,4)	-1(0,0056)	-1(1,96)	4,79	0,48	0,0040
2	+1(4,6)	-1(0,0056)	-1(1,96)	5,88	0,57	0,0048
3	-1 (3,4)	+1(0,016)	-1(1,96)	7,51	0,70	0,0059
4	+1(4,6)	+1(0,016)	-1(1,96)	6,12	0,60	0,0050
5	-1(3,4)	-1(0,0056)	+1(3,46)	5,58	0,76	0,0063
6	+1(4,6)	-1(0,0056)	+1(3,46)	5,24	0,71	0,0059
7	-1(3,4)	+1(0,016)	+1(3,46)	5,00	0,66	0,0055
8	+1(4,6)	+1(0,016)	+1(3,46)	3,57	0,48	0,0040
9	-1,68 (3,0)	0(0,011)	0(3,1)	4,35	0,57	0,0047
10	+1,68 (5,0)	0(0,011)	0(3,1)	4,20	0,52	0,0044
11	0(4,0)	-1,68(0,002)	0(3,1)	8,21	1,33	0,0111
12	0(4,0)	+1,68(0,02)	0 (3,1)	6,83	0,95	0,0079
13	0 (4,0)	0 (0,011)	-1,68 (1,2)	9,68	1,09	0,0091
14	0(4,0)	0(0,011)	+1,68(5,0)	6,08	0,60	0,0050
15	0(4,0)	0(0,011)	0 (3,1)	7,95	1,14	0,0095
16	0(4,0)	0(0,011)	0 (3,1)	8,00	1,17	0,0098
17	0(4,0)	0(0,011)	0 (3,1)	7,25	1,06	0,0089

Variáveis: X₁:MgSO₄.7H₂O; X₂: ZnSO₄.7H₂O; X₃: Extrato de levedura. **Respostas:** Y₁: Teor de lipídios em base seca (%); Y₂: Lipídios totais produzidos (g.L⁻¹); Y₃: Produtividade de lipídios (g.L⁻¹.h⁻¹). **Condições (fixas):** 5g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1 g.L⁻¹Na₂HPO₄; 30 g.L⁻¹glicerol; pH 5,5; temperatura de 30°C.

5.3.1 Acompanhamento da biomassa ao longo dos cultivos

O acompanhamento da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* ao longo dos cultivos está apresentado nas Figuras 7 (a) para os Ensaios 1 ao 9, e 7 (b) para os Ensaios 10 ao 18.

Figura 7 - Acompanhamento da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* ao longo dos cultivos. (a) Ensaios 1 ao 9. (b) Ensaios 10 ao 18.



Observa-se que os Ensaios 5, 7, 8 e 10 correspondem ao melhor crescimento celular de *Meyerozyma guilliermondii*, atingindo-se biomassa máxima em 96h de cultivo, sendo essa entre 13 e 14 g.L⁻¹. Esses resultados são maiores do que aqueles obtidos no delineamento Placket- Burmam para os Ensaios 4,5 e 9, onde se atingiu uma biomassa

máxima em torno de 8 g.L^{-1} . Este fato pode estar relacionado à faixa maior de concentração de extrato de levedura (até $5,0 \text{ g.L}^{-1}$) usada nessa etapa de estudo, já que um maior aporte de nitrogênio resulta em menor relação C/N, que favorece o crescimento celular.

5.3.2 Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos

A evolução do pH está apresentada na Figura 8(a), para os Ensaios 1 ao 9, e Figura 8 (b), para os Ensaios 10 ao 18. Para a maioria dos ensaios houve um incremento de pH nas primeiras 24 h de cultivo, e o pH também teve a tendência a ficar constante a partir das 72 h de cultivo. Entretanto, para os Ensaios 1, 2, 5, 6 e 11, o pH tendeu a diminuir ao longo do cultivo.

Figura 8: Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos. (a) Ensaios 1 ao 9; (b) Ensaios 10 ao 18.

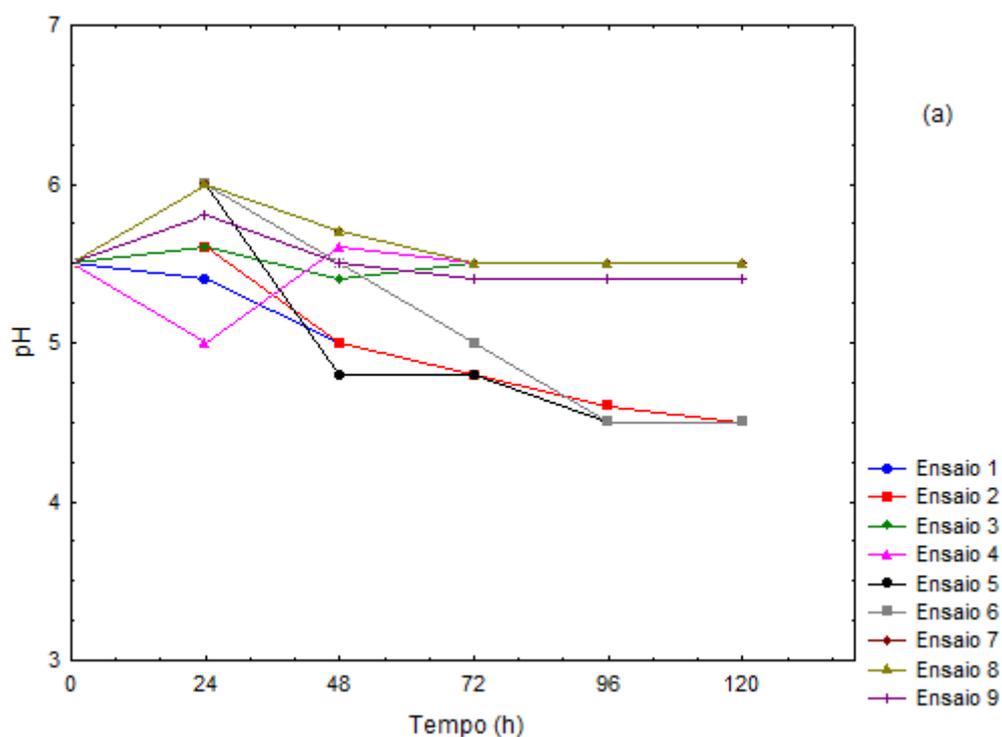
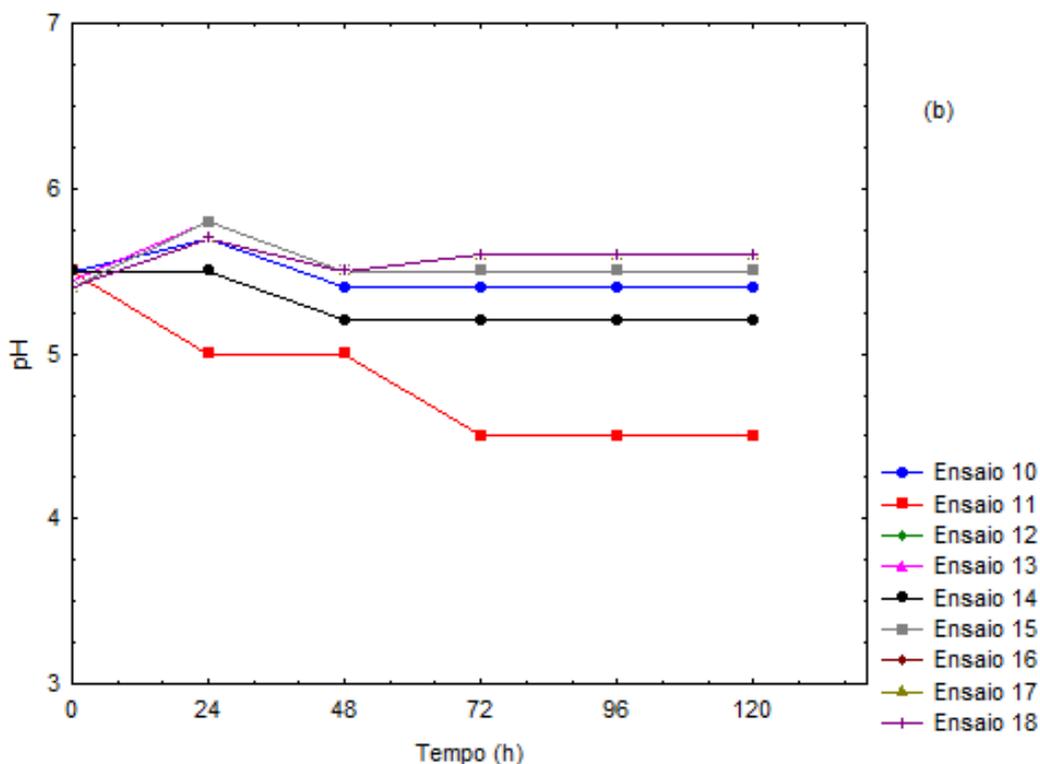


Figura 8: Acompanhamento do pH ao longo dos cultivos. (a) Ensaios 1 ao 9; (b) Ensaios 10 ao 18.(Continuação)



5.3.3 Avaliação da produção de lipídios através do DCCR

Com a finalidade de verificar a possibilidade de construção de modelos empíricos codificados com os dados da Tabela 20, constatou-se através da análise de efeitos que a mudança das concentrações de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e extrato de levedura tiveram um efeito significativo ($p \leq 0,05$) para todas as respostas estudadas.

