



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

ADRIANA FERREIRA DE SOUZA

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOEMULSIFICANTE E LIPÍDEOS POR
Candida lipolytica UCP 0988 UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

**RECIFE
2016**

ADRIANA FERREIRA DE SOUZA

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOEMULSIFICANTE E LIPÍDEOS POR
Candida lipolytica UCP 0988 UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.
Área de Interesse: Fungos de Interesse Industrial

Orientador: Dra. Norma Buarque Gusmão

Co-orientador: Dra. Galba Maria de Campos-Takaki

RECIFE
2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Souza, Adriana Ferreira de

Produção simultânea de bioemulsificante e lipídeos por *Candida lipolytica* UCP 0988 utilizando substratos agroindustriais / Adriana Ferreira de Souza. – Recife: O Autor, 2016.

62 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Norma Buarque Gusmão

Coorientadora: Galba Maria de Campos- Takaki

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2016.

Inclui referências

1. Cândida 2. Biodiesel 3. Lípidios I. Gusmão, Norma Buarque (orient.)
II. Campos-Takaki, Galba Maria de (coorient.) III. Título

579.562

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-308

ADRIANA FERREIRA DE SOUZA

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOEMULSIFICANTE E LIPÍDEOS POR
Candida lipolytica UCP 0988 UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 08/04/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão
Departamento de Antibióticos/UFPE

Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco
Departamento de Ciências Biológicas - UFRPE

Prof. Dr. André Luiz Cabral Monteiro Azevedo Santiago
Departamento de Micologia - UFPE

DEDICATÓRIA

*Dedico esta Dissertação,
aos meus pais, Egnalva F. da Silva
e Luiz G. de Souza, a minha pequenina filha Sophia,
ao meu esposo Gilberto V. da Silva Filho e aos meus irmãos,
pelo apoio, incentivo e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente a Deus pela saúde, sabedoria e discernimento concedido.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Norma Buarque Gusmão pelo carinho, força e ajuda indispensável para a construção deste trabalho de forma profissional.

A minha incentivadora co-orientadora Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki pela sabedoria, paciência, exigências com a organização e execução dos experimentos e oportunidades a mim concedidas.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubem de Ferreira, pelo acesso aos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) , pela oportunidade e uso da infra-estrutura para a realização dos experimentos.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação de Biologia de Fungos e Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, pelo companheirismo e apoio, em especial, Hugo Marques Galindo, Isabela Janne da Silva, Daniele Souza, Daylin Rubio, Dayana Montero, Davi Cavalcanti, Hamilton Nóbrega, Nadiely Regina Andrade, José Henrique Souza Freitas e Flávio Bomfim pelos momentos de descontração. E as amigas Geiza Lima e Elaynne Montarroyos que contribuíram com palavras de conforto e torcida.

Aos professores da Pós-graduação de Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, em especial a Profa. Dra. Cristina Souza-Motta, a Profa. Dra. Oliane Correia Margalhães, o Prof. Dr. Bruno Severo Gomes, a Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira, a Profa. Dra. Rejane Pereira Neves, Prof. Phd. Armando Marsden e ao Prof. Dr. André Santiago, assim como os professores do Departamento de Ciências Biológicas e Saúde da Universidade Católica de Pernambuco, Profa. Dra. Kaoru Okada, Profa. Dra. Aline Elesbão e Prof. Dr. Carlos Alves pelos ensinamentos e apoio.

Ao meu querido amigo Marcos Antônio Cavalcanti Luna e Manoela Cristina Mota Lins por toda amizade, paciência, ensinamentos e força oferecidos durante a vida acadêmica.

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pela concessão da bolsa e pelo fomento à pesquisa, para realização deste trabalho.

A todos direta e indiretamente, meu muito obrigado.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas, o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que apresentam na molécula uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, com potencial de redução da tensão superficial da água e ou emulsificação, sendo estes denominados de bioemulsificantes. Os micro-organismos que apresentam habilidade de acumular a partir de 20% em relação ao seu peso seco, são denominados oleaginosos, considerados como fontes promissoras para a produção de biodiesel. Neste sentido, estudos foram realizados com a *Candida lipolytica* UCP0988, no estado anamorfo, investigando a produção simultânea de bioemulsificante e lipídeos, empregando como substratos alternativos óleo de soja pós-fritura e milhocina, utilizando um planejamento fatorial de 2². O cultivo foi realizado em Erlenmeyers contendo 100 mL do meio de produção de acordo com o planejamento, com 1% de inóculo de 10⁷ cel/mL, incubados a 28°C, 150 rpm por 96h. O bioemulsificante foi produzido no líquido metabólico livre de células, avaliado pela atividade e índice de emulsificação, caracterizado pelo tamanho das partículas, estabilidade com relação à diferentes pH, NaCl e altas temperaturas, teste de deslocamento de óleo (ODA) e aplicação na remoção de poluente hidrofóbico. Da biomassa obtida foi avaliada a acumulação de lipídeos, seguido a extração, transesterificação e caracterização dos ácidos graxos por cromatografia gasosa. Os resultados demonstraram que o bioemulsificante foi produzido no final da fase exponencial com 6,704 Unidades de atividade de emulsificação (UAE) em hexadecano e índice de emulsificação de 96,66% com o óleo queimado de motor na condição 4 do planejamento (milhocina 5% e óleo de soja pós-fritura 8%), com a formação de emulsão estável em todas as temperaturas, em pH 2 e 4 com 2% de salinidade e capacidade de remover 93,74% do óleo diesel. Além disso, o bioemulsificante demonstrou propriedade dispersante após o deslocamento de 45,34 cm² do óleo na condição do ponto central do planejamento. A biomassa de *C. lipolytica* mostrou acúmulo de lipídios observado por citoquímica, obteve 42,00% de lipídios totais e sendo 96,7% deles correspondentes a ésteres metílicos de ácidos graxos. A *Candida lipolytica* apresentou boa produção de bioemulsificante e biodiesel usando conversão metabólica dos resíduos agroindustriais, tornando o bioprocessamento econômico e com grande potencial na aplicação biotecnológica.

Palavras chave: biossurfactante, biodiesel, emulsão, levedura oleaginosa.

ABSTRACT

Biosurfactants are compounds produced by bacteria, yeasts and filamentous fungi, which have in the molecule a hydrophobic portion and one hydrophilic, with a potential for reducing the surface tension of water and/or emulsification, these being called bioemulsifiers. However, some microorganisms having ability to accumulate 20% or more of lipids in relation to its dry weight are called oleaginous, considered as main sources for production of biodiesel. In this respect, studies have been carried out with the yeast *Candida lipolytica* UCP0988, at anamorph state, investigating the simultaneous production of bioemulsifier and lipids, using as alternative substrates post-frying soybean oil and corn steep liquor, employing a 2² factorial design. Cultivation was carried out in Erlenmeyer flasks containing 100 mL of the production medium according the experimental design, with 1% inoculum (10⁷ cells/mL), incubated at 28°C, 150 rpm for 96h. The bioemulsifier was produced in the cell-free metabolic liquid, assessed the emulsifying activity and index, characterized by particle size, stability against pH, NaCl and temperature, oil displacement test (ODA) and application to removal hydrophobic pollutant. Accumulation of lipids was evaluated from the biomass, followed by extraction and characterization of fatty acids by gas chromatography. The results showed that the bioemulsifier was produced in the late exponential phase with 6.704 units of emulsification activity (UEA) and index de 96,66% at condition 4 of factorial design (corn steep liquor 5% and post-frying soybean oil 8%), stable emulsion in all temperatures, at pH 2 and 4 and 2% salinity were formed, and ability to removing 93,74% of diesel oil in sand. The results with displacement oil showed 45.34 cm² of dispersion (central point of the design). The biomass of *C. lipolytica* showed lipid accumulation observed by Sudan Black staining technique, which 42% of total lipids, and 96.70% of them corresponding to fatty acids methyl esters. *C. lipolytica* demonstrated the ability to produce both bioemulsifier and lipids using metabolic conversion of corn steep liquor and post-frying soybean oil agroindustrials residues, making economic bioprocess and with great application potential to environmental biotechnology.

Key-words: biosurfactant, biodiesel, emulsion, oleaginous yeast

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Característica anfifílica do emulsificante	9
Figura 2. Fases da emulsão	10
Figura 3. Atividade do emulsificante iônico O/A (A) e atividade do emulsificante não-iônico A/O (B).....	10
Figura 4. Reação de transesterificação de triglicerídeos.....	20
Figura 5. Efeito das concentrações da adição do biodiesel ao diesel na redução de emissões de gases.....	23
Figura 6. Macroscopia: Colônia de <i>Candida lipolytica</i> de aspecto úmido (A); Microscopia (visualização: 40x): presença de células leveduriformes e pseudohifas de <i>Candida lipolytica</i> (B); Macroscopia: Colônia de <i>C. lipolytica</i> cotonosa (C); Microscopia (visualização: 40x): pseudohifas e hifas verdadeiras de <i>Candida lipolytica</i> (D)	27
Figura 7. Diagrama de Pareto para avaliação da influência das variáveis milhocina (1) e óleo de sBS: oja residual (2) sobre a variável resposta atividade emulsificante por <i>Candida lipolytica</i> . Puro Erro=0,0044776	36
Figura 8. Gráfico mostrando efeitos médios da interação das duas vias de interação na produção de bioemulsificante	37
Figura 9 Diâmetro das gotas das emulsões formadas com o bioemulsificante de acordo com o tempo de produção.....	39
Figura 10. Índice de emulsificação do bioemulsificante produzido utilizando óleo de motor variando: pH, NaCl e temperatura.....	41
Figura 11. Diagrama de Pareto para avaliação da influência das variáveis milhocina e óleo de soja residual sobre a variável resposta produção de biomassa por <i>Candida lipolytica</i> . Puro Erro=0,1691663.....	45
Figura 12 . Coloração das células em Sudan Black entre 0 a 96h de cultivo em milhocina com 5% e 8% de óleo de soja residual (ensaio 4).....	47
Figura 13. Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2 ² em cultivo de 96h, tendo como variáveis independentes (1) Milhocina, (2) óleo de soja residual, e como variável resposta lipídeos totais. Puro erro = 0,018425.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial para produção simultânea do bioemulsificante e lipídeos por <i>Candida lipolytica</i>	33
Tabela 2. Resultados da produção de bioemulsificante por <i>C. lipolytica</i> de acordo com o planejamento fatorial	35
Tabela 3 Caracterização macro e microscópica de emulsões formadas em óleo de motor queimado do bioemulsificante.	40
Tabela 4. Dispersão em óleo de motor (derivado de petróleo) em água do mar..	43
Tabela 5. Produção de biomassa e lipídeos totais obtida através do planejamento fatorial 2 ²	44
Tabela 6. Porcentagem de nitrogênio, carbono, hidrogênio e enxofre presentes na milhocina e óleo residual de soja	45
Tabela 7 Perfil de ácidos graxos produzidos por <i>Candida lipolytica</i> no ensaio 4 em 96h	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.2. OBJETIVOS	8
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1. EMULSIFICANTES	9
2.2. PROPRIEDADES E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO BIOEMULSIFICANTE	11
2.3. BIOEMULSIFICANTES PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS	13
2.4. LIPÍDEOS E MICRO-ORGANISMOS OLEAGINOSOS	14
2.4.1. BIOSÍNTESE DOS LIPÍDEOS EM MICRO-ORGANISMOS	15
2.4.2. FUNGOS OLEAGINOSOS	17
2.4.3. APLICAÇÃO DE ÓLEOS MICROBIANOS	18
2.5. BODIESEL	19
2.5.1. USO DE BODIESEL NO BRASIL	21
2.6. RESÍDUOS AGROÍNDUSTRIAS E SUA APLICAÇÃO COMO SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE E LIPÍDEOS	24
2.7. <i>Candida lipolytica</i>	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. MICRO-ORGANISMO	29
3.2. SUBSTRATOS	29
3.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO	29
3.4. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOMULSIFICANTE	29
3.5. ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS EMULSÕES	30
3.6. ESTABILIDADE DO BIOEMULSIFICANTE AVALIADA PELO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO	30
3.7. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOEMULSIFICANTE	30
3.8. TESTE DE DESLOCAMENTO DO ÓLEO EM ÁGUA DO MAR	31
3.9. POTENCIAL DO BIOEMULSIFICANTE NA BIORREMEDIAÇÃO	31
3.10. AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DA BIOMASSA	32
3.11. ANÁLISE CITOQUÍMICA DOS LIPÍDEOS	32
3.12. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS LIPÍDEOS TOTAIS	32
3.13. IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA BIOMASSA	32
3.14. TRANSESTERIFICAÇÃO/ESTERIFICAÇÃO DIRETA DA BIOMASSA EM BODIESEL	33
3.15. PLANEJAMENTO FATORIAL	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE POR <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS	34
4.2. CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DA EMULSÃO	38
4.3. ESTABILIDADE DO BIOEMULSIFICANTE	41
4.4. CARACTERIZAÇÃO DO BIOEMULSIFICANTE	42
4.5. POTENCIAL DO BIOEMULSIFICANTE NO DESLOCAMENTO DE COMPOSTO HIDROFÓBICO EM ÁGUA DO MAR	42
4.6. APLICAÇÃO DO BIEMULSIFICANTE NA REMOÇÃO DE COMPOSTO HIDROFÓBICO	43
4.7. PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS TOTAIS NOS RESÍDUOS AGROÍNDUSTRIAS	44
4.8. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDEOS TOTAIS	49

4.9. TRANSESTERIFICAÇÃO/ESTERIFICAÇÃO DIRETA DA BIOMASSA..	51
5. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial, além de formar emulsões (JANEK et al., 2012; UZOIGWE et al., 2015). Segundo a Acmite (2013), espera-se que o mercado mundial de surfactantes cresça 4,2% ao ano entre 2012 e 2020, sendo a China, a África e a América Latina as principais regiões/ países que devem contribuir para o crescimento. No Brasil o mercado de surfactantes é crescente, em 2012 esse mercado alcançou 1,5 bilhões de dólares. A expectativa é que o número de vendas de surfactantes alcance 2,1 bilhões de dólares em 2018, com taxa de crescimento de 5,3% ao ano, entre 2012 e 2018 (FROST e SULLIVAN, 2013; IHS 2013)

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo, porém com o aumento da preocupação ambiental, por parte dos consumidores e novas legislações ambientais, têm levado à busca de surfactantes naturais, por apresentarem baixa toxicidade, serem biodegradáveis e oriundos de fontes renováveis, tornando-se alternativa aos produtos existentes, que atualmente são utilizados em alimentos, cosméticos e para aplicação ambiental (JANEK et al., 2012)

Vários micro-organismos sintetizam para o meio extracelular compostos anfifílicos, como biossurfactantes e/ou bioemulsificantes, apresentando diversas vantagens sobre os sintéticos, considerando as propriedades funcionais, que incluem emulsificação, de-mulsificação, separação, solubilização e redução da tensão superficial (RANDHAWA, 2014).