Para verificar se o modelo era preditivo, foi feito um teste F. As Tabelas 21, 22 e 23 apresentam a ANOVA com o teste F e o coeficiente de correlação R para as respostas teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios, respectivamente, demonstrando que F_{cal}/F_{tab} foi superior a 3 para todas as respostas, indicando que os modelos são preditivos, sendo que o coeficiente de correlação foi superior a 0,8 para todas as respostas .

Tabela 20– Coeficientes de regressão significativos para construção dos modelos para teor de lipídios (%), lipídios totais produzidos (g.L^{-1}) e produtividade de lipídios ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Resposta	Fator	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(14)	p
Y ₁	X ₁ (Q)	-1,34	0,5258	-5,11	0,0001
	X ₃ (L)	-0,80	0,5129	-3,13	0,0073
Y ₂	X ₁ (Q)	-0,24	0,0999	-4,78	0,0002
	X ₃ (Q)	-0,13	0,0999	-2,65	0,0187
Y ₃	X ₁ (Q)	-0,0022	0,0008	-4,79	0,0006
	X ₃ (Q)	-0,0004	0,0008	-2,63	-0,0040

Variáveis: X₁: $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$; X₂: $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$; X₃: Extrato de levedura. **Respostas:** Y₁: Teor de lipídios em base seca (%); Y₂: Lipídios totais produzidos (g.L^{-1}); Y₃: Produtividade de lipídios ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Tabela 21–ANOVA para resposta teor de lipídios.

Fonte de variação	SQ	GL	MS	F _{cal}	F _{tab}	F _{cal} /F _{tab}	R
Regressão	32,23910	2	16,119554	17,96	3,74	4,80	0,8482
Resíduo (Erro)	12,56466	14	0,8974763				
Total (SS)	44,80377	16					

Tabela 22– ANOVA para resposta lipídios totais.

Fonte de variação	SQ	GL	MS	F _{cal}	F _{tab}	F _{cal} /F _{tab}	R
Regressão	0,7830510	2	0,3915251	12,73	3,74	3,40	0,8033
Resíduo (Erro)	0,4302548	14	0,0307324				
Total (SS)	1,2133058	16					

Tabela 23– ANOVA para resposta produtividade de lipídios.

Fonte de variação	SQ	GL	MS	F _{cal}	F _{tab}	F _{cal} /F _{tab}	R
Regressão	$5,50 \times 10^{-5}$	2	$2,75 \times 10^{-5}$	12,74	3,74	3,40	0,8033
Resíduo (Erro)	$3,02 \times 10^{-5}$	14	$2,16 \times 10^{-6}$				
Total (SS)	$8,52 \times 10^{-5}$	16					

As Equações 15, 16 e 17 representam os modelos empíricos codificados para as respostas teor de lipídios (%), lipídios totais produzidos (g.L^{-1}) e produtividade de lipídios ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), respectivamente.

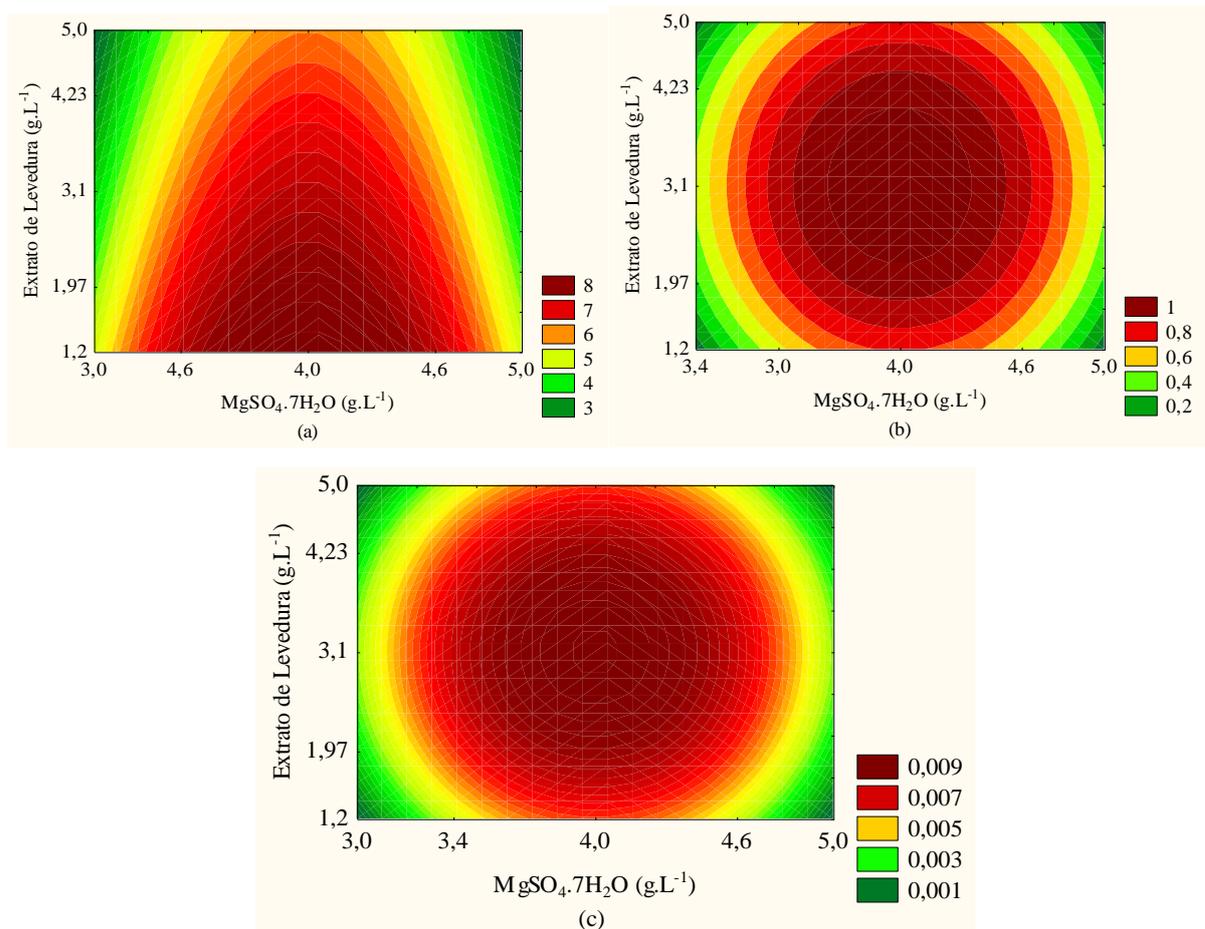
$$\% \text{ Lipídios} = +7,34 - 1,34.X_1^2 - 0,80.X_3^2 \quad (15)$$

$$\text{Lipídios totais} = + 1,09 - 0,24.X_1^2 - 0,13.X_3^2 \quad (16)$$

$$\text{Produtividade em lipídios} = +0,0091 - 0,0022.X_1^2 - 0,0004.X_3^2 \quad (17)$$

A partir dos modelos empíricos foi possível obter as curvas de contorno (Figura 9) para a análise das melhores condições de concentração de $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura para a produção de lipídios.

Figura 9 - Curvas de contorno para (a) teor de lipídios; (b) lipídios totais produzidos; (c) produtividade de lipídios. Concentração de $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ de $0,011 \text{ g.L}^{-1}$ (Nível 0).



Na Figura (9a) pode-se observar que os maiores valores de teor de lipídios em base seca (em torno de 8%) foram obtidos com concentração de $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ de 4,0 g.L^{-1} (nível 0) e de extrato de levedura entre 1,2 g.L^{-1} (nível -1,68) e 1,97 g.L^{-1} (nível -1).

Na Figura (9b) verifica-se que $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ na concentração de $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ (nível 0) e extrato de levedura em $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ (nível 0) otimizaram a concentração dos lipídios totais, atingindo em torno de 1 g.L^{-1} . Na Figura (9c) observa-se que essas mesmas condições também proporcionaram uma otimização da produtividade de lipídios (em torno de $0,0023 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

5.4. ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Meyerozyma guilliermondii*

Em face dos resultados alcançados na otimização do DCCR, com 8% de teor de lipídios, 1 g.L^{-1} de lipídios totais e produtividade de lipídios em torno de $0,009 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, em que houve uma redução no teor de lipídios comparativamente ao observado no Plackett – Burman, foram realizados ensaios com diferentes composições do meio de produção segundo a Tabela 24.

Tabela 24 – Diferentes composições* de meio de produção no cultivo de *Meyerozyma guilliermondii*.