Segundo Ratledge et al. (2004), os micro-organismos oleaginosos são definidos como aqueles capazes de acumular lipídios acima de 20% de sua biomassa. Neste sentido, várias leveduras e fungos filamentosos são considerados oleaginosos, uma vez que têm a capacidade de sintetizar e acumular até 70% do peso da biomassa em triacilglicerol (TAG). Por outro lado, TAG produzido podem apresentar composição química e valores energéticos semelhantes aos óleos vegetais e animais (ROSSI et al., 2011).

A *Candida lipolytica* é uma levedura considerada oleaginosa por acumular cerca de 40% de lipídeos intracelulares. Apresenta a capacidade de crescer sobre uma ampla variedade de substratos hidrofóbicos, devido a um processo de adaptação pela evolução de genes que codificam agentes tensoativos (biossurfactantes) que

atuam como detergentes e auxiliam na disponibilidade destes substratos insolúveis, através da formação de emulsões (BEOLPOULOS *et al.*, 2011).

Os lipídeos produzidos por esse micro-organismo têm composição química e valores energéticos semelhantes aos óleos vegetais e animais, sendo uma fonte alternativa para produção de biodiesel (ROSSI *et al.*, 2011; SITEPU *et al.*, 2014).

É importante destacar a possibilidade da utilização de fungos oleaginosos na produção de biodiesel, considerando as vantagens em relação aos recursos convencionais, em especial, a facilidade de cultivo em biorreatores, o curto ciclo de vida desses micro-organismos, o crescimento rápido, além do fato de não necessitarem de muito espaço, além da fácil manipulação e habilidade dos mesmos em utilizar uma grande variedade de substratos (KHOT *et al.*, 2012).

Assim, a produção de metabólitos secundários por *Candida lipolytica*, em especial, bioemulsificante e lipídeos, surgem como uma alternativa promissora e sustentada pelo uso de resíduos agroindustriais, possibilitando o desenvolvimento, inovação e geração de tecnologia, em atendimento às demandas de biodetergentes e biocombustíveis de 3ª geração.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Definir a melhor concentração dos substratos agroindustriais no cultivo da *Candida lipolytica* UCP (0988) para a máxima produção conjunta de bioemulsificante e lipídeos totais.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar a melhor concentração dos substratos alternativos na produção do bioemulsificante por *Candida lipolytica*
- Caracterizar o bioemulsificante com relação estabilidade à diferentes PH, concentrações de NaCl e a altas temperaturas;
- Caracterizar físico-quimicamente o bioemulsificante;
- Avaliar o potencial dispersante do bioemulsificante;
- Avaliar o potencial do bioemulsificante na remoção de contaminante hidrofóbico;
- Investigar e selecionar a melhor condição de produção de lipídeos da biomassa;

- Caracterizar o perfil de ácidos graxos dos lipídeos produzidos;
- Produzir ácidos metílicos de ácidos graxos por transesterificação da biomassa;
- Validar os resultados obtidos estatisticamente do processo de bioemulsificação e produção de lipídeos.

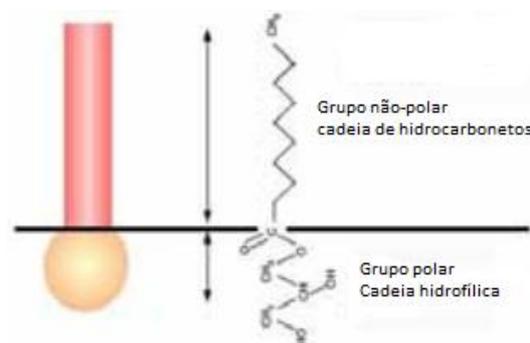
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. EMULSIFICANTES

O mercado global de emulsificante está destinado a atingir 2,3 milhões de toneladas em 2016, devido ao uso considerável de emulsificantes em alimentos e bebidas, e pelo uso crescente em produtos de cosméticos. Os avanços tecnológicos na indústria de processamento de alimentos também vêm impulsionado o crescimento da utilização desse produto (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Todos os emulsificantes são moléculas anfifílicas (Figura 1), ou seja, a mesma molécula possui uma porção polar, solúvel em água, também chamada de porção hidrofílica, e uma porção apolar, insolúvel em água, também chamada de lipofílica ou hidrofóbica (Figura 1). Em função dessas características, os emulsificantes reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo que elas se misturem formando a emulsão (CERQUEIRA e COSTA, 2009; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

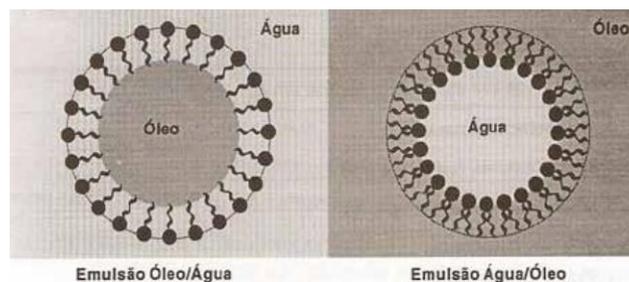
Figura 1. Característica anfifílica do emulsificante



Fonte: FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013

Os emulsificantes são classificados de acordo com a distribuição de suas fases. A figura 2. demonstra as fases da emulsão.

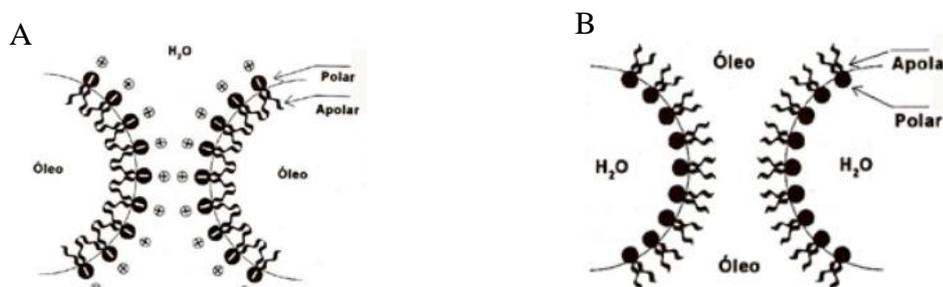
Figura 2. Fases da emulsão



Fonte: FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013

Eles também são classificados pela carga, sendo os emulsificantes iônicos responsáveis por estabilizarem emulsões do tipo óleo/água (Figura 3 A). Na interface, o grupo alquila interage com as gotículas de óleo, enquanto os grupos finais carregados se projetam para a fase aquosa. O envolvimento de íons contrários forma uma camada dupla, que previne a agregação das gotículas do óleo. Os emulsificantes não iônicos são orientados na superfície das gotículas do óleo com a proporção polar projetada para a fase aquosa (Figura 3 B) (TADROS, 2013).

Figura 3. Atividade do emulsificante iônico O/A (A) e atividade do emulsificante não-iônico A/O (B)



Fonte: INGREDIENTS BRASIL, 2013

Segundo Tadros *et al.*, (2013) a estrutura das emulsões também é uma forma de classificar o sistema:

1. O/A (óleo/água) e A/O (água/óleo)/ macro-emulsões: normalmente possuem uma faixa de tamanho de 0,1 - 5 μ m com uma média de 1-2 μ m.
2. Nano-emulsões: geralmente apresentam muitos tamanhos de 20-100 nm. Igualmente as macro-emulsões, eles são apenas cineticamente estáveis.

3. Emulsões ou micro-emulsões micelares: estes geralmente possuem uma faixa de tamanho de 5-50 nm. Eles são termodinamicamente estáveis.
4. Duplas e múltiplas emulsões: são emulsões-de-emulsões, A/O/A.
5. Emulsões mistas: sistema constituído por duas gotas de dispersantes diferentes que não se misturam de uma forma continua.

2.2. PROPRIEDADES E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO BIOEMULSIFICANTE

Bioemulsificantes de origem microbiana apresentam várias vantagens sobre os emulsificantes sintéticos. A sua biodegradabilidade é uma das propriedades mais importantes, porque evita problemas de toxicidade e acumulação nos ecossistemas naturais, além disso, apresentam alta atividades a uma ampla faixa de pH, em temperaturas extremas e altas variações de salinidade (SINGH *et al.*, 2007, COLIN *et al.*, 2013; SEKHON-RANDHAWA, 2014).

Os bioemulsificantes são moléculas de alto peso molecular capazes de formar e estabilizar emulsões, mas isso não implica na redução da superfície superficial, como os biossurfactantes, são representados pelos exopolissacarídeos, podendo ser misturas complexas de heteropolissacarídeos e lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas (SEKHON-RANDHAWA, 2014; UZOIGWE *et al.* 2015). Os biossurfactantes, diferentemente dos bioemulsificantes são representados por compostos de baixo peso molecular, representados por lipopeptídeos, glicolípídeos e entre outros (SMYTH *et al.*, 2010; FRANZETTI *et al.*, 2012).

Os bioemulsificantes são menos eficazes na redução da tensão superficial (UZOIGWE *et al.*, 2015), portanto métodos como medição de superfície e tensão interfacial, colapso de gota e testes de hemólise não são suficientes para a identificação e diferenciação de bioemulsificante e de biossurfactantes, ocasionando o descarte de bioemulsificante por não apresentarem alterações significativas da tensão superficial. (ELLAIAH *et al.*, 2002; SATPUTE *et al.*, 2008; UZOIGWE *et al.*, 2015). Jagtap *et al.*, (2010) indicam os métodos de Índice de emulsificação (E24) e/ou atividade de emulsificação para medir a capacidade de emulsificação de qualquer molécula ativa com diversos substratos hidrofóbicos. Estas propriedades o tornam de grande importância no setor ambiental e agrícola e nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e petroquímica

Os bioemulsificantes podem ser potencialmente aplicados na recuperação aprimorada de petróleo, perfuração de petróleo bruto, processamento de alimentos e formulações cosméticas (COLIN *et al.*, 2013). A aplicação de bioemulsificante no

campo da biorremediação mostra-se promissora, diante dos resultados de estudos até á data (FRANZETTI *et al.*, 2011; FRANZETTI *et al.*, 2012, SOUZA *et al.*, 2012). A capacidade de formação e estabilidade de emulsões entre hidrocarbonetos e misturas de água, facilitam a disponibilidade desses contaminantes no ambiente aquático para os micro-organismos que metabolizam esses compostos hidrofóbicos, além disso, são eficientes pelo método de lavagem na remoção de hidrocarbonetos em solos e sedimentos contaminados (FRANZETTI *et al.*, 2011)

Os bioemulsificantes também têm sido eficientes na biorremediação de metais pesados, que tendem a ser fortemente absorvidos na matriz de solos e sedimentos, limitando sua solubilidade e dificultando a sua remoção subsequente (GUTIERREZ *et al.*, 2008; COLIN *et al.*, 2013). Portanto, o método de lavagem com bioemulsificantes aumenta a dessorção de metais em solos e sedimentos, tornando esses poluentes para a captação microbiana, que são degradados em produtos inócuos (ANISZEWSKI *et al.*, 2010; BANAT *et al.*, 2010; AÇIKEL 2011, COLIN *et al.*, 2013).

Na indústria alimentícia, os bioemulsificantes são de grande interesse, como aditivo alimentício, contribuindo com numerosos papéis funcionais, como:

- Equilibrar as variações na qualidade das farinhas;
- Melhorar a consistência dos ingredientes;
- Preservar o frescor e as características sensoriais;
- Aumentar a velocidade de transformação;
- Melhorar a estabilidade das massas;
- Promover a aeração e o ganho de volume de pães e bolos;
- Diminuir o consumo de ovos e gorduras;
- Aumentar o rendimento do processo;
- Retardar o envelhecimento (aumento da vida de prateleira);
- Melhorar a textura e cremosidade de produtos lácteos (CASTRO *et al.*, 2012;

NETA *et al.*, 2012; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013; HEYMAN *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2015)

Estudos relatam formulações alimentares envolvendo nanoemulsões e emulsões por bioemulsificantes (SAMAVATI *et al.*, 2014; ADJONU *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2015).

2.3 BIOEMULSIFICANTES PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS

Muitos micro-organismos tem a capacidade de produzir compostos anfifílicos, como biossurfactantes e bioemulsificantes, que exibem atividades de superfície e interfacial, formação de micelas e macro e micro-emulsões entre líquidos de fases imiscíveis (CHEN *et al.*, 2010; PENFOLD *et al.*, 2011; FRANZETTI *et al.*, 2012).

Satpute *et al.*, (2008) e Satpute *et al.*, (2010), investigaram micro-organismos marinhos que apresentavam a capacidade de produzir biossurfactante e bioemulsificante, dentre esses micro-organismos foram identificados vários gêneros de bactérias: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Enterobacter*, e leveduras, entre os 56 isolados, 35 produziram bioemulsificante e apenas 16 produziram biossurfactantes.

Um bioemulsificante mais comercializado e disponível no mercado, é o emulsan, patenteado por Gutnick *et al.* (1980), um lipopolissacarídeo extracelular associado a proteína produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ATCC 31012, com alto peso molecular (em torno de 1000 kDa), não reduz a tensão interfacial, protege as gotas de óleo da coalescência e um forte estabilizante de emulsão (ROSENBERG *et al.*, 1979; CHAMAKH *et al.*, 2008; SUTHAR *et al.*, 2008).

Há outros bioemulsificantes com alto peso molecular, como o alasan, um complexo aniônico, composto por um polissacarídeo e uma proteína, isolado da bactéria *Acinetobacter radioresistens* (NAVON-VENEZIA *et al.*, 1995). O gênero *Streptomyces* sp. produz um bioemulsificante composto de proteína (82%), açúcar (1%) e polissacarídeo (17%), que apresenta alta atividade emulsificante e atividade superficial (KOKARE *et al.*, 2007).

Fungos unicelulares também são conhecidos como produtores de bioemulsificantes, como o liposan, produzido pela levedura *Candida lipolytica* e mannan produzida pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BANAT *et al.*, 2010). O bioemulsificante produzido por *Candida utilis*, por exemplo, tem sido utilizado em molhos prontos para salada (SHEPHORD *et al.*, 1995; NITSCHKE & PASTORE, 2010).

2.4. LIPÍDEOS E MICRO-ORGANISMOS OLEAGINOSOS

Os lipídeos são moléculas biológicas, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, como clorofórmio, metanol entre outros. São incluídos em duas categorias básicas:

- Moléculas derivadas de unidades de isopreno, como esteróis e carotenoides;
- Ácidos graxos e as moléculas relacionadas de cadeia longa, como alcanos e alcenos (SITEPU *et al.*, 2014).

Os lipídeos microbianos são compostos principalmente por triacilgliceróis (TAGs), quantidades insignificantes de ácidos graxos livres, outros lipídios neutros (monoacilgliceróis, diacilgliceróis e éster de estero), esteróis e frações de lipídeos polares (fosfolipídios, esfingolipídios e glicolipídios) (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011; SITEPU *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, os óleos microbianos têm apresentado interesse para vários pesquisadores, devido às suas diversas aplicações, farmacêutica, alimentícia e, principalmente na utilização como biocombustíveis, em resposta ao aumento do preço do petróleo (VICENTE *et al.*, 2010; ROSSI *et al.*, 2012; SITEPU *et al.*, 2014, ZHAO *et al.*, 2015). Segundo Tsigie *et al.* (2011) e Sitepu *et al.* (2014), as espécies oleaginosas têm a possibilidade de servirem como produtores de óleo comercial destinado à alimentação ou a produção de fontes alternativas de biodiesel. Usualmente, os micro-organismos oleaginosos são aqueles que podem acumular mais de 20% de lipídios na sua biomassa, podendo atingir a capacidade de acumular até 70% durante o período de estresse metabólico (RATLEDGE, 2004; LIU & ZHAO, 2007).

Dentre das espécies de micro-organismos oleaginosos mais estudados estão às bactérias: *Arthobacter sp.*, *Bacillus alcalophilus*, *Gordona sp.* e *Rhodococcus opacus*, além de representantes de micro-algas, *Chlorella vulgaris*, *C. emersonii*, *C. protothecoides*, *C. sorokiniana*, *Nannocloropsis sp* e *Niczschia sp.* e como representantes das leveduras temos os gêneros: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospodium*, *Cryptococcus* e *Lypomyces* como representantes das leveduras e *Cunninghamella*, *Umbelopsis*, *Mortierella* e *Mucor* como representantes dos fungos filamentosos oleaginosos (ILLMAN *et al.*, 2000; CHISTI , 2006; ZHAO *et al.* 2008;

GOUDA *et al.*, 2008; ROSSI *et al.*, 2009; MENG *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2008; VICENTE *et al.* 2009; AGEITOS *et al.* 2011, ZHAO *et al.*, 2015).

Os lipídeos produzidos por micro-organismos apresentam composição e valor energético similares aos óleos vegetais e animais, além de que, comparado aos óleos provindos de animais à produção de lipídeos por micro-organismos tornam-se mais vantajosos economicamente, por não competirem por recursos alimentares, especialmente se as fontes nutricionais utilizadas como substrato para o crescimento do micro-organismo for uma fonte de carbono e nitrogênio de baixo custo. Em relação às plantas, a produção não está sujeita a variações climáticas e a ciclos sazonais, e requerem menor área de produção. Além disso, apresentam boa velocidade de geração, melhor controle da produção e do produto (ROSSI *et al.*, 2011; ATABANI *et al.*, 2012; SITEPU *et al.*, 2014).

Segundo Enshaeieh *et al.*, (2012) as leveduras são mais eficientes na produção de lipídeos, comparadas com outros micro-organismos. As microalgas são influenciadas pelo clima por serem fotoautotróficas, diferindo das leveduras que, além do seu crescimento não ser influenciado por este fator, podem ser cultivadas em fontes de baixo custo, e ainda apresentam crescimento maior do que as microalgas heterotróficas (CHI *et al.*, 2011). Os fungos unicelulares superam os fungos filamentosos por demonstrar em maior tolerância aos íons metálicos e aos baixos teores de oxigênio (BEOPOULOS *et al.*, 2010; AGEITOS *et al.*, 2011).

2.4.1. BIOSÍNTESE DOS LIPÍDEOS EM MICRO-ORGANISMOS

Os lipídeos intracelulares podem ser acumulados através de duas vias: síntese *de novo*, que envolve a produção propriamente dita, tendo a acetil-coenzima A (acetil – CoA) e malonil-CoA como os principais precursores, a partir de carboidratos não oleaginosos e sua via biossintética de armazenamento de lipídeos (via Kennedy) e, a via de acumulação *ex novo*, que envolve a captação de ácidos graxos, óleos e triacilglicerídeos (TAG) do meio de cultura e seu acúmulo em forma não-modificada ou modificada no interior da célula (BEOPOULOS *et al.*, 2012). A via acumulativa *ex novo* requer a hidrólise do substrato hidrofóbico, transporte dos ácidos graxos liberados dentro da célula, em que através destes são remontados em TAG e em frações de esterol éster (ES) gerando um acúmulo dentro dos corpos lipídicos (BEOPOULOS *et al.*, 2009).

O começo da acumulação lipídica, através da síntese de novo, é causada pela exaustão de um nutriente principal do meio de cultura. O nitrogênio é um dos principais reguladores da acumulação lipídica em micro-organismos eucarióticos. Quando a fonte de nitrogênio no meio de cultivo torna-se limitada, o organismo continua assimilando a fonte de carbono, porém, o crescimento celular é desfavorecido, já que a fonte de nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Sendo assim, a fonte de carbono em excesso é direcionada para a síntese de ácidos graxos, ocorrendo a acumulação de TAGs no interior da célula e a formação de corpos lipídicos (BEOPOULOS *et al.*, 2009).

Segundo Papanicolaou e Aggelis (2011) a acumulação de lipídios por micro-organismos oleaginosos está relacionado com a produção de ácido cítrico e a atividade da enzima isocitrato desidrogenase, enzima envolvida no Ciclo do Ácido Tricarboxílico ou Ciclo de Krebs. A enzima isocitrato desidrogenase é dependente de adenosina monofosfato (AMP). A AMP desaminase cliva AMP em IMP (inosina monofosfato) na ausência de nitrogênio proveniente do meio. O excessivo decréscimo da concentração de AMP intracelular altera as funções do Ciclo de Krebs. Com a alteração do ciclo, a isocitrato desidrogenase, enzima responsável pela transformação do ácido isocítrico em ácido α -cetoglutárico, perde sua atividade, visto que a mesma é ativada alostericamente por AMP intracelular. Então, o ácido isocítrico é acumulado dentro da mitocôndria e encontra-se em equilíbrio com o ácido cítrico (reação catalisada por isocitrato aconitase). Quando a concentração de ácido cítrico dentro da mitocôndria alcança valores críticos, ele é transportado para o citosol através do transporte citrato-malato, sendo clivado pela enzima ATP citrato liase (ACL) formando oxaloacetato e acetil-Co-enzima A. O acetilCoA, unidade básica da biossíntese de ácidos graxos, é o precursor da síntese lipídica *de novo* por micro-organismos oleaginosos (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011). Os genes que codificam a ACL não estão presentes nos organismos que não são considerados oleaginosos, como a levedura *S. cerevisiae* (RATLEDGE *et al.* 2002).

A via de acumulação de lipídios *ex novo* é ativada quando o micro-organismo cresce em meio contendo altas concentrações de substrato hidrofóbico. A degradação dos substratos hidrofóbicos encontrados no meio de cultura induz várias modificações do substrato, a fim de melhorar o acesso da célula à fonte de carbono. A degradação de material hidrofóbico por *Yarrowia lipolytica* tem sido estudada detalhadamente nos níveis enzimático e molecular. A levedura, quando cultivada em substratos hidrofóbicos, tem a capacidade de produzir emulsificantes e lipases extracelulares

(por exemplo, Lip2p, codificada pelo gene LIP2). Simultaneamente, outras lipases intracelulares (Lip7p e Lip8p) podem ser secretadas para o meio de cultivo. Com a ação das lipases, vários ácidos graxos livres são formados e incorporados pela célula com auxílio de transportadores ativos. Segundo PAPANIKOLAOU e AGGELIS (2011), estes ácidos livres são incorporados pela célula, proporcionando assim, energia.

Quando ocorre a via de síntese “ex-novo”, em que as gorduras existentes no meio de cultivo são utilizadas como a única fonte de carbono e de energia, não há qualquer biossíntese “de novo” de lipídeos a partir do acetil-CoA, pois a enzima ácido graxo sintetase e a ATP-citrato liase são inibidas pela presença de cadeias alifáticas exógenas. Sendo assim, a existência deste tipo de substrato no meio de cultura e geralmente incompatível com a biogênese “de novo” dos lipídeos, mesmo se glicose ou outros compostos hidrofílicos estiverem presentes no meio de cultivo e forem co-metabolizados com os ácidos graxos exógenos (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

2.4.2. FUNGOS OLEAGINOSOS

Os lipídeos são importantes componentes de fungos, tanto em termos de estrutura e constituição da membrana, do retículo endoplasmático e das membranas de várias organelas, compõem substâncias de reserva, principalmente em forma de triglicerídeos e são componentes de hormônios, como anterídiol, ácidos trispóricos e sirenina, são utilizados como fonte de energia e fonte de carbono, além de serem componentes da parede celular e do envoltório de esporos dos fungos. Muitos estudos têm demonstrado a importância de lipídios para o desenvolvimento, esporulação, germinação e seu envolvimento em vários processos fisiológicos nos fungos. Os principais fatores que influenciam o grau de produção de lipídios são a natureza e percentagem de carbono (C) e nitrogênio (N), conforme fontes de nutrientes no meio. Os principais componentes destes lipídios são geralmente triacilglicerídeos e glicerofosfolipídios (fosfolipídios), que podem ser acompanhados de esteróis e ésteres, ácidos graxos, esfingolipídios e hidrocarbonetos. (PUTZKE & PUTZKE 2004; PUPIN, *et al.*, 2000; GAO, *et al.*, 2013).

Várias espécies de leveduras e fungos filamentosos têm a capacidade de sintetizar e acumular grandes quantidades de triacilgliceróis dentro das suas células, até 70% do peso da biomassa, fato promissor para a produção de biodiesel de terceira geração, além da exploração dos ácidos docosahexaenóico (DHA), gama-linolênico (GLA), eicosapentanóico (EPA) e araquidônico (ARA), e entre outros

lipídeos especiais de importância farmacêutica e alimentícia (RATLEDGE & WINN 2002; LIU *et al.*, 2008; ROSSI *et al.* 2011; ZHAO *et al.* 2015; Li *et al.*, 2015)

Segundo Rossi *et al.* (2011) a acumulação de lipídeos nas leveduras e fungos filamentosos oleaginosos tem sido relacionada com a escassez de fonte de nitrogênio e/ou fósforo no meio de cultivo e a fonte de carbono em excesso, uma condição mais eficiente para induzir a lipogênese. Vorapreeda *et al.* (2012) sugerem que a enzima, ATP: citrato liase (ACL) pode desempenhar um papel importante na direção do excesso de carbono para ser armazenada como lipídeos, em vez de hidratos de carbono. Há também vários estudos publicados relacionando limitação do fósforo, magnésio, zinco, chumbo ou ferro à acumulação de lipídeos nos modelos de leveduras oleaginosas (HALL & RATLEDGE 1977; BEOPOULOS *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2010). Porém a limitação de nitrogênio ainda é a forma mais eficiente para a indução da lipogênese (ROSSI *et al.*, 2011; VORAPREEDA *et al.*, 2012)

Fungos oleaginosos sob limitações de nutrientes passam por três fases de crescimento: proliferação celular, acumulação de lipídeos, e, na terceira fase às células entram na fase estacionária, em que o acúmulo de lipídeos é contínuo, porém na fase estacionária a B-oxidação também se inicia para remobilizar os lipídeos armazenados para serem utilizados como fonte de carbono pela célula (BEOPOULOS *et al.*, 2011).

2.4.3. APLICAÇÃO DE ÓLEOS MICROBIANOS

Os óleos microbianos, ultimamente têm mostrado interesse biotecnológico para muitos pesquisadores nas últimas décadas, devido às suas diversas aplicações, como em biocombustíveis, em aditivos alimentares, farmacêuticos, e ingredientes de alimentos para a aquicultura (LIU & ZHAO 2007; LI *et al.*, 2008. ROSSI *et al.*, 2010; ROSSI *et al.*, 2011; ZHENG, *et al.*, 2012).

A composição dos lipídeos microbianos apresenta similaridade com óleos vegetais, matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel. O óleo de soja, por exemplo, é a principal matéria prima para produção de biodiesel no Brasil, sendo os ácidos graxos insaturados como o ácido oléico e o ácido linoléico predominantes na sua composição (CHRISTOPHE *et al.*, 2012).

A utilização de lipídeos microbianos torna-se economicamente mais viáveis como matéria prima para a produção de biodiesel comparado à comercialização do biodiesel oriundo de plantas oleaginosas, que representa um alto custo de produção em relação ao diesel oriundo do petróleo, representando 60 a 95% do custo global do

combustível (CHRISTOPHE *et al.*, 2012). Entretanto, para os micro-organismos oleaginosos serem viáveis para o bioprocesso, estes devem ser cultivados em substratos à base de resíduos com baixo ou com nenhum valor agregado (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

Uma enorme variedade de substratos não-convencionais têm sido utilizada como fontes nutricionais para os micro-organismos de biomassa lipídica, como resíduos ricos em carboidratos, óleos vegetais, resíduos graxos, n-alcanos, etanol, glicerol e ácidos orgânicos (PAPANIKOLAOU e AGGELIS 2011).

Uma das aplicações dos óleos microbianos, principalmente os produzidos por fungos filamentosos, é a produção de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente os ácidos γ -linolênico (ω -6) e linoleico. Os fungos filamentosos da ordem Mucorales, como *Umbelopsis* sp., *Cunninghamella echinulata*, *Mucor rouxii*, *M. circinelloides*, *Mucor hiemalis*, são mais intensamente estudados para produção de ácidos graxos essenciais. (SHAW 1965; KENNEDY 1993; WYNN *et al.*, 2001; AHMED *et al.*, 2006; CERTIK *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2015). Segundo Perini *et al.*, (2010) o ácido linoléico é um ácido graxo essencial na dieta humana, sendo precursor do ácido araquidônico. Já o ácido γ -linolênico é um importante intermediário na biossíntese de prostaglandina biologicamente ativo a partir de ácido linoleico (CARVALHO *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2015).

Segundo Putzke (2004), as propriedades antifúngicas dos lipídeos produzidos por fungos têm sido estudadas há muitos anos, citando Clark (1899) como um dos pioneiros e menciona os estudos de Kitajima & Kawamura (1931) em que os ácidos graxos insaturados presentes no lipídeo resultaram em ótimas atividades antifúngicas que os ácidos graxos saturados.