Ensaio	Composição do meio de produção	Condição definida neste trabalho
1	$5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $1 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; 30 g.L^{-1} glicerol; $4 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,002 \text{ g.L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ extrato de levedura.	Condição otimizada pelo DCCR
2	$5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $1 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; 30 g.L^{-1} glicerol; $4 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,0002 \text{ g.L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ extrato de levedura.	Condição otimizada do DCCR com concentração de zinco dez vezes menor
3	$5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $1 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; 30 g.L^{-1} glicerol; $3 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,0002 \text{ g.L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ extrato de levedura.	Condição estabelecida pelo delineamento Plackett-Burman

*Em todos os ensaios o pH inicial foi ajustado em 5,5 e a temperatura em 30°C .

A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos para o teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios em diferentes composições de meio de produção no cultivo de *Meyerozyma guilliermondii*.

Tabela 25 –Resultados obtidos* para o teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios no cultivo de *Meyerozymaguilliermondii*.

Ensaio	Teor de lipídios (%)	Lipídios totais (g.L ⁻¹)	Produtividade de lipídios (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Relação C/N
1	8,25 ± 0,15 ^b	1,10 ± 0,03 ^b	0,0092 ± 0,0003 ^b	13,46 ± 0,13 ^a	27,5
2	4,52 ± 0,35 ^c	0,54 ± 0,04 ^c	0,0045 ± 0,0003 ^c	11,89 ± 0,15 ^b	27,5
3	15,14 ± 0,18 ^a	1,23 ± 0,02 ^a	0,0103 ± 0,0001 ^a	8,15 ± 0,06 ^c	55,8

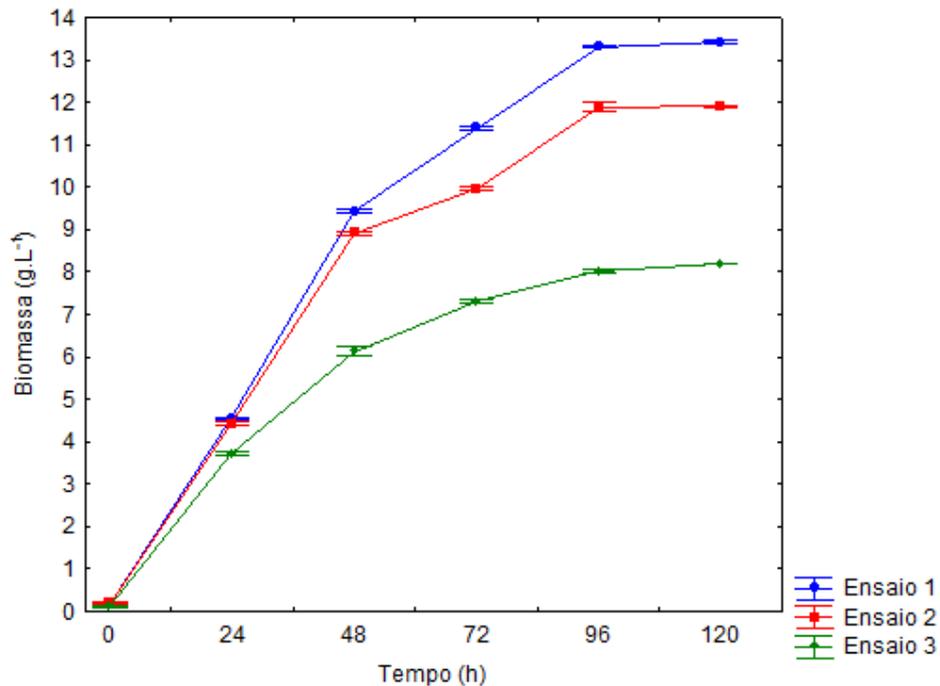
*Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

Conforme mostra a Tabela 25 foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros obtidos nas condições experimentais testadas, sendo que o Ensaio 3 apresentou maiores valores no teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios, porém menor valor de biomassa, quando comparado aos demais ensaios. Ao comparar o Ensaio 3 com o Ensaio 1, percebe-se um incremento de 84,1%, 11,8% e 12,0% no teor lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios, respectivamente. Porém, um decréscimo de 39,5% é observado na biomassa quando se compara o Ensaio 1 com o Ensaio 3.

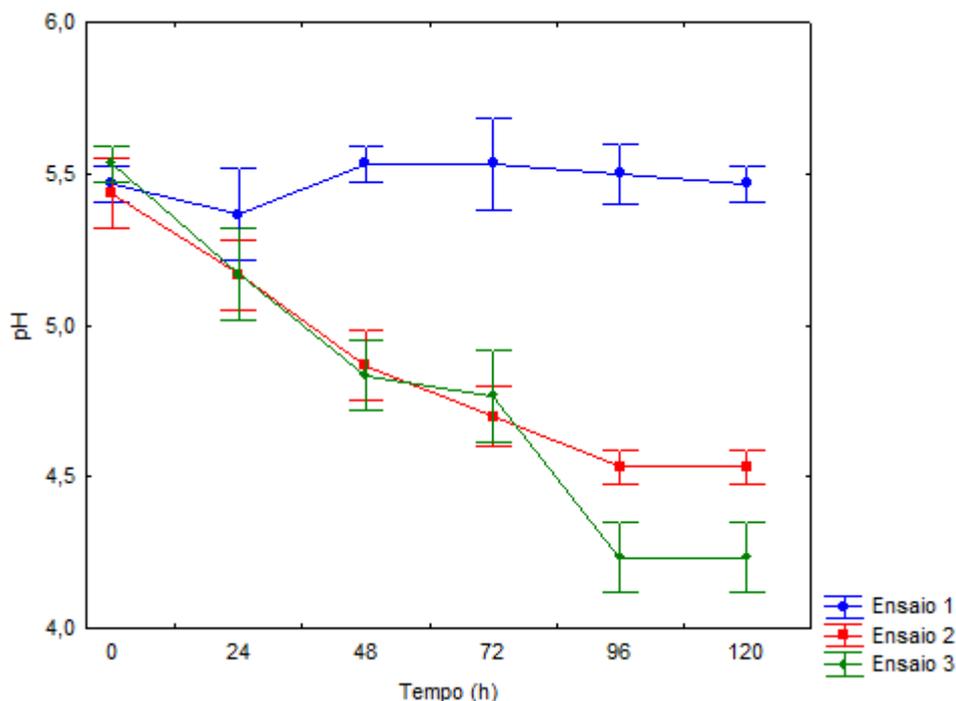
Este comportamento pode estar relacionado à relação C/N, que é duas vezes maior no Ensaio 1. O excesso de carbono e a limitação de nitrogênio direcionam o metabolismo ao armazenamento do carbono na forma de triacilgliceróis (SAENGE et al., 2011). Por outro lado, a fonte de nitrogênio presente em maiores concentrações, diminuindo a relação C/N, favorece o crescimento celular (SANTOS et al., 2013), conforme constatado nos Ensaios 1 e 2.

Ainda é importante destacar que os dados obtidos no Ensaio 3 apresentaram reprodutibilidade, quando comparados com os obtidos para o mesmo ensaio que foi realizado na seqüência do delineamento Plackett- Burman (Tabela 18). A Figura 10 apresenta o acompanhamento da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* ao longo dos cultivos para os Ensaios 1, 2 e 3, indicando menor produção de biomassa no Ensaio 3.

Figura 10 - Acompanhamento da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* ao longo dos cultivos para os Ensaio 1, 2 e 3.



A Figura 11 apresenta a evolução do pH ao longo do tempo para os Ensaio 1, 2 e 3. Analisando a Figura 11, percebe-se a diferença expressiva na evolução do pH entre o Ensaio 1 com os Ensaio 2 e 3, havendo maior acidificação nestes dois últimos. Este fato pode estar relacionado ao metabolismo da levedura. Segundo Makri, Fakas e Aggelis (2010), leveduras oleaginosas são capazes de assimilar glicerol, convertendo este em intermediários da via glicolítica, por fosforilação direta do glicerol seguida de desidrogenação, ou desidrogenação do glicerol e subsequente fosforilação. O produto destas reações é a dihidroxicetona fosfato, a qual pode ser transformada em ácido cítrico, lipídios e outros produtos. Desta forma, é observado na fase estacionária do crescimento destes micro-organismos o acúmulo de lipídios e a produção de ácido cítrico simultâneos.

Figura 11 - Evolução do pH ao longo do tempo para os Ensaio 1, 2 e 3.

5.5. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A Tabela 26 apresenta o perfil de ácidos graxos obtido para a levedura *Meyerozyma guilliermondii* cultivada em meios com diferentes composições (Ensaio 1, 2 e 3 da Tabela 24). Os cromatogramas se encontram no Apêndice.

De acordo com a Tabela 26 é possível observar que para o Ensaio 1 obteve-se um perfil de ácidos graxos totalizando 1,66% de ácidos graxos saturados, com destaque para o ácido graxo palmítico (C16:0); 15,02% de ácidos monoinsaturados, com destaque para o ácido palmitoleico (C16:1); e 82,52 % de ácidos graxos poli-insaturados, com destaque para os ácidos graxos linoleico (C18:2) e linolelaídico (C18:2n6t).