2.5. BIODIESEL

O petróleo é atualmente a principal fonte energética mundial, servindo como matéria-prima para produção de óleo diesel, gasolina e outros produtos. No entanto, sua prospecção envolve elevação de preço, alvo de questões ambientais associadas à queima de combustíveis fósseis, além da certeza de que em poucos anos este não suprirá a demanda mundial, situações que têm contribuído para colocar a humanidade frente à necessidade de novas fontes energéticas, além disso, o desenvolvimento de medidas governamentais em muitos países estabelecem uma proporção mínima de biodiesel em gasolina e diesel, como resultado, planeja-se

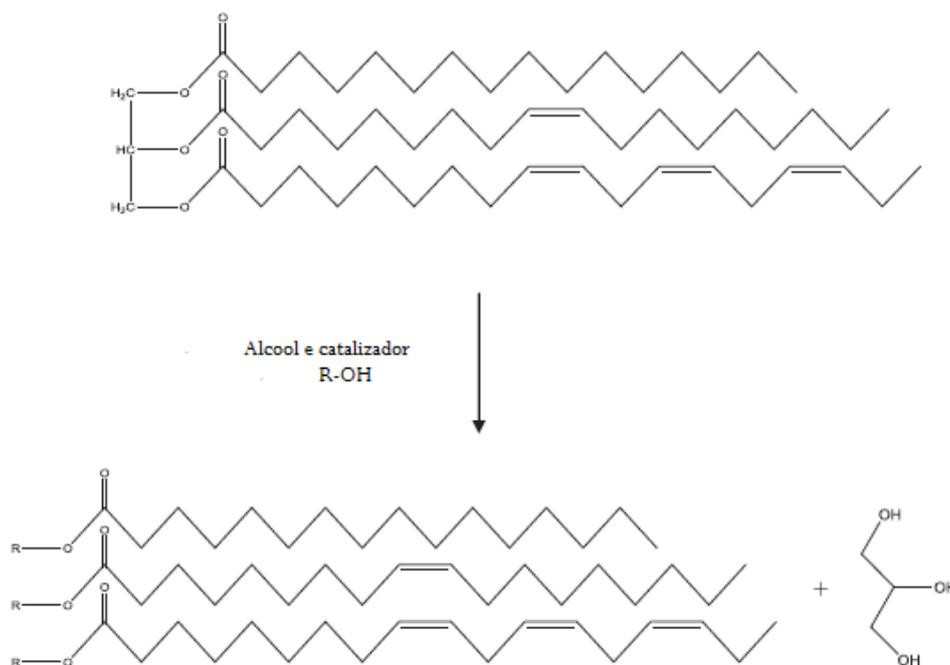
aumentar 36 bilhões de galões até 2022 (VICENTE *et al.*, 2010, CARRERO, *et al.*, 2011).

A produção de biocombustíveis à base de biomassa representa uma abordagem fundamental para enfrentar os altos preços de energia, reduzir as emissões de gases de efeito estufa e reforçar uma economia sustentável (ZINOVIEV *et al.*, 2010). Portanto, a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais tem sido desenvolvida como uma alternativa para substituição de combustíveis fósseis (LÔBO e FERREIRA, 2009; CARRERO, *et al.*, 2011).

De acordo com a Resolução ANP nº 7/2008, Biodiesel – B100 – é um combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, 2008).

A transesterificação é o método mais utilizado, gerando ésteres alquílicos de óleos e gorduras (KNOTHE *et al.*, 2005; LÔBO e FERREIRA, 2009). Nesta reação, a molécula de triacilglicerol reage com três moléculas de álcool formando três moléculas de ésteres monoalquílicos de ácido graxo, ou seja, o biodiesel e uma molécula de glicerol (Figura 4)

Figura 4. Reação de transesterificação de triglicerídeos



Fonte: Sitepu *et al.*, 2014.

Fatores ambientais e sociais tornam o uso de biodiesel favorável pelos seguintes fatores:

- 1- É biodegradável e inofensivo;
- 2- Matéria-prima de fontes renováveis;
- 3- Os ésteres de ácidos graxos etil ou metil, não contêm enxofre em sua composição;
- 4- Diminuição de emissão de fuligem na atmosfera (até 50%);
- 5- Sua utilização diminui a emissão aproximada do diesel de CO₂;
- 6- Não contém substâncias cancerígenas encontradas no óleo diesel;
- 7- Não é considerado um material perigoso; 6- apresenta várias vantagens sociais e econômicas da sua utilização, particularmente em países em desenvolvimento;
- 8- Fonte adequada para a indústria de óleo vegetal, servindo como uma ferramenta importante para regulação do mercado;
- 9- Aumenta a vida útil do motor devido a uma capacidade de lubrificação superior, embora forneça uma quantidade de energia cerca de 10% menor que o diesel de petróleo (LÔBO & FERREIRA, 2009).

A demanda por biodiesel aumentou devido à alta dos preços do petróleo ao desenvolvimento de medidas governamentais que estabelecem uma proporção mínima de biocombustível para toda a gasolina e diesel utilizados nos transportes.

No entanto, o biodiesel oriundo de óleo vegetal apresenta algumas desvantagens, 70-90% do custo de produção de biodiesel corresponde ao óleo vegetal cru. Além da indústria de biodiesel competir com a indústria de alimentos para culturas oleaginosas (VICENTE *et al.*,2010).

2.5.1. USO DE BIODIESEL NO BRASIL

A escassez do petróleo durante as décadas de 1970 e 1980 fez com que o Governo Federal criasse um programa chamado PROALCOOL, implementando e regulamentando o uso do etanol hidratado e etanol anidro como combustíveis, que podem ser misturados com a gasolina de petróleo. Durante este período também foi criado o Plano Pró-óleo, elaborado pela Comissão Nacional de Energia, através da Resolução n^o 007 de 22 de outubro de 1980. O Plano Pró-óleo tinha como objetivo adicionar 30% de óleos vegetais no diesel e uma substituição total a longo prazo.

Tendo ainda como proposta a transesterificação, como uma alternativa tecnológica. Porém, com a queda dos preços do petróleo no mercado internacional, este programa foi abandonado em 1986 (POUSA *et al.*,2007).

Apenas no final século 20, o Governo Federal reiniciou a discussão sobre o uso de biodiesel, e muitos estudos foram realizados com parceria com universidades e centros de pesquisa (POUSA *et al.*, 2007). Em 2002, criou-se o programa PROBIODIESEL, visando a etanólise de óleos vegetais como a rota principal. Até 2005, a substituição de todo o diesel consumido no Brasil por B5 (5% biodiesel e 95% de mistura de diesel) e dentro de 15 anos por B20 (20% de biodiesel e diesel mistura de 80%) (POUSA *et al.*,2007).

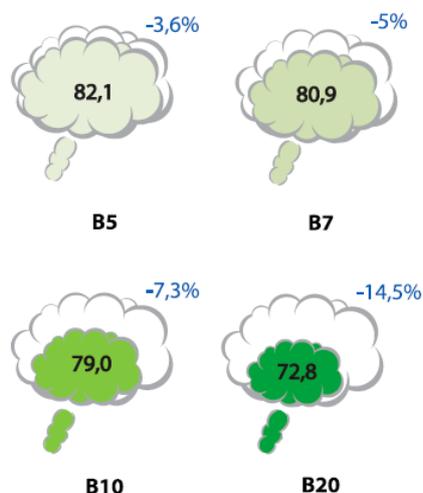
Portanto, o uso do biodiesel no Brasil foi legalmente respaldado pela Lei nº 11.097/2005. A Lei nº 9.478/1997 complementarmente cita em seu Capítulo I os princípios e objetivos relativos à política energética nacional, dentre eles:

“(...) IV – proteger o meio ambiente e promover a conservação de energia; (...) XVIII - mitigar as emissões de gases causadores de efeito estufa e de poluentes nos setores de energia e de transportes, inclusive com o uso de biocombustíveis”.

Entre os anos 2005 e 2012 foram produzidos e consumidos no Brasil 11 bilhões de litros de biodiesel, beneficiando com sensíveis melhorias na qualidade do ar, principalmente nas grandes cidades. Emissões de gases do efeito estufa foram significativamente reduzidas, sendo evitado a emissão de aproximadamente 22 milhões de toneladas de CO₂ eq. para a atmosfera (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2013).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2013) quanto maior a concentração de biodiesel misturado ao diesel do petróleo, maior será a redução de emissões de gases do efeito estufa. Por exemplo, o B5 atualmente em vigor no Brasil reduz em 3,6% as emissões em relação ao diesel mineral. Na vigência do B7 (mistura de 7% de biodiesel no diesel), a redução seria 5%, enquanto que no cenário do B10 (mistura de 10% de biodiesel no diesel) o patamar de redução de emissões desses gases chegaria a 7,3% (Figura 5).

Figura 5. Efeito das concentrações da adição do biodiesel ao diesel na redução de emissões de gases.



Fonte: DeltaCO₂ & CENA (2013)

O setor do biodiesel, já conta com uma série de casos de sucesso. Frotas de ônibus movidas a B20 (mistura de 20% de biodiesel no diesel) e B100 (100% de biodiesel) em São Paulo e Curitiba (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2013).

O projeto Linha Verde existe em Curitiba, capital do Paraná, desde 2009, conta com ônibus rodando com B100 e veículos híbridos (motor elétrico e ciclo diesel). A frota roda 228.500 km por mês, consumindo mais de 190 mil litros do biocombustível. A Viação Itaim Paulista (VIP), empresa de transporte coletivo da cidade de São Paulo-SP, utiliza desde 2006 grandes quantidades de biodiesel, incluindo misturas ternárias biodiesel-etanol-diesel. Desde 2010, a VIP vem usando diariamente o B20 em cerca de 2 mil ônibus. Até 2013 já foram consumidos cerca de 117 milhões de litros de biodiesel, o que significa cerca de 218 mil toneladas de CO₂ emitidas a menos na cidade de São Paulo. Isso equivale ao plantio de cerca de 1,5 milhões de árvores. Além disso, a experiência da VIP lançou para a atmosfera da capital paulista cerca de 100 toneladas a menos de óxidos de enxofre (SO_x) e 5.600 toneladas a menos de monóxido de carbono (CO) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2013).

2.6. RESÍDUOS AGROÍNDUSTRIAS E SUA APLICAÇÃO COMO SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE E LIPÍDEOS

Resíduo define-se como materiais não aproveitados em atividades humanas provenientes das indústrias, comércios e residências, podendo este ser sólido, líquido ou gasoso (LANGANKE, 2011).

Para Pelizer *et al.*, (2007) os impactos ambientais causados por resíduos vêm aumentando a preocupação de órgãos governamentais e indústrias, mobilizando vários setores do mercado, que vêm buscando políticas que visem diminuir os impactos causados na natureza.

Além da poluição dos solos e da água, provinda da lixiviação dos resíduos, a não utilização desses representa a perda de nutrientes, podendo elevar os valores dos produtos finais, uma vez que o tratamento, transporte e a disposição final dos resíduos influencia diretamente o custo da produção (ROSA *et al.*, 2011)

Diante da poluição desenfreada causada pelos resíduos oriundos das indústrias, dos comércios e das residências, consumidores e órgãos públicos estão preocupados preocupado com o meio ambiente e a sustentabilidade do planeta. A Gestão Ambiental e certificação da ISO 14000 vêm sugerido um conjunto de normas que tem como objetivo o desenvolvimento de atividades de vários segmentos, sem transgredir as leis ambientais, enfatizando o tratamento de resíduos gerados. (PELIZER *et al.*, 2007).

Para Pedrosa *et al.*, (2013) os resíduos agroindustriais apresentarem elevado potencial poluente, mas não podem ser considerados como lixo, pois possuem valor econômico agregado e podem ser tratados e aproveitados no próprio setor agroindustrial.

Segundo Laufenberg *et al.*, (2003) e Langanke (2011) os resíduos podem apresentar substâncias de alto valor que pode ser empregado numa tecnologia adequada, podendo ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários

O avanço na área da biotecnologia vem proporcionado à oportunidade para o aproveitamento de resíduos, como subprodutos, principalmente relacionadas à tecnologia das fermentações, pois os mesmos fornecem uma ampla gama de substratos alternativos para o desenvolvimento de micro-organismos em diferentes processos biotecnológicos, consequentemente favorecendo o meio ambiente, uma

vez que se podem evitar possíveis impactos ambientais (PANDEY *et al.*, 2001, ROSA *et al.* 2011). De acordo com Santos *et al.*, (2012) para a síntese de produtos desejáveis é importante a escolha adequada das fontes nutricionais, sendo os resíduos agroindustriais os mais pesquisados. São geralmente mais baratos, abundantes e apresentam composição rica em material orgânico (GONZALES *et al.*, 2013).

A utilização industrial dos biossurfactantes/bioemulsificantes e lipídeos microbianos tem sido dificultada devido aos altos custos de produção associados às fontes nutricionais onerosas (PAPANIKOLAOU 2002b, PAPANIKOLAOU e AGELLIS 2008, RUFINO *et al.*, 2008). Por outro lado, estes custos podem ser significativamente reduzidos pelo uso de substratos renováveis como nutrientes com baixo custo (GALLERT e WINTER, 2002, PAPANIKOLAOU e AGELLIS 2008).

A milhocina, resíduo proveniente da maceração do milho, demonstra ser uma fonte promissora para o crescimento de micro-organismos, tendo sido incluída em meios de produção de bioemulsificante/ biossurfactante e lipídeos (LUNA *et al.*, 2011, SANTOS *et al.*, 2013, LIMA *et al.*, 2015).

Almeida *et al.*, (2006) utilizaram do óleo de soja residual e a milhocina, para a produção de biossurfactante por *Candida tropicalis* e por meio de planejamento fatorial demonstraram que a milhocina apresentou um resultado positivo.

A manipueira, água gerada na prensagem da mandioca, foi utilizada como fonte de carbono para a produção de biossurfactante por *C. lipolytica*. Neste estudo a redução da tensão superficial foi significativa em maior concentração do resíduo (10%) e menor concentração de sulfato de amônio e uréia (ANDRADE *et al.*, 2006)

A maioria das indústrias de alimentos utilizam gorduras e óleos o que gera grandes quantidades de resíduos hidrofóbicos. Com o acúmulo desses resíduos, tem aumentado o interesse da utilização desses materiais como fonte de nutrientes para transformação microbiana (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002, PAPANIKOLAOU 2002b). Vários estudos vêm utilizados substratos hidrofóbicos para a produção de biossurfactantes e/ou bioemulsificante (SARUBBO *et al.*, 2007, RUFINO *et al.*, 2008, SOUZA *et al.*, 2012, SANTOS *et al.*, 2013) e lipídeos (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002b, SABIROVA *et al.*, 2010, BEOPOULOS *et al.*, 2011)

THANOMSUB *et al.*, (2004) utilizaram como fonte de carbono o óleo de soja residual para produção de um biossurfactante glicolípido pela *Candida ishwadae*, um biossurfactante com alta atividade de emulsificação.

Sobrinho et al., (2007), utilizaram resíduo da refinaria de óleo vegetal de soja e a milhocina como alternativos para a produção de biossurfactante por *C. sphaerica*. Os resultados obtidos mostraram que o melhor rendimento de biossurfactante foi alcançado em meio de cultivo contendo 5% de resíduo de óleo vegetal e 2,5% de milhocina.

El Bialy et al., (2011), obtiveram bons resultados ao cultivarem a *Yarrowia lipolytica* em apenas óleos residuais de serviços de fast food como fonte nutricional. Tendo obtido resultados significativos, principalmente com o óleo oriundo de fritura de vegetais, em que a levedura acumulou de 57,89%.

Papanikolaou (2002b), ao utilizar gordura animal no cultivo da *Candida lipolytica*, visando o acúmulo de lipídeos, obteve 44% de lipídeos totais.

De forma geral, os resíduos da agroindústria de processamento de produtos de origem vegetal e origem animal apresentam em suas composições diferentes constituintes, que abrem muitas oportunidades de agregação de valor a esses resíduos (ROSA et al., 2011, SANTOS et al., 2012)

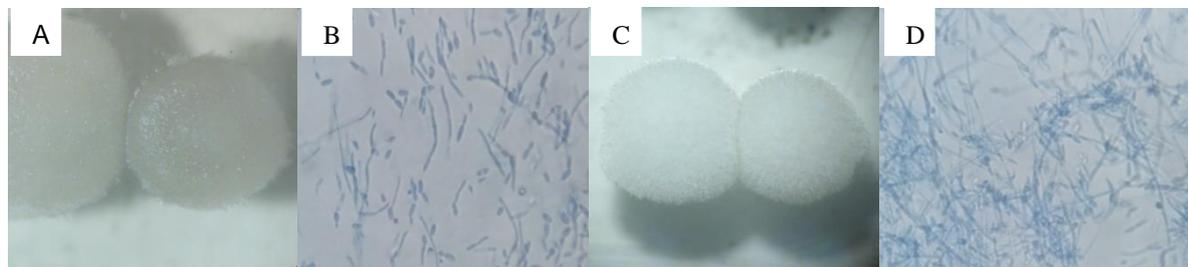
Segundo Rosa et al. (2011), o desenvolvimento de novas tecnologias que revertam o conceito de resíduo para o de matéria-prima para a produção de novos materiais é imprescindível para otimizar a eficiência do agronegócio além de reduzir o impacto ambiental.

2.7. *Candida lipolytica*

A *Candida lipolytica* é uma levedura estritamente aeróbia, dimórfica, eucariota, da classe dos Ascomycetes, subclasse Hemiascomycetes, e à família *Dipodascaceae* (BARTH & GAILLARDIN, 1997) A levedura é reconhecida como segura (GRAS - Generally Regarded as Safe – Geralmente Reconhecido como Seguro) pela FDA (American Food and Drug Administration), sendo assim, bastante utilizada em processos biotecnológicos (TSUGAWA et al., 1969).

As espécies são heterotálicas, ou seja, possuem micélio auto-estéril e requerem a participação de outro talo compatível para a reprodução sexuada (BARNET et al., 2000). A maioria dos isolados são haplóides, ainda que diplóides estáveis também existam, podendo ser induzidas a formar ascos. Na natureza, as leveduras crescem como uma mistura de gemulação, pseudo-hifas e hifas septadas verdadeiras de 3 a 5µm de largura e até vários milímetros de comprimento (BARNET et al., 2000) (Figura 7).

Figura 6. Macroscopia: Colônia de *Candida lipolytica* de aspecto úmido (A); Microscopia (visualização: 40x): presença de células leveduriformes e pseudohifas de *Candida lipolytica* (B); Macroscopia: Colônia de *C. lipolytica* cotonosa (C); Microscopia (visualização: 40x): pseudohifas e hifas verdadeiras de *Candida lipolytica* (D)



Fonte: Autoria própria

Os septos se assemelham a poros centrais do tipo comum ao filo, existindo apenas um núcleo por segmento. A transição dimórfica da forma leveduriforme para hifas (ou vice versa) pode ser facilmente induzida *in vitro* através da modificação de pH, temperatura, fonte de carbono e de nitrogênio ou na presença de compostos específicos em meios de cultura (BARTH & GAILLARDIN, 1997; RYWINSKA, 2013). A transição de formas celulares está associada com crescimento unipolar e divisão assimétrica, formando uma grande distribuição de células com tamanho e formas distintas (COELHO et al., 2010).

Candida lipolytica é uma levedura oleaginosa, podendo acumular lipídeos intracelularmente para 40% do seu peso seco, que cresce sobre uma variedade de substratos hidrofóbicos (BEOPOULOS *et al.*, 2011). Segundo Beopoulos et al., 2009, esta levedura adaptou-se ao uso de substratos oleaginosos pela evolução genes que codificam agentes tensoativos (biossurfactantes) para a solubilização desses compostos, além de modificação na sua superfície celular para facilitar a adesão de gotículas hidrofóbicas (saliências de superfície celular), maximizando assim o contato célula-substrato e pelo desenvolvimento de mecanismos complexos de transporte para a incorporação destes compostos na célula.

Candida lipolytica é considerada uma levedura não patogênica, sendo utilizada em aplicações industriais, tais como na produção de proteínas, aroma de pêssego e ácido cítrico e de enzimas de interesse biotecnológico, como proteases, lipases, esterases e fosfatases (NICAUD *et al.*, 2002).

Uma aplicação potencial de *C. lipolytica* é a produção de óleo microbiano a ser utilizado na produção de biodiesel (THIERRY e JEAN-MARC, 2011, WASYLENKO *et al.*, 2015). Os lipídeos produzidos por este fungo unicelular tem a composição similar aos óleos vegetais e gorduras animais destinados à produção de biodiesel

(ATHENSTAEDT *et al.*, 2006; BEOPOULOS *et al.*, 2011) No entanto, para este uso é necessário atingir uma alta taxa de produção lipídica (ATHENSTAEDT *et al.*, 2006).

Outro potencial biotecnológico da espécie, desde os estudos de Cirigliano & Carman (1984) é a produção do bioemulsificante Liposan, dando impulso para estudos mais atuais na produção de biossurfactante e bioemulsificante por *C. lipolytica* (SARUBBO *et al.* 2001, RUFINO *et al.* 2007; SOUZA *et al.* 2012, RUFINO *et al.* 2014)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMO

A *C. lipolytica* UCP 0988 foi gentilmente cedida da Coleção de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE, Brasil. A levedura foi mantida no estado anamorfo a 5° C em YPD (Yeast Peptone Agar). Transferências periódicas foram feitas manter a viabilidade do microrganismo.

3.2 SUBSTRATOS

Os substratos utilizados foram a milhocina, subproduto do beneficiamento do milho da indústria Ingredientes Brasil Ltda (Cabo de Santo Agostinho – PE, Brasil) e o óleo de soja residual gentilmente cedido pelo comércio informal de alimentos. As análises elementares da milhocina e do óleo residual de soja foram realizadas no equipamento elementar analisador modelo EA 1110 Carlo Erba Instruments.

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O cultivo de *C. lipolytica* foi realizado em frascos de Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL do meio constituído por milhocina e óleo de soja residual de acordo com as concentrações estabelecidas pelo planejamento fatorial de 2², de acordo com a Tabela 1 descrito abaixo (Item 3.14). Todos os meios foram acrescidos de uma base de sais contendo NH₄NO₃ (0,1%); KH₂PO₄ (0,02g/L) e MgSO₄ (0,02g/L). O pH do meio de produção foi ajustado a 6,0 por adição de NaOH 1 M ou solução de 1M de HCl e o inóculo correspondeu a 1% do cultivo contendo 10⁷cel/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150rpm, incubados por 96 horas, à temperatura de 28°C. Após esse período a cultura foi centrifugada a 10000g, seguida de filtração em papel Wathmann N°1, a fim de separar as células do líquido metabólico. O líquido metabólico foi submetido ao teste de atividade e índice de emulsificação.

3.4. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOMULSIFICANTE

Para a investigação da produção do bioemulsificante foi realizada a atividade emulsificação de acordo com a metodologia descrita por Cirigliano & Carman (1984) com os resultados expressos em Unidade de atividade de emulsificação (UAE) e o índice de emulsificação seguindo a metodologia de Cooper & Goldenberg (1987) sendo os resultados expressos em %. O líquido metabólico foi filtrado em papel

Wathmann Nº1, centrifugado a 4000 rpm, durante 20 min, para a obtenção do líquido metabólico livre de células. Os substratos hidrofóbicos testados para o teste de atividade e do índice de emulsificação foram o óleo de milho, óleo de motor queimado e n-hexadecano.

3.5. ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS EMULSÕES

As emulsões foram preparadas com 2mL de óleo de motor e 1mL do líquido metabólico livre de células, obtido da melhor condição homogeneizados em vórtex por 1 min. Em seguida, as emulsões formadas foram observadas em microscópio óptico com aumento de 20X e as imagens fotografadas com uma câmera digital.

3.6. ESTABILIDADE DO BIOEMULSIFICANTE AVALIADA PELO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

Para o estudo da estabilidade das emulsões foram analisados os efeitos de diferentes pH (2,4,6,8,10), temperaturas (50, 100°C) e diferentes concentrações de NaCl (2,5,10,15 e 20%) no líquido metabólico livre de células contendo o bioemulsificante após a determinação do índice de emulsificação usando como substrato hidrofóbico o óleo queimado de motor de acordo com a metodologia descrita por Cooper & Goldenberg (1987).

3.7. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOEMULSIFICANTE

O bioemulsificante produzido na condição selecionada do planejamento fatorial 2² foi extraído pelo método de precipitação com álcool 70%. Foi adicionado ao líquido metabólico dois volumes de álcool 70%. O material foi deixado em repouso por 24 h a 4 ° C. A amostra foi centrifugada a 5000g durante 30 min, lavadas duas vezes com água fria e secas a 37 ° C durante 24 a 48 h.

A carga iônica do bioemulsificante foi determinada utilizando um potenciômetro Zeta, modelo ZM3-D-G, Zeta Meter System 3.0+, com imagens diretas para o vídeo do Zeta Meter, San Francisco, CA, EUA.

Para a composição química do biomulsificante isolado a concentração de proteína foi estimada utilizando a proteína total pelo kit da Labtest Diagnóstica S.A., Brasil. O teor total de carboidratos foi estimado pelo método fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois et al.,(1956). O conteúdo lipídico foi determinado de acordo com Manocha *et al.*, (1980).

3.8. TESTE DE DESLOCAMENTO DO ÓLEO EM ÁGUA DO MAR

A capacidade de dispersão dos compostos hidrofóbicos foi avaliada a partir do líquido metabólico livre de células seguindo a metodologia descrita por Techaoei *et al.*, (2011), em 40mL de água do mar foram colocados na placa de Petri (9 mm de diâmetro), adicionado de 20 µl do óleo de motor aplicado sobre a superfície da água do mar e 10 µl da amostra contendo o sobrenadante aplicado centro da película de óleo. O diâmetro da zona clara formado foi medido com uma régua e, em seguida, o tamanho da área da zona clara foi calculada como área de deslocamento de óleo (ODA) utilizando a seguinte equação 1:

$$ODA = \frac{22}{7} (\text{radius})^2 \cdot \text{cm}^2$$

3.9. POTENCIAL DO BIOEMULSIFICANTE NA BIORREMEDIAÇÃO

A capacidade de remoção de diesel em areia foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Urum *et al.*, (2004), e que em 10g de areia foi adicionado 1g de óleo diesel, durante sete dias em temperatura ambiente. Posteriormente, a areia poluída com diesel foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 125mL, contendo 20 mL de líquido metabólico livre de células e incubados em agitação orbital durante 24h a 150rpm e 30° C. O processo foi repetido por duas vezes. A água foi utilizada como controle negativo e o hexano como controle positivo. Em seguida, a amostra foi levada para estufa a 50° C por 12h. O óleo diesel residual foi extraído com hexano e a massa seca do óleo diesel foi acondicionada em dessecador até peso constante. A porcentagem de remoção de óleo foi determinada de acordo com a seguinte equação 2:

$$\%RBE = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso final})}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Em que:

Peso da placa inicial (Pi): peso inicial da placa de Petri com remoção do óleo por solvente;

Peso da placa final (Pf): peso final da placa de Petri com óleo resultante das lavagens com o bioemulsificante.

Para se calcular o (Pi) a areia com o óleo não foi lavada com o bioemulsificante, sendo removido com o hexano

3.10. AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DA BIOMASSA

Durante o cultivo, alíquotas de 50mL do meio de produção foram retiradas em intervalos de tempo de 24 a 96h e centrifugadas a 10000g, a 28°C durante 20 minutos para a obtenção da biomassa. Em seguida, a biomassa foi lavada com água destilada, liofilizada e mantida em dessecador até peso constante.

3.11. ANÁLISE CITOQUÍMICA DOS LIPÍDEOS

A análise citoquímica dos lipídeos presente em *C. lipolytica* foi realizada de acordo com o método de Sheehan e Storey (1947) com modificações. As amostras de células foram fixadas em glutaraldeído e após a etapa de fixação foram lavadas em tampão salina fosfato (PBS). Em seguida, foram emersas no corante Sudan Black B por 10 minutos, na ausência de luz. Após esta etapa, as amostras foram lavadas em álcool a 70% para retirar o excesso do corante, e em seguida lavadas com água destilada, contra-coradas com safranina por 30 segundos e novamente lavadas com PBS. As lâminas foram visualizadas ao microscópio óptico com aumento de 100X. As gotículas de óleo presentes nas células de leveduras foram coradas em negro ou azul escuro.

3.12. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS LIPÍDEOS TOTAIS

A biomassa liofilizada (1,0g) foi submetida a extrações sucessivas de lipídeos com clorofórmio:metanol (2: 1, 1: 1, 1: 2 v/v), agitando em vórtex durante 10 minutos. A fase orgânica foi separada da biomassa por centrifugação a 5.000g durante 10 minutos. O sobrenadante contendo o extrato lipídico foi coletado e evaporado em rotaevaporador (MANOCHA *et al.*, 1980). O percentual de lipídeos totais presentes da biomassa foi quantificado pelo método gravimétrico utilizando a seguinte equação 3:

$$\text{Lipídeos Totais (\%)} = \frac{\text{massa de lipídeos}}{\text{Biomassa seca (g)}} \times 100$$

3.13. IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA BIOMASSA

A identificação e quantificação dos ácidos graxos da biomassa foi realizado utilizando o cromatógrafo gasoso Varian com injector automático equipado com um detector de ionização de coluna capilar HP-5 de sílica fundida (5% e 95% difenil

dimetilpolisiloxano), 30m x 0,25 mm. A temperatura do forno de coluna possui rampa de aquecimento com temperatura inicial de 150°C e final de 250°C. A temperatura do injetor e do detector foi de 280°C, e o hélio (1cm 3min⁻¹) utilizado como um gás de transporte. A biomassa foi metilada em ésteres de ácidos graxos de acordo com Durham e Kloos (1957).

3.14. TRANSESTERIFICAÇÃO/ESTERIFICAÇÃO DIRETA DA BIOMASSA EM BIODIESEL

Para a transformação direta da biomassa em biodiesel, foi utilizada a metodologia de Vicente *et al.*, (2010). A biomassa foi transesterificação/esterificação durante 8h, a 65 °C com uma solução de triofluoreto de boro, como catalizador ácido e 10:1 de metanol/clorofórmio. A mistura foi recuperada com água e hexano e centrifugada e o solvente foi removido por rota-evaporador. O rendimento do biodiesel produzido foi calculado por gravimetria.