Para o Ensaio 2 é possível observar que o percentual de ácidos graxos saturados foi de 1,53%, com destaque para o ácido margárico (C17:0) e ácido palmítico (C16:0); 14,95% de ácidos graxos monoinsaturados, com destaque para o ácido palmitoleico (C16:1) novamente; e os ácidos graxos poli-insaturados representaram 82,53%, com 45,13% de ácido linoleico (C18:2) e 32,50% de ácido linolelaídico (C18:2n6t).

Para o Ensaio 3, observou-se 0,94% de ácidos graxos saturados, destacando-se o ácido graxo tricosanóico (C23:0). O ácido palmitoleico (C16:1) foi destaque entre os ácidos graxos monoinsaturados, que totalizaram 11,22%. Assim como para os Ensaio 1 e 2, o ácido oleico (C:18:2) também foi produzido em maior porcentagem, totalizando 53,2%. Além disso,

outro ácido essencial se destacou na condição de cultivo desse ensaio, o ácido gama linolênico (C18:3n6), com uma porcentagem de 29,2%.

Desta forma, pode-se observar que os perfis apresentaram diferenças, principalmente entre os lipídios produzidos nas condições do Ensaio 3, quando comparado aos produzidos nos Ensaios 1 e 2, podendo-se afirmar que a composição do meio de cultivo influi no perfil de ácidos graxos dos lipídios microbianos.

Tabela 26– Perfil de ácidos graxos dos lipídios da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* cultivada em meio contendo glicerol bruto em diferentes condições de cultivo.

Ácidos graxos	Ensaio 1 (%)	Ensaio 2 (%)	Ensaio 3 (%)
Ácidos graxos saturados			
C16:0	0,69	0,54	0,35
C17:0	0,57	0,55	0,11
C23:0	0,40	0,44	0,48
Ácidos graxos monoinsaturados			
C 14:1	0,08	0,08	0,07
C16:1	10,9	10,4	10,8
C17:1	0,28	0,29	0,09
C18:1	3,4	3,8	ND
C24:1n9	0,36	0,38	0,26
Ácidos graxos poli-insaturados			
C18:2	42,77	45,13	53,2
C18:2n6t	34,8	32,5	ND
C18:3n6	1,27	1,4	29,2
C18:3n3	3,68	3,5	3,5

Ensaio 1: 5g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1g.L⁻¹Na₂HPO₄; 30 g.L⁻¹glicerol;4 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,002 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 3,1 g.L⁻¹extrato de levedura; pH= 5,5; T= 30°C. Ensaio 2: 5g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1g.L⁻¹Na₂HPO₄; 30g.L⁻¹glicerol;4 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,0002 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 3,1 g.L⁻¹ extrato de levedura; pH= 5,5; T= 30°C.Ensaio 3: 5g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1g.L⁻¹Na₂HPO₄; 30g.L⁻¹ glicerol; 3 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,0002 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 1,2 g.L⁻¹extrato de levedura; pH= 5,5; T= 30°C. ND: não detectado.

Por outro lado, pode-se afirmar que a biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* mostra-se promissora como fonte de ácidos graxos poli-insaturados considerados essenciais,

em particular os ácidos linoleico e gama-linolênico, e esse aspecto torna esta biomassa uma potencial fonte desses ácidos graxos em alimentação humana e animal e na área farmacêutica.

Os ácidos graxos poli-insaturados podem atuar na prevenção e tratamento de muitas doenças cardiovasculares, redução da pressão arterial, redução dos níveis de colesterol e triacilgliceróis no plasma, câncer, e, além disso, são considerados essenciais tanto para nutrição infantil quanto para o desenvolvimento cerebral (TAKAHASHI, 2005). O ácido linoleico é essencial para um crescimento e desenvolvimento saudável do organismo, desempenhando também um papel importante na redução de risco de doenças cardiovasculares e do colesterol, função vascular e sistema imunológico, enquanto que o ácido gama linolênico é essencial para as funções cerebrais e da retina (GEAY et al., 2001).

Diversos autores, como Earsterling et al.(2009), Raimondiet al. (2014), Spier, Buffon e Burkert (2015)e Gao et al. (2016), reportaram a produção de lipídios microbianos por leveduras utilizando glicerol como fonte de carbono e obtiveram percentuais de ácido gama linolênico (C18:3n6) na ordem de 1,76%, 6,9%, 4,2% e 6,7%, respectivamente, para as leveduras *Rhodotorula glutinis*, *Candida freyschussii*, *Lipomyce sstarkeyi* e *Rhodospiridium toruloides*. Entretanto, Spier, Buffon e Burkert (2015) observaram 23,1% de ácido linolênico para a levedura *Candida cylindracea* cultivada tendo glicerol bruto como fonte de carbono. Logo nesse trabalho, conseguiu-se uma significativa produção em relação aos trabalhos citados anteriormente desse ácido graxo essencial fazendo uso de glicerol oriundo da produção de biodiesel como substrato, nas condições correspondentes ao Ensaio 3.

5.6. PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES DO BIODIESEL

A Tabela 27 apresenta valores de propriedades individuais dos metil ésteres de ácidos graxos, de acordo com o perfil dos ácidos graxos encontrado nos lipídios produzidos pela levedura *Meyerozyma guilliermondii*. Dentre essas propriedades, o número de duplas ligações (D_i) e a massa molar (P_i) foram dados obtidos da literatura (Duarte e Maugeri,2014; Raimondi et al., 2014), porém outras propriedades, como número de cetano (CN_i), densidade (ρ_i), viscosidade cinemática (v_i)e calor de combustão (ΔH_{ci}), foram calculadas através das equações empíricas 5, 6, 7 e 8, respectivamente,descritas no item 4.9.

Com os dados obtidos da composição relativa em massa de cada ácido graxo (c_i) para os Ensaios 1, 2 e 3 (Tabela 26), e com as equações empíricas (9 a 15) e utilizando o princípio da regra das misturas, foi possível predizer propriedades do biodiesel, que servem como parâmetros importantes para prever a qualidade do biocombustível

(RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUES-RODRÍGUES; JARAMILLO-JACOB, 2012;DUARTE; MAUGERI, 2014; CERIANE et al., 2007). A Tabela 28 apresenta os valores de propriedades estimadas do biodiesel para os lipídios produzidos nos Ensaio 1, 2 e 3, tendo como fonte de carbono o glicerol bruto.

A Tabela 29 mostra os valores limites de propriedades do biodiesel estabelecidos pelas normas vigentes ASTM-D6751 (EUA), EM 14213 e EM 14214 (Europa) e ANP (Brasil) para comercialização do biodiesel.

Tabela 27 - Valores de propriedades individuais dos metil ésteres de ácidos graxos encontrados na produção de lipídios pela levedura *Meyerozyma guilliermondii*.

		Metil ésteres de ácidos graxos												
Propriedade	Símbolo	Unidade	C14:1	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:1	C18:2	C18:2n6t	C18:3n3	C18:3n6	C23:0	C24:1n9
Dupla ligação	D _i	-	1	0	1	0	1	1	2	2	3	3	0	1
Massamolar	M _i	g.mol ⁻¹	240,38	270,45	268,43	284,48	282,46	296,49	294,47	294,47	292,46	292,46	368,64	380,65
Número decetano	CN _i	-	44,79	73,88	53,27	78,11	57,50	61,74	41,13	41,13	20,52	20,52	103,53	87,16
Densidade	ρ _i	kg.m ⁻³	878,48	864,42	876,35	863,52	875,45	874,63	886,54	886,54	898,45	898,45	859,59	870,97
Viscosidade cinemática	ν _i	mm ² .s ⁻¹	2,73	4,37	3,59	4,96	4,08	4,60	3,79	3,79	3,11	3,11	9,47	8,58
Calor de combustão	ΔH _{ci}	MJ.kg ⁻¹	38,52	39,56	39,30	39,88	39,63	39,93	39,68	39,68	39,43	39,43	41,32	41,27

Tabela 28 – Valores de propriedades estimadas do biodiesel para os Ensaios 1, 2 e 3.

Propriedade do biodiesel	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Densidade (kg.m ⁻³)	878,04	876,37	871,85
Viscosidade cinemática (mm ² .s ⁻¹)	3,78	3,78	3,51
Índice de saponificação	190,59	190,08	188,71
Índice de iodo	160,52	150,46	177,23
Número de cetano	38,86	38,79	37,91
Calor de combustão(MJ.kg ⁻¹)	39,21	39,38	39,03

Ensaio 1: 5g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1g.L⁻¹Na₂HPO₄; 30g.L⁻¹glicerol;4 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,002 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 3,1 g.L⁻¹extrato de levedura; pH= 5,5; T= 30°C. Ensaio 2: 5g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1g.L⁻¹Na₂HPO₄; 30g.L⁻¹glicerol;4 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,0002 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 3,1 g.L⁻¹extrato de levedura; pH= 5,5; T= 30°C. Ensaio 3: 5g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1g.L⁻¹Na₂HPO₄; 30g.L⁻¹glicerol; 3 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,0002 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 1,2 g.L⁻¹extrato de levedura; pH= 5,5; T= 30°C.

Tabela 29 - Limites estabelecidos pelos padrões ASTM, EM e ANP para comercialização do biodiesel.