3.15. PLANEJAMENTO FATORIAL

Um planejamento experimental de 2² com oito ensaios com quatro pontos centrais foi realizado para avaliar a influência das variáveis independentes concentração de milhocina (%) e concentração óleo de soja residual (%) sobre a variável resposta atividade de emulsificação e produção de lipídeos totais. As variáveis e os níveis foram estão codificados da seguinte maneira: Milhocina - Nível (-1) = 1%, Nível (+) = 5%, Ponto central = 3%. Óleo de soja residual - Nível (-1) = 2%, Nível (+) = 8%, Ponto central = 5% (Tabela 1).

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial para produção simultânea do bioemulsificante e lipídeos por *Candida lipolytica*

Ensaio	Milhocina	Óleo de soja residual de fritura
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
Ponto central	0	0

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE POR *Candida lipolytica* UCP 0988 UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Candida lipolytica demonstrou habilidade de produzir bioemulsificante em meio contendo 5% de milhocina e 8% de óleo de soja residual correspondente ao ensaio 4 do planejamento fatorial. Nesta condição, foi obtido o valor mais elevado do índice de emulsificação (96,66%) com o óleo queimado de motor após 96 horas de cultivo (Tabela 2). De acordo com Willumsen e Karlson (1997), são considerados valores significativos de índice de emulsificação acima de 50%. Observou-se que os percentuais de índice de emulsificação para o óleo de milho e hexadecano no ensaio 4, não foram semelhantes ao óleo de motor queimado, sugerindo que a atividade de emulsificação depende da afinidade do bioemulsificante com os substratos hidrocarbonados, que segundo Luna et al. (2013) essa afinidade envolve a interação direta com o próprio hidrocarboneto. Resultado inferior do índice de emulsificação foi obtido por Lima et al. (2010), utilizando n-hexadecano (50%), enquanto a atividade de emulsificação máxima obtida foi de 6,704 UAE (Unidade de Atividade Emulsificante) com n-hexadecano (Tabela 2). RUFINO *et al.*, (2014) cultivando o mesmo micro-organismo em 6% de resíduo industrial de refinaria de óleo de soja e 1% de ácido glutâmico, obteve 5,5 U.A.E em hexadecano.

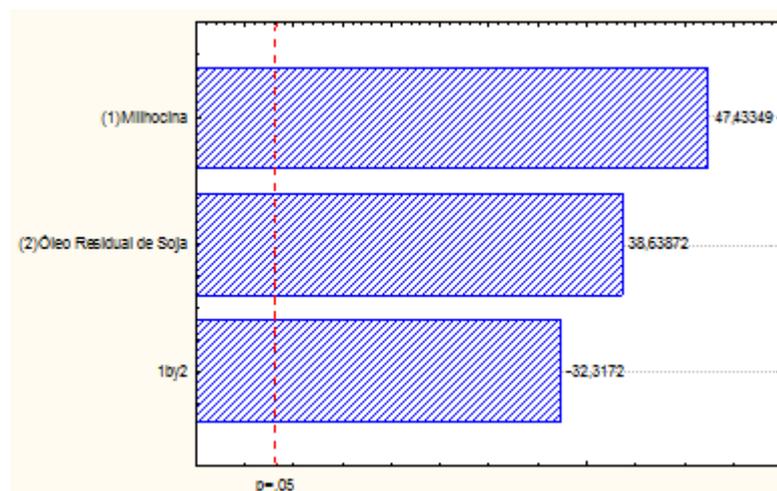
Tabela 2. Resultados da produção de bioemulsificante por *C. lipolytica* de acordo com o planejamento fatorial

Ensaio	Índice de Emulsificação (E24) - %			Atividade de Emulsificação (UAE)
	n-hexadecano	Óleo queimado de motor	Óleo de milho	n-hexadecano
1	-	64,00	35,00	0,945
2	14,70	91,40	50,00	5,693
3	60,00	93,33	55,00	6,281
4	63,63	96,66	58,00	6,704
5	-	66,66	50,00	4,233
6	-	70,96	47,00	4,335
7	-	72,85	50,00	4,370
8	-	74,28	50,00	4,279

*Condições: milhocina 1% e óleo de soja residual 2% (Ensaio 1), milhocina 1% e óleo de soja residual 8% (Ensaio 2), milhocina 5% e óleo de soja residual 2 (Ensaio 3), milhocina 5% e óleo de soja residual 8% (Ensaio 4), milhocina 3% e óleo de soja residual 5% (ponto central: 5,6,7,8).

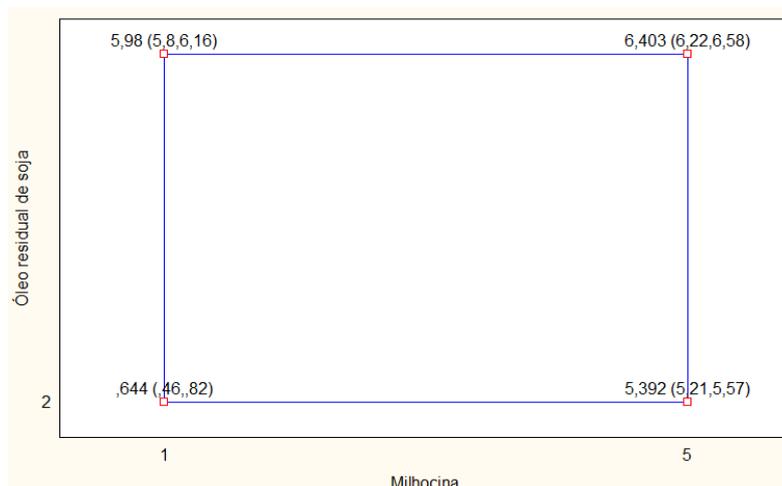
De acordo com a análise estatística para a produção de bioemulsificante em hexadecano por 96h, o diagrama de Pareto de efeitos padronizados com o nível de 95% de confiança ((Figura 7), pode ser observado que as variáveis independentes foram positivamente significativas, em que individualmente os resíduos agroindustriais em níveis mais alto demonstraram influência sobre a produção do bioemulsificante, O ponto no qual os efeitos estimados são estatisticamente significativos ($p = 0,05$) está indicado pela linha vertical vermelha tracejada.

Figura 7. Diagrama de Pareto para avaliação da influência das variáveis milhocina (1) e óleo de SBS: oja residual (2) sobre a variável resposta atividade emulsificante por *Candida lipolytica*. Puro Erro=0,0044776



Como observado no gráfico de Pareto (Figura 7), a interação dos resíduos agroindustriais sobre a atividade emulsificante foi significativa. É possível observar no gráfico dos efeitos de interação (Figura 8), que mudanças na concentração da milhocina levaram a conclusões diferentes. É observado que, em uma interação antagônica, em que o nível menor da milhocina adicionada a maior nível de óleo residual de soja foi melhor do que uma interação sinérgica negativa, ou seja, menores níveis de milhocina adicionados a menores níveis de óleo residual de soja. Porém, a interação sinérgica positiva, em que maiores concentrações de milhocina adicionada a maiores concentrações de óleo obteve-se resultado significativo nesse experimento.

Figura 8. Gráfico mostrando efeitos médios da interação das duas vias de interação na produção de bioemulsificante



Assim como este estudo, Almeida *et al.*, (2006) utilizaram do óleo de soja residual e a milhocina, para a produção de biossurfactante por *Candida tropicalis* e por meio de planejamento fatorial demonstraram que a milhocina apresenta um resultado positivo, porém o resíduo de óleo apresentou um efeito negativo, diferente do nosso estudo.

Albuquerque *et al.*, (2006), ao utilizarem um planejamento fatorial para investigar a influência da uréia, sulfato de amônio, dihidrogênio fosfato de potássio e óleo de milho na produção de bioemulsificante pela *Candida lipolytica* (UCP 0988), tiveram uma influência positiva com a presença de óleo de milho, KH_2PO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na atividade de emulsificação.

Vale destacar que, em muitos estudos a milhocina vêm demonstrado ser uma fonte promissora para o crescimento de micro-organismos, sendo incluída em meios de produção de bioemulsificante/ biossurfactante (SOBRINHO *et al.*, 2007, LUNA *et al.*, 2011, SANTOS *et al.*, 2013).

Esses dados obtidos são bastante promissores, considerando que a produção biotecnológica de bioemulsificantes depende do desenvolvimento de processos mais baratos, o que economicamente viabiliza o processo, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50% do custo final do produto (CAMEOTRA e MAKAR, 1998; RODRIGUES *et al.* 2006).

4.2. CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DA EMULSÃO

As emulsões formadas usando como substrato hidrofóbico o óleo de motor pelo bioemulsificante obtido da melhor condição do planejamento fatorial (5% de milhocina e 8% de óleo de soja residual) estão ilustradas na figura 9.

É possível analisar na amostra que contém o líquido sem o inóculo (Figura 9 – A), que as gotas apresentam aspectos sem forma globular de grande tamanho, resultado da coalescência.

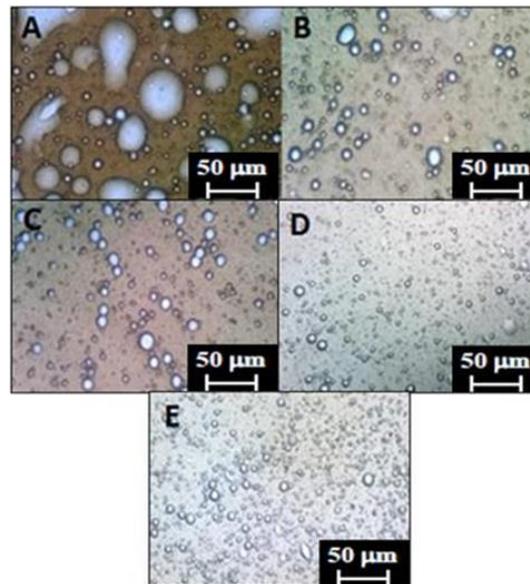
Para a emulsão formada com o líquido metabólico fermentado com 24h (Figura 9 – B) verifica-se que as gotas apresentam aspecto nitidamente globular, com gotas de tamanhos variáveis e com flocculação com tendência a coalescer para volumes maiores, além disso, gerou espaços livres da fase líquida. Segundo Elias *et al.*, (2006) este comportamento indica que ocorreu falta de estabilidade na emulsão logo após a sua formação.

A emulsão formada com 48h (Figura 9-C), gerou poucos espaços livres entre as gotas, além das gotas apresentarem filmes que englobam a fase oleosa em gotas de tamanhos menores.

Para a emulsão formada em 72h, verifica-se (Figura 9-D) um aspecto diferenciado das anteriores, pois a maioria das gotículas formadas foi de menor tamanho.

Na emulsão formada pelo líquido metabólico com fermentação de 96h, a maioria das gotículas foram menores (Figura 9- E), além de terem sido observados insignificantes espaços vazios em relação a todas condições anteriores, além de uma maior homogeneidade entre as fases e, portanto maior tendência à estabilidade.

Figura 9 Diâmetro das gotas das emulsões formadas com o bioemulsificante de acordo com o tempo de produção



*Líquido sem inóculo (A); Cultivo em 24h (B); Cultivo em 48h (C); Cultivo em 72h (D); Cultivo em 96h (E)

De acordo com Jilavenkatesa *et al.*, (2001), a análise da emulsão necessita de dois parâmetros importantes: o tamanho de gota da fase dispersa e sua concentração. Estes fatores influenciam a viscosidade, estabilidade e coalescência.

As gotículas formadas da emulsão variam em tamanho, gerando uma distribuição de tamanhos de gotas. É bastante distinguível a formação de emulsões menores (0,1 a 5µm) nas últimas horas da fermentação (Tabela 3).

Tabela 3 Caracterização macro e microscópica de emulsões formadas em óleo de motor queimado do bioemulsificante.

Tempo de fermentação (h)	Diâmetro das gotas (μm)	Índice de Emulsificação (E24)	Unidade de Atividade Emulsificante	Propriedades
Controle	1 - 30	Não houve formação	0.0185	Nenhuma emulsificação (Separação de fases). Gotas com formas irregulares e de grande tamanho.
24	0.5 - 10	28.57	0.891	Homogênea com sedimentação. Gotas grandes e globulares e presença de floculação.
48	0.3 - 10	47.06	5.648	Homogênea com gotas grandes.
72	0.1 - 10	76.47	5.812	Homogênea com abundância de gotas menores.
96	0.1- 5	96.66	6.101	Homogênea com gotas menores.

Comparando a distribuição do tamanho das gotas e o índice de emulsificação (E24), do início ao fim da fermentação da produção do bioemulsificante, as gotículas variaram em tamanho e este fato influenciou na estabilidade da emulsão. Dickinson *et al.*, (2009) estudaram experimentalmente a coalescência de gotas de tamanho milimétrico em interface óleo / água e observou que as gotas maiores estouraram mais rápido que as menores. Os autores afirmaram que a variedade de tamanhos das gotas depende do comportamento de coalescência com a deformabilidade da superfície da gota.

Neste trabalho, sugerimos que o fator responsável pela estabilidade do tamanho das gotículas foi a alta concentração de bioemulsificante produzido por *Candida lipolytica* após 96 h de cultivo, resultando em gotas estáveis com dimensões de 0,5 a 10 μm , e atividade de 6,794 UAE.

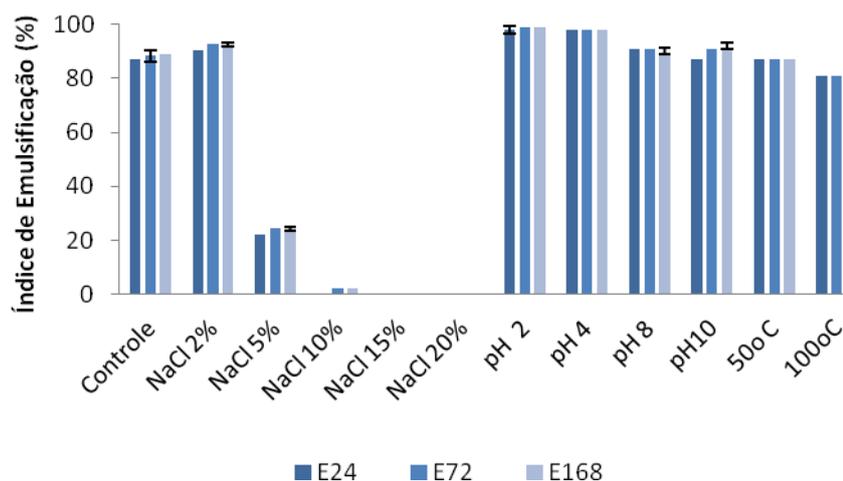
Segundo Langervin, 2004, uma emulsão estável é aquela que mantém suas gotas dispersas na fase contínua por um tempo considerável, sem que haja separação de fases, levando em consideração também que concentrações maiores

de bioemulsificante garantem o aumento da estabilidade, reduzindo a coalescência das gotas.