Norma	ρ (kg.m ⁻³)	ν (mm ² .s ⁻¹)	ΔH (kJ.g ⁻¹)	CN	Índice de iodo
ASTM D6751	NE	1,9 – 6,0	NE	Mín 47	NE
EM 14213	860 – 900	3,5 – 5,0	Mín 35	NE	Máx 130
EM 14214	860 – 900	3,5 – 5,0	NE	Mín 51	Máx 120
ANP 255/2003	NE	NE	NE	Mín 45	NE

NE: não especificado.

Fonte: Duarte e Maugeri (2014)

Comparando os valores obtidos da Tabela 28 com os da Tabela 29, encontram-se resultados promissores, uma vez que densidade, viscosidade, índice de saponificação e calor de combustão estão de acordo como os limites estabelecidos por todas as normas citadas. Os valores foram comparáveis aos obtidos por Duarte e Maugeri (2014) para *Candidasp.* (872 kg.m³, 3,79 mm².s⁻¹ e 39 MJ.kg⁻¹, respectivamente).

Entretanto, o número de cetano e o índice de iodo estão, respectivamente, abaixo e acima dos limites estabelecidos. O índice de iodo é uma medida do grau de insaturação das cadeias, estando relacionado à estabilidade oxidativa, sendo o valor obtido elevado em função da predominância de ácidos graxos poli-insaturados nos óleos microbianos. Já o número de cetano está associado ao tempo entre a injeção do combustível e o início da ignição, sendo que quanto maior o índice de cetano menor o tempo de ignição, sendo também este parâmetro influenciado (reduzido) pelo aumento da proporção de ácidos graxos poli-insaturados. Duarte e Maugeri (2014) estimaram valores de 53 para índice de cetano e 115,5 para índice de iodo a partir da composição de ácidos graxos de *Candida sp.* cultivada em meio contendo glicerol bruto. A norma europeia ainda estabelece o máximo de 12% para o ácido linolênico, portanto o biodiesel correspondente ao Ensaio 3 não atenderia também essa exigência.

É importante afirmar ainda que, pelo fato de ser possível alterar o perfil de ácidos graxos por mudanças na composição do meio, esta pode ser manipulada, a fim de resultar em um perfil de ácidos graxos mais satisfatório para obtenção de biodiesel a partir da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* cultivada em meio contendo glicerol residual.

5.7 CULTIVOS EM BATELADA ALIMENTADA

Com objetivo de aumentar a produção de lipídios, cultivos em batelada alimentada foram realizados utilizando inicialmente as condições estabelecidas no cultivo em batelada (5 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1g.L⁻¹Na₂HPO₄; 30g.L⁻¹glicerol; 3 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,0002 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 1,2 g.L⁻¹ extrato de levedura; pH inicial 5,5; temperatura 30°C) e diferentes estratégias de alimentação. A Tabela 30 apresenta os ensaios de batelada alimentada e as respostas obtidas. De acordo com a Tabela 30, maior produção de lipídios foi obtida com a alimentação de glicerol bruto em 48 h de cultivo, atingindo-se 18,70%, 2,42 g.L⁻¹ e 0,0143 g.L⁻¹.h⁻¹ para as respostas teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios, respectivamente, diferindo-se estatisticamente das demais condições estudadas. A alimentação contendo apenas glicerol permite manter a relação C/N em patamares elevados, o que pode contribuir para um maior acúmulo de lipídios.

Esta estratégia de alimentação, quando comparada ao cultivo em batelada, representou um incremento de 23%, 96,8%, 38,8% e 37,1% no teor de lipídios, lipídios totais, produtividade de lipídios e biomassa, respectivamente. Ainda de acordo com a Tabela 30, percebem-se maiores valores de biomassa quando o cultivo foi alimentado com meio concentrado em 48 h e 96 h (M-48 e M-96), não havendo diferenças significativas neste parâmetro para os dois referidos ensaios. Este comportamento pode ser explicado pela presença de extrato de levedura na alimentação, que contribui para uma relação C/N mais baixa, favorável ao crescimento celular, em detrimento do acúmulo de lipídios. Desta forma, um aspecto relevante ao estabelecer as condições para a batelada alimentada é o impacto da alimentação na relação C/N do meio, que deve conciliar o aumento da biomassa e o acúmulo de lipídios.

Tabela 30 – Ensaios de batelada alimentada e respostas obtidas*

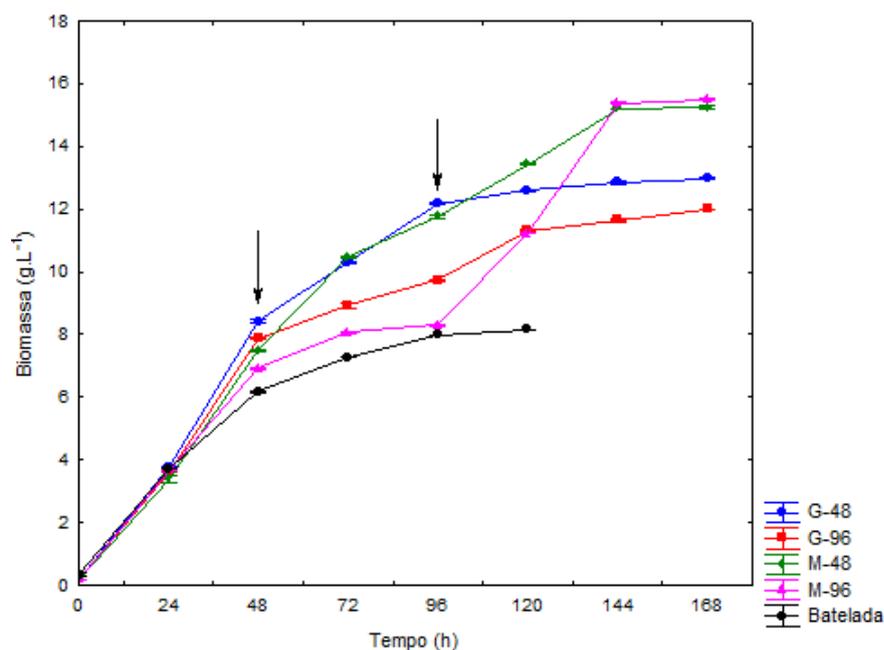
Ensaio	Teor de lipídios (%)	Lipídios totais (g.L ⁻¹)	Produtividade de lipídios (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)
G-48	18,70 ± 0,26 ^a	2,42 ± 0,04 ^a	0,0143 ± 0,0003 ^a	12,96 ± 0,18 ^b
G- 96	16,73 ± 0,66 ^b	1,99 ± 0,06 ^b	0,0119 ± 0,0004 ^b	11,93 ± 0,11 ^c
M-48	9,60 ± 0,17 ^d	1,45 ± 0,01 ^c	0,0087 ± 0,0001 ^c	15,19 ± 0,21 ^a
M-96	6,86 ± 0,28 ^e	1,05 ± 0,05 ^e	0,0063 ± 0,0002 ^d	15,46 ± 0,13 ^a
Batelada	15,10 ± 0,18 ^c	1,23 ± 0,02 ^d	0,0103 ± 0,0001 ^b	8,15 ± 0,06 ^d

*Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

G-48: alimentação com glicerol bruto em 48 h; G-96: alimentação com glicerol bruto em 96 h; M-48: alimentação com meio em 48 h; M-96: alimentação com meio em 96 h.

Analisando a Figura 12, que representa o acompanhamento da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* ao longo dos cultivos em batelada alimentada, percebe-se que houve um prolongamento da duração do crescimento microbiano quando comparado ao cultivo em batelada, permitindo a obtenção de maiores concentrações de biomassa.

Figura 12- Acompanhamento da biomassa de *Meyerozyma guilliermondii* ao longo dos cultivos em batelada alimentada.



Raimondi et al. (2014), no cultivo de *Candida freyschussii* usando glicerol como fonte de carbono, conseguiram 4,7 g.L⁻¹ de lipídios e 15,2 g.L⁻¹ de biomassa no cultivo em batelada. Estes valores aumentaram para 20 g.L⁻¹ e 65 g.L⁻¹ quando pulsos contendo meio concentrado foram alimentados. Chang et al. (2013), no cultivo em batelada alimentada de *Cryptococcus* sp. utilizando glicose, observaram um aumento da biomassa de 9,4 g.L⁻¹ para 11,4 g.L⁻¹ e um aumento nos lipídios totais produzidos de 6 g.L⁻¹ para 7,3 g.L⁻¹, quando comparado com o cultivo em batelada. Anschau et al. (2014), no cultivo de *Lipomyces starkeyi* utilizando glicose e xilose como fontes de carbono, relatam um aumento da biomassa de 27,5 g.L⁻¹ para 85,4 g.L⁻¹, e nos lipídios produzidos de 9,0 g.L⁻¹ para 41,8 g.L⁻¹ quando a batelada alimentada repetida foi utilizada em substituição à batelada simples.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi investigado o uso de glicerol bruto como fonte de carbono nos cultivos em batelada e batelada alimentada para produção de lipídios por *Meyerozyma guilliermondii*.