4.3. ESTABILIDADE DO BIOEMULSIFICANTE

Vários fatores como a salinidade, pH e temperatura afetam a atividade de bioemulsificantes (ILORI *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007). Neste trabalho foram analisados estes fatores sobre a estabilidade do bioemulsificante produzido por *C.lipolytica* no ensaio 4 do planejamento fatorial com o líquido metabólico obtido após 24, 72 e 168 horas (Figura 10)

Figura 10. Índice de emulsificação do bioemulsificante produzido utilizando óleo de motor variando: pH, NaCl e temperatura.



A estabilidade do bioemulsificante produzido pela *Candida lipolytica*, nas condições estudadas neste trabalho, foi avaliada utilizando óleo queimado de motor como substrato hidrofóbico que demonstrou manter sua estabilidade emulsificante em concentrações salinas de até 2% de NaCl, perdendo a propriedade quando exposto a concentrações maiores de NaCl. Por outro lado, após o líquido metabólico ter sido submetido a variações de pH, observou-se que o bioemulsificante manteve sua propriedade em todas as faixas de pH testadas com excelentes porcentuais de emulsões (100%) em pH 2 e 4 durante sete dias. Estes resultados foram similares aos obtidos por Santos *et al.*, (2013) que obtiveram 90% de emulsificação em pH ácido. A capacidade do bioemulsificante de manter sua estabilidade após ter sido submetido a elevadas temperaturas é uma característica de extrema importância para indústrias

que necessitam esterilizar em elevadas temperaturas seus produtos (SANTOS et al., 2013). Neste contexto, o bioemulsificante produzido por *Candida lipolytica* neste trabalho demonstrou ser estável em todas as faixas de temperaturas testadas. Enquanto que Rufino et al., (2008), demonstrou a perda da estabilidade emulsificante pelo biossurfactante produzido pela *Candida lipolytica* a 100°C.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO BIOEMULSIFICANTE

Neste trabalho o bioemulsificante foi constituído por 37,62% de carboidratos, 12,2% de lipídeos e 50,18% de proteínas e foi caracterizado como perfil aniônico pelo medidor Zeta. Recentemente, Rufino et al., (2014) utilizaram a mesma levedura *C. lipolytica* e resíduo industrial de refinaria de óleo vegetal como substrato e produziu um biossurfactante constituído por 50% de proteína, 20% de lipídeos e 8% de carboidratos.

Cirigliano e Carmam (1984), relataram que a estabilidade das emulsões água / óleo depende das propriedades do bioemulsificante incluindo temperatura, concentrações de sódio e ions de potássio e pH. No entanto, Camacho-Chab et al., (2013) e Gudina et al., (2015), descreveram que o bioemulsificante de alto peso molecular é responsável pela manutenção da estabilidade de emulsões.

4.5. POTENCIAL DO BIOEMULSIFICANTE NO DESLOCAMENTO DE COMPOSTO HIDROFÓBICO EM ÁGUA DO MAR

O teste de dispersão do óleo é um sistema de ensaio sensível e conveniente para se analisar a presença de biossurfactantes/ bioemulsificante através de uma zona clara na superfície do óleo (Thavasi et al., 2011). Neste contexto, o teste de dispersão do óleo foi realizado para avaliar a capacidade do bioemulsificante em dispersar substratos hidrofóbicos. O Triton- X (controle positivo) dispersou 38,46 cm² do óleo de motor queimado em água do mar. Os melhores resultados de dispersão foram observadas nos pontos centrais do planejamento (38,46 – 45,34 cm²) e ensaio 4 (38,46 cm²), como mostra na tabela 4.

No estudo de Silva et al. (2014) o bioemulsificante produzido por *Cunninghamella echinulata* no óleo de soja residual e milhocina apresentou uma área de dispersão de óleo de 37,36 cm². O biossurfactante produzido pela levedura *Cyberlindnera samutprakarnensis* (JP52) cultivada em glicerol obteve uma atividade de 44,5 cm² (POOMTIEN et al., 2013).

Tabela 4. Dispersão em óleo de motor (derivado de petróleo) em água do mar

Ensaio	Cm ²
1	12,56
2	14,13
3	20,41
4	38,46
5	38,46
6	38,46
7	45,34
8	38,46
Triton x - 100	38,46

*milhocina 1% e óleo de soja residual 2% (Ensaio 1), milhocina 1% e óleo de soja residual 8% (Ensaio 2), milhocina 5% e óleo de soja residual 2 (Ensaio 3), milhocina 5% e óleo de soja residual 8% (Ensaio 4), milhocina 3% e óleo de soja residual 5% (ponto central: 5,6,7,8).

4.6. APLICAÇÃO DO BIEMULSIFICANTE NA REMOÇÃO DE COMPOSTO HIDROFÓBICO

As lavagens com soluções aquosas em solos contaminados solubilizam os poluentes adsorvidos no solo. A água controla a remoção, mas a adição de surfactantes, ácidos orgânicos ou inorgânicos, NaOH, etc., aumentam a eficácia no processo de remoção (PIÑA *et al.*, 2012)

O bioemulsificante presente no líquido metabólico removeu pelo método de lavagem 93,74% do óleo diesel da areia e a lavagem com a água removeu 18,14%. Andrade *et al.*, (2015), ao utilizarem o biossurfactante presente no líquido metabólico produzido por *Candida glabrata* verificaram que esse removeu pelo método de lavagem 95,7% de óleo queimado de motor. No estudo de Santos *et al.*, (2013) o biossurfactante produzido pela *C. lipolytica* UCP0988 cultivada e gordura animal e milhocina removeu 92,3% do óleo de motor. Contudo, na condição em que o óleo foi deixado em contato com a areia por sete dias, visando mimetizar uma condição real, o bioemulsificante produzido em nosso estudo, removeu 45,20% e a lavagem utilizando a água destilada removeu 15,2%

Resultados descritos na literatura mostram que o biossurfactante de *C. antarctica* remove cerca de 50% do petróleo adsorvido na areia (ADAMCZAK e BEDNARSKI, 2000, JOSHI *et al.*, 2008). Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* removeram cerca de 30% do petróleo contidos numa coluna embalada (JOSHI *et al.*,

2008). Segundo Urum *et al.*, (2006), quanto mais tempo o óleo tiver contato com a areia maior será a adsorção deste na superfície, portanto moléculas de bioemulsificante/biossurfactante terá menos eficiência na remoção, dificultando a interação dessas biomoléculas com o óleo. Com o objetivo de mimetizar uma condição real, o óleo foi deixado em contato com a areia da praia por sete dias.

4.7. PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS TOTAIS NOS RESÍDUOS AGROÍNDUSTRIAIS

O máximo rendimento da produção de biomassa por *C. lipolytica* ocorreu na condição 4 do planejamento fatorial (5% de milhocina e 8% de óleo de soja residual) com obtenção de 12,71g.L (Tabela 5). Observa-se que as concentrações máximas de fonte de carbono e nitrogênio no meio de produção favoreceram o resultado na produção de biomassa.

Tabela 5. Produção de biomassa e lipídeos totais obtida através do planejamento fatorial 2²

Ensaio	pH	Biomassa g.L ⁻¹	Lipídeos g.L ⁻¹	Lipídeos (g/g biomassa)
1	4,1	1,96	0,696	0,355
2	4,2	4,41	1,87	0,425
3	4,1	10,02	3,15	0,314
4	4,2	12,71	4,96	0,390
5	4,1	6,71	2,17	0,323
6	4,1	6,25	2,25	0,360
7	4,2	6,73	2,47	0,367
8	4,2	7,16	2,20	0,307

*milhocina 1% e óleo de soja residual 2% (Ensaio 1), milhocina 1% e óleo de soja residual 8% (Ensaio 2), milhocina 5% e óleo de soja residual 2 (Ensaio 3), milhocina 5% e óleo de soja residual 8% (Ensaio 4), milhocina 3% e óleo de soja residual 5% (ponto central: 5,6,7,8).

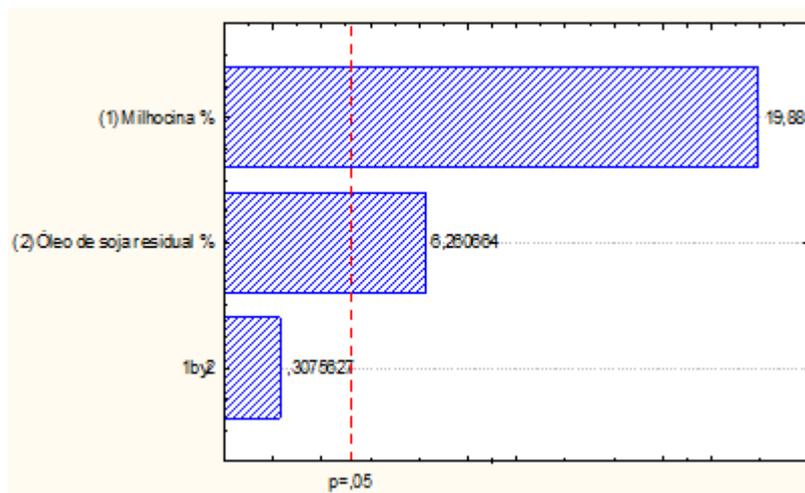
A tabela 6 mostra que a milhocina utilizada neste estudo representa uma fonte significativa de nitrogênio e carbono, e o óleo residual de soja uma quantidade significativa de carbono.

Tabela 6. Porcentagem de nitrogênio, carbono, hidrogênio e enxofre presentes na milhocina e óleo residual de soja

Substrato	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	Hidrogênio (%)	Enxofre (%)
Milhocina	34,84	7,06	6,59	1,18
Óleo residual de Soja	75,96	0,29	11,05	0,93

De acordo com a análise estatística pelo Diagrama de Pareto (Figura 11), com o nível de 95% de confiança, pode ser observado que as variáveis independentes (milhocina e óleo de soja residual) foram significativas, favorecendo a produção de biomassa por *C. lipolytica*. No entanto, a associação entre a milhocina e óleo de soja residual não foi significativa do ponto de vista estatístico. O ponto no qual os efeitos estimados são estatisticamente significativos ($p = 0,05$) está indicado pela linha vertical vermelha tracejada.

Figura 11. Diagrama de Pareto para avaliação da influência das variáveis milhocina e óleo de soja residual sobre a variável resposta produção de biomassa por *Candida lipolytica*. Puro Erro=0,1691663



Os dados demonstram que a milhocina foi a variável mais significativa. No estudo de Daverey e Pakshirajam (2009), a biomassa de *Candida bombicola* foi reduzida quando cultivada apenas em fontes de carbono (óleo e melão de cana), os pesquisadores concluíram que a ausência de fonte de nitrogênio no meio de cultivo acarretou ao baixo crescimento da levedura. Santos *et al.*, (2013), concluíram que a milhocina foi suficiente como fonte de nitrogênio para o crescimento da *C. lipolytica*. Este estudo mostra que o meio de cultivo contendo óleo de soja residual e milhocina substitui meios de culturas sintéticos para o crescimento de *C. lipolytica*.

Vários estudos tem mostrado a capacidade da *C. lipolytica* crescer em meios hidrofóbicos, que deve-se a sua a evolução de genes que codificam agentes tensioativos (BEOPOULOS *et al.*, 2009 e RUFINO *et al.*, 2014).

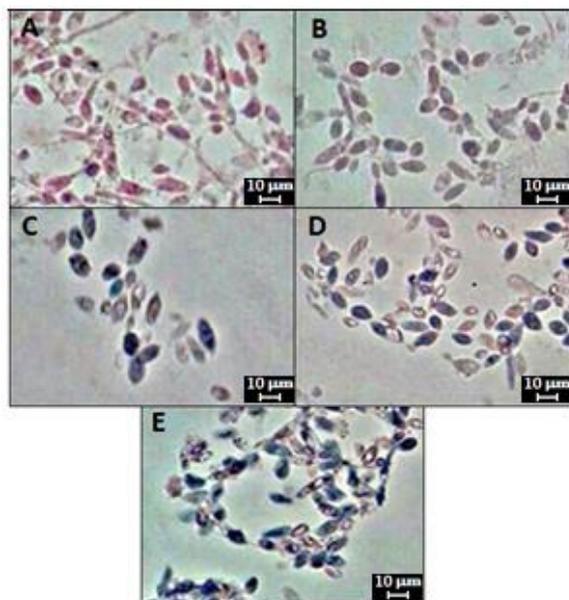
Em relação à produção de lipídeos totais, o micro-organismo acumulou percentuais superiores a 31%, atingindo 39% e 41% nos ensaios 4 (milhocina 5% e óleo de soja residual 8%) e 2 (milhocina 1% e óleo de soja residual 8%), respectivamente, como melhores resultados. A *Candida lipolytica*, é um micro-organismo modelo para a produção de lipídeos, metabolizando substratos hidrofóbicos. (Barth e Gaillardin, 1997, Beopoulos *et al.*, 2012). Como mostra na tabela 4, neste estudo, a *C. lipolytica* foi capaz de produzir até $4,96 \text{ g/L}^{-1}$, relacionada a biomassa produzida em concentrações máximas dos resíduos, indicando que estes substratos são promissores para a produção de lipídeos, contribuindo com a redução de custos no bioprocesso e agregando valor aos resíduos.

Nossos resultados foram superiores aos estudos de André *et al.*, (2009) e Makri *et al.*, (2011) que obtiveram 30,7% e 22,3% respectivamente de lipídeos totais levedura cultivada em glicerol.

Estudos anteriores garantem que quando a levedura é cultivada em substratos hidrofóbicos, há maior acúmulo de lipídeos comparado aos substratos hidrofílicos. Bati *et al.*, (1984) ao cultivarem a *Y. lipolytica* em óleo de milho, obtiveram 55% de lipídeos totais. Papanikolaou *et al.*, (2002b) ao utilizarem gordura animal como substrato no meio de cultivo, obtiveram aproximadamente 44% de lipídeos totais pela levedura.

Com o objetivo de analisar o acúmulo de lipídeos em tempos anteriores a 96h do ensaio 4 (milhocina 5% e óleo de soja residual 8%) utilizamos a técnica de citoquímica com o uso do corante Sudan Black, em que os lipídeos coram-se em azulado a negro (Figura 12)

Figura 12 . Coloração das células em Sudan Black entre 0 a 96h de cultivo em milhocina com 5% e 8% de óleo de soja residual (ensaio 4).

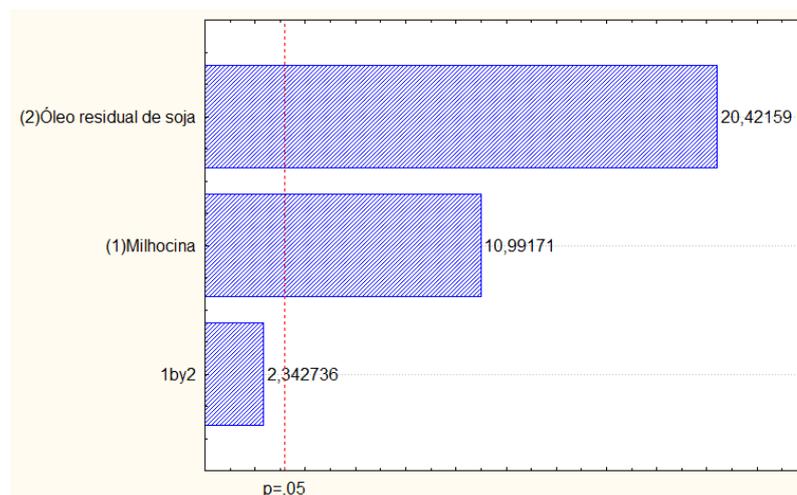


* Tempo 0 (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D), 96h (E).