Primeiramente um delineamento experimental Plackett – Burman foi proposto para estudar a influência de dez variáveis ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, extrato de levedura, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , glicerol, Na_2HPO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH e temperatura) na produção de lipídios, e constatou-se que quatro variáveis (concentrações de: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, extrato de levedura, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) exerceram influência significativa ($p < 0,1$) sobre lipídios totais e produtividade de lipídios, sendo que $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ apresentou em efeito negativo. Quanto ao teor de lipídios, as concentrações de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ demonstraram influência significativa positiva ($p < 0,1$).

Com as variáveis selecionadas, um delineamento composto central rotacional tendo como variáveis as concentrações de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, extrato de levedura e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi proposto, permitindo estabelecer modelos empíricos codificados para as respostas teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios como função das concentrações de extrato de levedura e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

As condições estabelecidas para o cultivo de *Meyerozyma guilliermondii* em batelada em frascos agitados foram: $5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $3 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $1 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ extrato de levedura; 30 g.L^{-1} glicerol; $0,0002 \text{ g.L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH inicial 5,5; temperatura 30°C . Nestas condições foi possível obter 15,1%, $1,23 \text{ g.L}^{-1}$, $0,0103 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $8,15 \text{ g.L}^{-1}$ para teor de lipídios, lipídios totais, produtividade de lipídios e biomassa, respectivamente.

No perfil de ácidos graxos dos lipídios microbianos nesta condição, observou-se a predominância de ácidos graxos poli-insaturados, com elevados percentuais dos ácidos graxos essenciais oleico (C18:2), com 53,2%, e gama linolênico (C18:3n6), com 29,2%. Também se observou que diferentes composições de meio resultaram em perfis diferenciados de ácidos graxos.

Na predição das propriedades do biodiesel, que servem como parâmetros que atestam a qualidade do biocombustível, foi verificado que o número de cetano e o índice de iodo não atenderam a legislação vigente para a comercialização do biodiesel, fato relacionado ao elevado percentual de ácidos graxos poli-insaturados.

Diferentes estratégias de alimentação foram propostas em cultivos em batelada alimentada. A alimentação de um pulso contendo somente glicerol bruto em 48 h de cultivo levou a incrementos de 23%, 96,8%, 38,8% e 37,1% no teor de lipídios, lipídios totais, produtividade de lipídios e biomassa, respectivamente, em relação aos cultivos em batelada, atingindo valores de 18,70%, 2,42 g.L⁻¹, 0,0143 g.L⁻¹.h⁻¹ e 12,96 g.L⁻¹, respectivamente.

Dessa forma, a produção de lipídios por *Meyerozyma guilliermondii* em meio contendo glicerol bruto como principal fonte de carbono em batelada alimentada pode constituir uma alternativa importante para o aproveitamento e valorização desse coproduto gerado da cadeia produtiva do biodiesel, contribuindo para a sua sustentabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. Oil yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, p.1219-1227,2011.
- ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBAACH, M.; GUEBITZ, G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3051 – 3056, 2008.
- ANSCHAU, A.; XAVIER, M. C. A.; HERNALSTEENS, S.; FRANCO, T. T. Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 214 -222, 2014.
- ASHBY, D. R.; SOLAIMAN, Y. K. D.; STRAHAN, D. G. Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) biopolymers. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.88, p. 949-959, 2011.
- ATHENSTAEDT, K.; JOLIVET, P.; BOULARD, C.; ZIVY, M.; NEGRONI, L.; NICAUD, J.M.; CHARDOT, T. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. **Proteomics**, v. 6, p. 1450–1459, 2006.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**.17thedition.Washington, D.C., CD-ROM, 2000.
- BEN. **Balço Energético Nacional 2015**. Ministério das Minas e Energia, Disponível em: <<http://www.mme.gov.br>> Acesso em 17 de janeiro de 2016.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA–JOUVE, C.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v.48, p. 375 – 387, 2009.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1193 – 1206, 2011.
- BERGMANN, J. C.; TUPINAMBÁ, D. D.; COSTA, O. Y. A.; ALMEIDA, J. R. M.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411 – 420, 2013.
- BIALY, E. H.; GOMMA, M. O.; AZAB, S. K. Conversion of oil waste to valuable fatty acids using oleaginous yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p. 2791-2798, 2011.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911 – 917, 1959.
- CANONICO, L.; ASHOOR, S.; TACCARI, M.; COMITINI, F.; ANTONUCCI, M.; TRUZZI, C. SCARPONI, G.; CIANI, M. Conversion of raw glycerol to microbial lipids by

new *Metschnikowia* and *Yarrowia lipolytica* strains. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 1409-1418, 2016.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, p. 105-112, 2005.

CERIANI, R.; GONÇALVES, C. B.; RABELO, J.; CARUSO, M.; CUNHA, A. C. C.; CAVALERI, F. H.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. A. Group contribution model for predicting viscosity of fatty compounds. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, p. 965-972, 2007.

CHANG, Y.H.; CHANG, K.S.; HSU, C.L.; CHUANG, L. T.; CHEN, C. Y.; HUANG, F.Y.; JANG, H.D. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corn cob hydrolysate for microbial oil production. **Fuel**, v. 105, p. 711-717, 2013.

CHANG, Y. H.; CHANG, K. S.; LEE, C. F.; HSU, C. L.; HUANG, C. W.; JANG, H. D. Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corn cob hydrolysate as carbon source. **Biomass & Bioenergy**, v. 72, p. 95-103, 2015.

CHEN, X. F.; HUANG, C.; YANG, X. Y.; XIONG, L.; CHEN, X. D.; MA, L. L. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corn cob acid hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 18-24, 2013.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; DIETZ, D.; DOULGERAKI, A. I.; NYCHAS, G. J.; ZENG, A. P. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 101 – 112, 2011.

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass & Bioenergy**, v. 25, p. 221-226, 2003.

CUI, Y.; BLACKBURN, J. W.; LIANG, Y. Fermentation optimization for the production of lipid by *Cryptococcus curvatus*: Use of response surface methodology. **Biomass & Bioenergy**, v. 47, p. 410 – 417, 2012.

DUARTE, S. H. ANDRADE, C. C. P.; GHISELLI, G.; MAUGERI, F. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 377-381, 2013.

DUARTE, S. H.; MAUGERI, F. Prediction of quality properties for biodiesel production by oleaginous yeast cultivated in pure and raw glycerol. **Chemical Engineering Transactions**, v. 37, p. 463-467, 2014.

DYAL, S.D.; NARINE, S.S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 38, p. 445-467, 2005.

- EASTERLING, E. R.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorulaglutinis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p 356 – 361, 2009.
- EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, v. 18, p. 630 -635, 1983.
- FEI, Q.; CHANG, H.N.; SHANG, L.; CHOI, J.D.R.; KIM, N.; KANG, J. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2695–2701, 2011.
- FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v.31, p. 2091-2099, 2008
- GAO, Z.; MA, Y.; WANG, Q.; ZHANG, M.; WANG, J.; LIU, Y. Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by *Rhodospiridium toruloides* yeast 32489. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 373 – 379, 2016.
- GARZÓN, C. S. L. **Produção microbiana de lipídeos**. 2009. 137f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2009.
- GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J. F.; CULIOLI, J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 1–26, 2001.
- GHOLAMI, Z.; ABDULLAH, A. Z.; LEE, K-T. Dealing with the surplus of glycerol production from biodiesel industry through catalytic upgrading to polyglycerols and other value-added products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 327-341, 2014.
- HUANG, C.; CHEN, X. F.; XIONG, L.; CHEN, X. D; MA, L. L. Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 711 – 714, 2012.
- HUANG, X. F.; LIU, J. N.; LU, L. J.; PENG, K. M.; YANG, G. X.; LIU, J. Culture strategies for lipid production using acetic acid as sole carbon source by *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 141 – 149, 2016.
- KARATAY, S.E.; DÖNMEZ, G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7988–7990, 2010.
- KHOT, M.; KAMAT, S.; ZINJARDE, S.; PANT, A. CHOPADE, B.; RAVIKUMAR, A. Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. **Microbial Cell Factories**, v. 11:71, p. 1-13, 2012.
- LEONETI, A. B.; LEONETI, V. A.; OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138-145, 2012.

LI, Y.H.; LIU, B.; ZHAO, Z.B.; BAI, F.W. Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 650–656, 2006.

LIANG, Y.; CUI, Y.; TRUSHENSKI, J.; BLACKBURN, J. W. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7581 – 7586, 2010.

LIANG, Y.; TANG, T.; SIDDARAMU, T.; CHOUDHARY, R.; UMAGILIYAGE, A. L. Lipid production from sweet sorghum bagasse through yeast fermentation. **Renewable Energy**, v. 40, 130-136, 2012.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2351–2358, 2010.

MANEERUNG, T.; KAWI, S.; DAI, Y.; CHI-HWA, W. Sustainable biodiesel production via transesterification of waste cooking oil by using CaO catalysts prepared from chicken manure. **Energy Conversion and Management**, v. 123, p. 487 – 497, 2016.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 93 – 100, 2001.

MATSAKAS, L.; STERIOTI, A. A.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P. Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 367 – 372, 2014.

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; BRANDÃO, P.I.; FRANCO, M.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, p. 10-15, 2013.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1 -5, 2009.

METCALFE, L.D.; SCHIMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514-515, 1966.

MEULLEMIESTRE, A.; BREIL, C.; ABERT-VIAN, M.; CHEMAT, F. Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a bio jet fuel application. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 190-199, 2016.

MORAES, I.O. **Produção de microrganismos**. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia industrial*. V. 3. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 199-217.

MORITA, T; ASSUMPCÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. 2. ed., São Paulo: Edgard Blücher, 1986.

OTERO, M. D. **Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides**. 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

PAN, L.X.; YANG, D.F.; SHAO, L.; LI, W.; CHEN, G.G.; LIANG, Z.Q. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, p. 215–220, 2009.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 43 – 49, 2002.

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

PRATAS, M. J.; FREITAS, S. V. D.; OLIVEIRA, M. B.; MONTEIRO, S. C.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P. Biodiesel density: Experimental measurements and prediction models. **Energy & Fuels**, v. 25, p. 2333 – 2340, 2011.

PINZI, S.; GARCIA, I.L.; LOPEZ-GIMENEZ, F.J.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; DORADO, G.; DORADO, M.P. The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: A review of social, economical and technical implications. **Energy & Fuels**, v.23, p. 2325 – 2341, 2009.

POLI, J.S.; SILVA, M.A.N.; SIQUEIRA, E.P.; PASA, V.M.D.; ROSA, C.A.; VALENTE, P. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: a potential feedstock for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 320-326, 2014.

RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; LEONARDI, A.; BIANCHI, M.M.; RINALDI, T.; AMARETTI, A. Getting lipids from glycerol: New perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. **Microbial CellFactory**, v. 13:83, p. 1-11, 2014.

RYWINSKA, A.; JUSZCZYK, P.; WOJTATOWICZ, M.; ROBAK, M.; LAZAR, Z.; TOMASZEWSKA, L.; RYMOWICZ, W. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. **Biomass&Bioenergy**, v. 48, p. 148-166, 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª. Ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Família Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROGUE, T. T.; BOURTOOM, T. Efficient concomitant production of lipid and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 23-33, 2011.

SANTOS, O. E. **Aproveitamento do glicerol gerado na síntese de biodiesel para produção de biomassa de leveduras**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) –Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

SANTOS, E.O.; MICHELON, M.; GALLAS, J.A.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. Raw glycerol as substrate for the production of yeast biomass. **International Journal of Food Engineering**, v. 9, p. 413-420, 2013.

SCHNEIDER, T.; GRAEFF- HONNINGER, S.; FRENCH, W.T.; HERNANDEZ, R.; MERKT, N.; CLAUPEIN, W.; HETRICK, M.; PHAM, P. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, v. 61, p. 34 -43, 2013.

SEO, Y.H; LEE, I.G.; HAN, J. I. Cultivation and lipid production of yeast *Cryptococcus curvatus* using pretreated waste active sludge supernatant. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 304 -308, 2013.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v.27, p. 30-39, 2009.

SILVA, C.M.; BORBA, T.M.;BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M.Carotenoid production by *Phaffiarhodozyma* using raw glycerol as an additional carbon source. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 4, Article 18, p. 1-17, 2012.

SPIER, F. **Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto gerado na síntese de biodiesel**. 2014. 190 f.Tese. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

SPIER, F.; BUFFON, J. G.; BURKERT, C. A. V. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: Lipid content and fatty acid profile of biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v.55, p. 415 – 422, 2015.

SUBRAMANIAM, R.; DUFRECHE, S.; ZAPPI, M.; BAJPAI, R. Microbial lipids from renewable resources: Production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, p. 1271 – 1287, 2010.

TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, L.; CIANI, M. Screening of yeasts for grow thon crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 488 – 495, 2012.

TAKAHASHI, N. S. **Importância dos ácidos graxos essenciais**. 2005.Disponível em: <http://www.pesca.sp.gov.br>. Acesso em: 15 de ago.2016, 16:30.

TAN, H. W.; ABDUL AZIS, A. R.; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 118 – 127, 2013.

TASKIN, M.; ORTUCU, S.; AYDOGAN, M. N.; ARSLAN, N. P. Lipid production from sugar beet molasses under now-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. **Renewable Energy**, v. 99, p. 198 – 204, 2016.

THOMPSON, C. J.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 261 - 265, 2006.

TSIGIE, Y. A.; WANG, C. Y.; TRUONG, C. T.; JU, Y. H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9216 – 9222, 2011.

RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUES-RODRÍGUES, J. E.; JARAMILLO-JACOB, A. R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**, v. 91, p. 102 – 111, 2012.

VERMA, S.; BAIQ, R. B. N.; NADAGOUDA, M. N.; VARMA, R. S. Visible light mediated upgrading of biomass to biofuel. **Green Chemistry**, v. 18, p. 1327 – 1331, 2016.

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

ZHANG, G.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; ALLEY, E.; PARASCHIVESCU, M. Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, p. 734 – 740, 2011b.

ZHANG, X.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Fermentation of glycerol to succinate by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 2397 – 2401, 2010.

ZHAO, X.; KONG, X.; HUA, Y.; FENG, B.; ZHAO, Z. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 405 – 412, 2008.

ZHAO, X.; HU, C.; WU, S.; SHEN, H.; ZHAO, Z. K. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 627 – 632, 2011.

ZHOU, W.; WANG, W.; LI, Y.; ZHANG, Y. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y2 in bioethanol wastewater and evaluation of biomass energetic yield. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 435 – 440, 2013.

WANG, Q.; GUO, F. J.; RONG, Y. J.; CHI, Z. M. Lipid production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodospiridium toruloides* 21167 for biodiesel making. **Renewable Energy**, v. 46, p. 164 – 168, 2012.

WILD, R.; PATIL, S.; POPOVIC, M.; ZAPPI, M.; DUFRECHE, S.; BAJPAI, R. Lipids from *Lipomyces starkeyi*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 329–335, 2010.

YANG, X.; JIN, G.; GONG, Z.; SHEN, H.; SONG, Y.; BAI, F.; ZHAO, K. Z. Simultaneous utilization of glucose and mannose from spent yeast cell mass for lipid production by *Lipomyces starkeyi*. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 383–387, 2014.

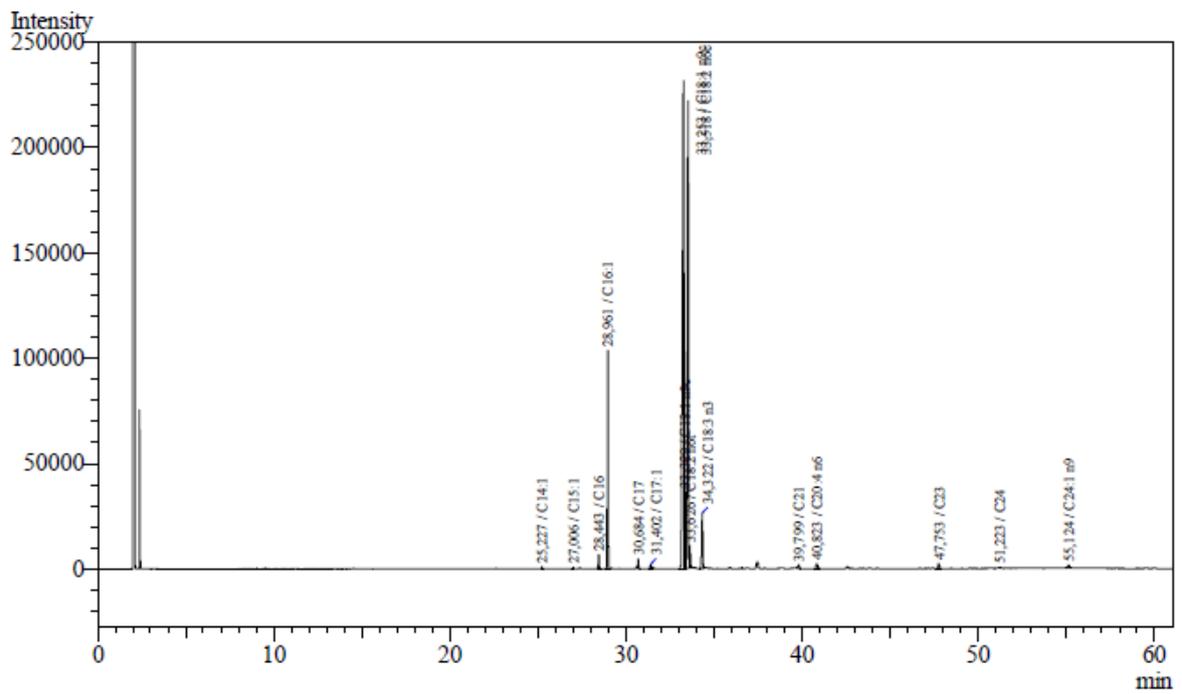
YU, X.; ZHENG, Y.; XIONG, X.; CHEN, S. Co-utilization of glucose, xylose and cellobiose by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. **Biomass & Bioenergy**, v. 71, p. 340-349, 2014.

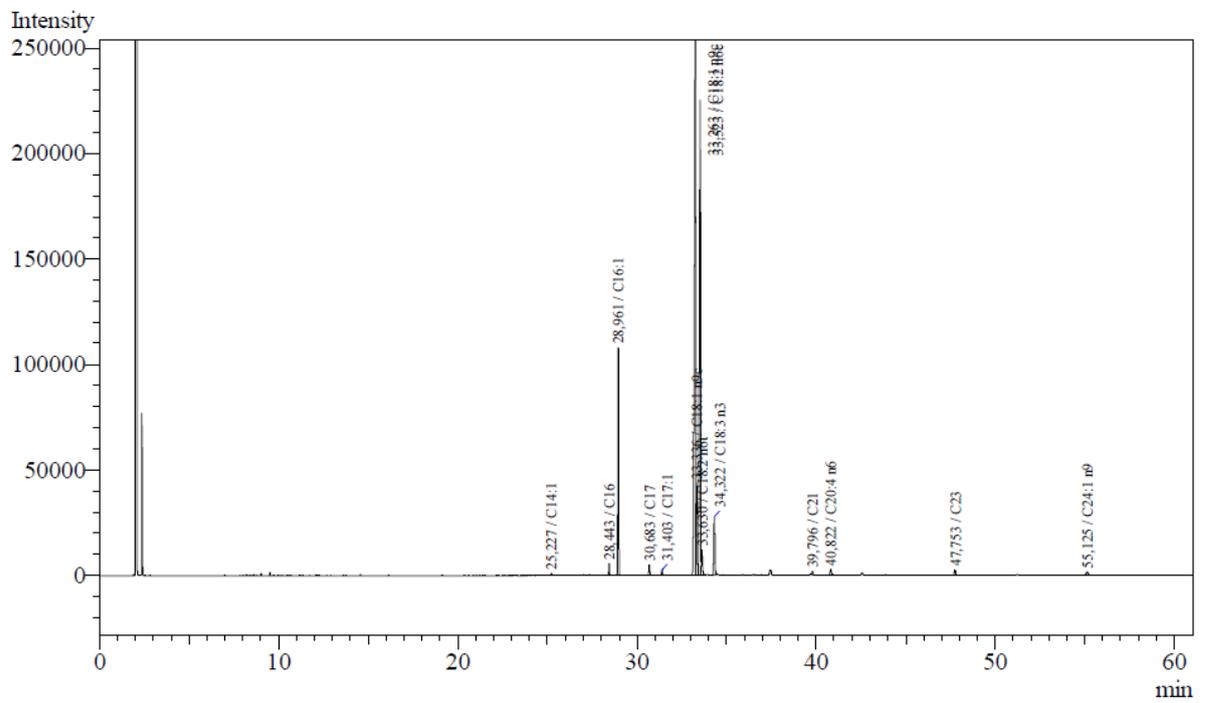
YU, X.; ZHENG, Y.; DORGAN, K. M.; CHEN, S. Oil production by oleaginous yeast using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6134 – 6140, 2011.

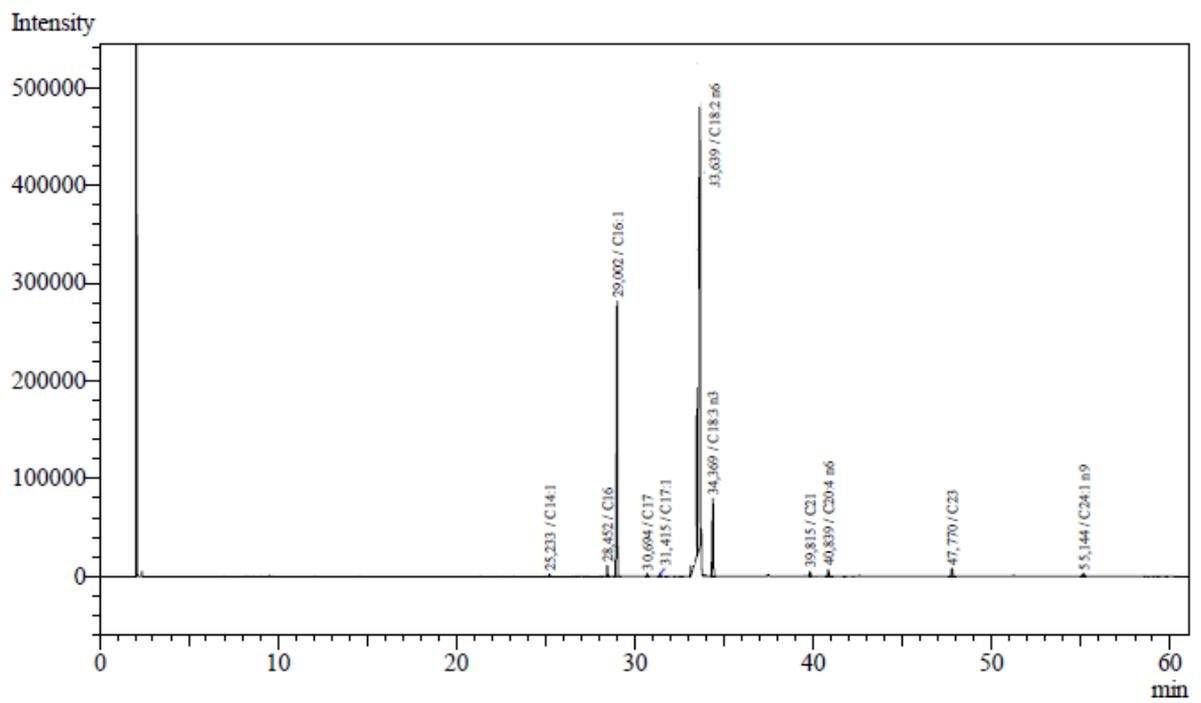
YKEMA, A.; VERBREE, E. C.; KATER, M. M.; SMIT, H. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in whey permeate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 211- 218, 1988.

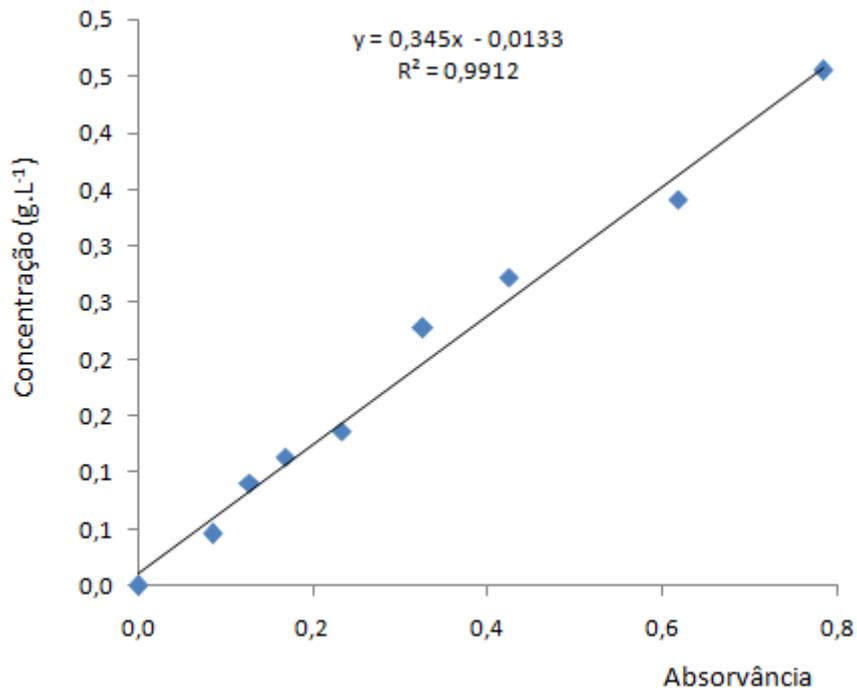
APÊNDICE

APÊNDICE A – Cromatograma do perfil de ácidos graxos obtido para o Ensaio 1



APÊNDICE B – Cromatograma do perfil de ácidos graxos obtido para o Ensaio 2

APÊNDICE C – Cromatograma do perfil de ácidosgraxos obtido para o Ensaio 3

APÊNDICE D - Curva padrão para a levedura *Meyerozyma guilliermondii*.

ANEXO



Produto:	Número do Lote:	Data de Carregamento:
9-GLICERINA BRUTA	890000001475	

Item Analítico	Unidade	Resultado	Especificação (1)		Métodos
			Min	Máx	
Umidade	% (m)	11.380	-	13.000	AOCS Ca 2e-84
Glicerol	% (m)	82.090	80.000	-	Official Mon.XXI
Cinza	% (m)	5.940	-	8.000	Official Mon.XXI
Cloretos	% (m)	6.280	-	7.000	Método de Mohr
pH		5.140	4.500	9.000	-
MONG	% (m)	0.590	-	2.000	Cálculo

ANEXO 1: Laudo analítico do glicerol residual proveniente da BS BIOS.