Observando as imagens, é possível perceber que a levedura apresentou um acúmulo notável de lipídeos a partir de 48h do início da fermentação (Figura 12-C) mantendo-se praticamente estável até às 96h (Figura 12- E). Burdon (1946) descreveu pela primeira vez a coloração de corpos lipídicos em fungos usando o corante sudan black, sendo ultimamente utilizado para analisar esses compostos nas células como uma análise qualitativa, visando investigar micro-organismos oleaginosos (PRASANNA *et al.*, 2011; NEEMA *et al.*, 2013).

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 13), pode ser observado que individualmente as variáveis independentes apresentaram influência significativa com efeito positivo sobre a variável resposta de lipídeos totais, ou seja, o aumento da concentração dos resíduos agroindustriais favorece o acúmulo de lipídeos totais. O ponto no qual os efeitos estimados são estatisticamente significativos ($p = 0,05$) está indicado pela linha vertical vermelha tracejada. A interação entre a milhocina e óleo residual de soja mostrou-se insignificante ao nível de 95% de confiança.

Figura 13. Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 22 em cultivo de 96h, tendo como variáveis independentes (1) Milhocina, (2) óleo de soja residual, e como variável resposta lipídeos totais. Puro erro = 0,018425



El Bialy *et al.* (2011), também obtiveram bons resultados ao cultivarem o estado meiospórico da *C. lipolytica* em apenas óleos residuais de serviços de fast food como fonte nutricional. Quando foi utilizado o óleo obtido de fritura de vegetais, a levedura proporcionou o acúmulo de 57,89% de lipídeos e quando cultivada em outros óleos residuais obteve percentuais menores: óleo de fritura de peixes, 45,49% e óleo de fritura de carnes, 34,02% de lipídeos totais. Os resultados obtidos para o acúmulo máximo de lipídeos por este micro-organismo em concentração máxima de substrato hidrofóbico é a via de acumulação “ex novo”. Segundo Beopoulos *et al.* (2009) esta via envolve a absorção de ácidos graxos, óleos e triacilglicerídeos a partir do meio de cultura.

A *C. lipolytica* não era considerada um micro-organismo oleaginoso, uma vez que a mesma era ineficaz em acumular quantidades significativas de lipídeos a partir de substratos hidrofílicos durante o crescimento submerso em meios limitados de nitrogênio (RATLEDGE 1994). No entanto, a capacidade de acumular quantidades significativas de lipídeos (até 60%) foi comprovada ao utilizar óleos e gorduras como fonte de carbono, o que indica a oleaginicidade da levedura (PAPANIKOLAOU e AGGELIS 2002a, SABIROVA *et al.*, 2010, BEOPOULOS *et al.*, 2011). Segundo Fickers *et al.*, 2005, o desenvolvimento de genes que codificam surfactantes para se adaptar a esses substratos, protuberâncias na superfície celular, mecanismos de transporte e produção de enzimas (lipases) extracelulares, ligadas a membrana e

intracelular que hidrolisam esses compostos facilitam a incorporação desses substratos na célula.

Ahmed *et al.*, (2006) com o objetivo de avaliar os efeitos de diversas fontes de nitrogênio na produção de lipídeos por isolados de Mucorales, avaliando os efeitos na produção pela utilização de 1% de concentração de peptona, extrato de levedura, milhocina e fermento de levedura, obtendo resultados positivos quando associava o extrato de levedura e/ou milhocina ao fermento.

E estudo conduzido por Lima *et al.*, (2015), mostraram o potencial da milhocina como fonte de nitrogênio, quando cultivaram as cepas de *C. glabrata* (UCP1002 e 1556) em 40% de soro de leite e 20% de milhocina, apresentaram rendimento de biomassa de 6,8 e 8,8 g.L⁻¹ respectivamente e 16,20 e 21,50% de lipídeos totais respectivamente, porém o estudo não produziu quantidades significativas de lipídeos totais quanto o nosso estudo, uma vez que, a quantidade excessiva de fonte de nitrogênio utilizadas pelos autores não contribui para a síntese *de novo* de lipídeos.

De acordo com os dados, a composição da milhocina demonstra ser necessária para o crescimento de biomassa, favorecendo um alto rendimento lipídico durante a fermentação, além do mais, este substrato é mais atrativo, uma vez que este é mais barato do que outras fontes de nitrogênio, como peptona e extrato de levedura e pode ser explorado em estudos futuros.

4.8. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDEOS TOTAIS

A análise do perfil do ácido graxo (tipo e concentração) é relevante para a conservação e oxidação do biodiesel. Portanto é de extrema importância conhecer a matéria-prima que será utilizada. Para a análise qualitativa dos ácidos graxos dos corpos lipídicos produzidos pelo micro-organismo, foi realizada a metilação direta da biomassa para obter ésteres metílicos de ácidos graxos da amostra com maior rendimento lipídico (Ensaio 4). O perfil dos ácidos graxos revelou quantidades significativas de ácido oleico, ácido palmítico e ácido linoleico, como mostrado na Tabela 7. O perfil obtido dos lipídeos da *Candida lipolytica* cultivada no ensaio 4 (5% de milhocina e 8% de óleo de soja pós-fritura) foi de 34,91% de ácidos graxos saturados, 41,4% de monoinsaturado e 20,45% de poliinsaturado.

Tabela 7. Perfil de ácidos graxos produzidos por *Candida lipolytica* no ensaio 4 em 96h

Ácidos graxos	
Ácido cáprico (C10:0)	-
Ácido mirístico (C14:0)	-
Ácido palmítico (C16:0)	27,4%
Ácido palmitoléico (C16:1)	-
Ácido esteárico (C18:0)	7,51%
Ácido Oléico (C18:1)	41,4%
Ácido linoléico (C18:2)	18,4%
Ácido α -linolênico (C18:3 - ω -3)	-
Ácido γ -linolênico (C18:3 - ω -6)	2,05%
Ácido araquídico (C20:0)	-
Ácido eicosenóico (C20:1)	-
Ácido behênico (C22:0)	-

* Ensaio 4 (5% de milhocina e 8% de óleo de soja pós-fritura)

Papanikolaou *et al.*, (2009) obtiveram um perfil próximo ao nosso estudo ao cultivarem *C. lipolytica* em glicerol. Foram produzidos 47% de ácido oléico, 21% de ácido linoleico, 15% de ácido palmítico, 11% de ácido esteárico e 2% de ácido palmitoléico.

Segundo, Islam *et al.*, (2013), não há um único ácido graxo que seja responsável pela propriedade do combustível. Portanto é importante a presença de ácidos graxos saturados que favorecem a qualidade de ignição. Segundo Vieira *et al.* (2010), ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, como o ácido oleico e o ácido linoleico, respectivamente, apresentarem o ponto de fusão -5 °C para o linoléico e 4 °C para o oleico, dificultando o congelamento do biodiesel. Os autores destacam que o excesso de ácidos graxos saturados promove o entupimento, devido o congelamento do produto (KNOTHE *et al.*, 2008, ISLAM *et al.*, 2013).

Vale salientar que a presença significativa em um biodiesel de estéreis ácidos graxos poli-insaturados reduz o número de cetano e a estabilidade de oxidação, que é indesejável para o biodiesel (KNOTHE, 2009). A oxidação causa aumento da viscosidade e o entupimento dos filtros, devido a produção de materiais insolúveis, além da elevação da acidez e a presença de hidroxiperóxido, que ocasionam a corrosão do sistema de injeção (MONEYEM e GERPEN, 2001).

Em nosso estudo, o perfil de estéreis de ácidos graxos obtido da biomassa da *C. lipolytica* mostra-se próximo ao perfil do óleo de soja, uma das principais matérias primas para produção de biodiesel no Brasil, Estados Unidos e na Europa, constituído principalmente do ácido linoléico (aproximadamente 54%) e oléico (aproximadamente 22%), e os demais saturados (RAMOS *et al.*, 2008). Porém, ao contrário do nosso estudo, o óleo de soja apresenta uma dominância de ácido linoleico, um ácido graxo poli-insaturado, fator preocupante, devido o aumento de valores de iodo no biodiesel que alcançam um valor de 129.7 (g de I₂/100 g), a União Europeia limita o valor de 120 mg de I₂/g, mas a União dos EUA não especifica valores de iodo como parâmetro de qualidade do biodiesel (RAMOS *et al.*, 2008; VICENTE *et al.*, 2010).

4.9. TRANSESTERIFICAÇÃO/ESTERIFICAÇÃO DIRETA DA BIOMASSA

O método simultâneo de extração e transesterificação/esterificação da biomassa garante a reação completa dos lipídeos em ésteres metílicos de ácidos graxos, inclusive dos ácidos graxos livres presente nos lipídeos totais, fator importante que determina a acidez do biodiesel, além disso na catálise ácida não há a formação de sabão, a catalise alcalina apresenta baixa neutralização dos ácidos graxos livres (VICENTE *et al.*, 2006; MARCHETTI *et al.*, 2007; FAKAS *et al.*, 2009; VICENTE *et al.*, 2010). Vários estudos vêm o uso deste método com metanol e clorofórmio como solventes e H₂SO₄ (ácido sulfúrico), HCl (ácido clorídrico) BF₃ (trifluoreto de boro) como catalizadores ácidos (FORMO *et al.*, 1954; CANAKCI *et al.*, 2003; VICENTE *et al.*, 2010).

O micro-organismo no ensaio 4 (5% de milhocina e 8% de óleo de soja residual), acumulou 39% de lipídeos totais produziu 37,9% de biodiesel. Portanto, aproximadamente um percentual de 96,70% dos lipídeos totais foram transesterificados. Apenas os lipídeos saponificáveis (triacilglicerídeos, dialcilglicerídeos, monoalcilglicerídeos) lipídeos polares e ácidos graxos livres foram convertidos em biodiesel. Vicente *et al.*, (2010) ao cultivarem *Mucor circinelloides* em meio com glicose, verificaram a produção de 22,9% de lipídeos totais e 18,4% de ésteres metílicos utilizando o trifluoreto de boro como catalizador ácido.

O conteúdo de estéres metílicos foi alto comparado ao estudo de Liu e Zhao (2007), que também utilizaram a transformação direta da biomassa por catálise ácida. A União Europeia (EN14214) limita o valor mínimo de 95,6% de conteúdo de ésteres metílicos. Esses valores indicam que o método empregado por

transesterificação/esterificação por catalise ácida é significativo em comparação com os métodos tradicionais com a extração de lipídeos (FOLCH *et al.*, 1957 ; BLIGH & DYER , 1959).

5. CONCLUSÕES

- *Candida lipolytica* UCP 0988 foi capaz de metabolizar a milhocina e óleo de soja residual como fontes nutricionais para a produção de lipídeos e um bioemulsificante com excelente estabilidade térmica e com potencial de uso na dispersão de derivados do petróleo;
- O uso de um planejamento experimental demonstrou ser uma ferramenta importante e aplicável para evidenciar a produção de biomassa e lipídeos por *C. lipolytica*, assim como para avaliar o comportamento das variáveis independentes sobre a atividade de emulsificação, apresentando influência dos parâmetros independentes do processo;
- A composição de ácido graxo do óleo produzido pela levedura demonstra ser semelhante ao dos principais óleos vegetais utilizadas na produção de biodiesel;
- O bioemulsificante e lipídeos produzidos através da bioconversão dos resíduos agroindustriais tornam o bioprocesso econômico e sustentável, pois três finalidades foram cumpridas: a valorização dos resíduos agroindustriais, produção de bioemulsificante e a produção de lipídeos renováveis para a produção de biodiesel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACMITE MARKET INTELLIGENCE. Global Surfactant Market: Market, Products, Applications, Innovations, Chances & risks, Competition, Prospects to 2020. Vol 1. Ratingen, 2013. P. 254.

AÇIKEL, Yeşim Sağ. Use of biosurfactants in the removal of heavy metal ions from soils. In: **Biomangement of Metal-Contaminated Soils**. Springer Netherlands, 2011. p. 183-223.

AHMED, Syed U. et al. Effects of various process parameters on the production of γ -linolenic acid in submerged fermentation. **Food technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 283-287, 2006.

ADJONU, Randy et al. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. **Journal of Food Engineering**, v. 122, p. 15-27, 2014.

ALBUQUERQUE, C. F. et al. Evaluation of biosurfactants for removal of heavy metal ions from aqueous effluent using flotation techniques. **International Review of Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 156-161, 2012.

AMARAL, P. F. F. et al. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1894-1898, 2006.

ANDRADE, R. F. et al. Enhanced production of a glycolipid biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP/WFCC1556 for application in dispersion and removal of petroderivatives. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 4, p. 563-576, 2015.

ANDRÉ, Axel et al. Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 6, p. 468-478, 2009.

ANISZEWSKI, Erick et al. Bioemulsifier production by *Microbacterium* sp. strains isolated from mangrove and their application to remove cadmium and zinc from hazardous industrial residue. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 235-245, 2010.

ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. <http://www.anp.gov.br/>. Acesso 12/12/2014.

ATHENSTAEDT, Karin et al. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. **Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 1450-1459, 2006.

BANAT, Ibrahim M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BARNETT, James A. Commentary on a new major reference work *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn. By JA Barnett, RW Payne and D. Yarrow. Cambridge University Press: Cambridge. £ 200.00, ix+ 1139 pp., 1376

photomicrographs by Linda Barnett. ISBN 0 521 57396 3. Published 25 May 2000. 2000.

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

BATI, N.; HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. Biomodification of fats and oils: Trials with *Candida lipolytica*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 11, p. 1743-1746, 1984.

BEOPOULOS, Athanasios; CHARDOT, Thierry; NICAUD, Jean-Marc. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 692-696, 2009.

BEOPOULOS, Athanasios; NICAUD, Jean-Marc; GAILLARDIN, Claude. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1193-1206, 2011.

CALVO, C. et al. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the total environment**, v. 407, n. 12, p. 3634-3640, 2009.

CAMACHO-CHAB, Juan Carlos et al. Emulsifying activity and stability of a non-toxic bioemulsifier synthesized by Microbacterium sp. MC3B-10. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 9, p. 18959-18972, 2013.

CAMPOS, Jenyffer M.; STAMFORD, Tânia LM; SARUBBO, Leonie A. Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 3234-3252, 2014.

CARRERO, A. et al. Hierarchical zeolites as catalysts for biodiesel production from Nannochloropsis microalga oil. **Catalysis Today**, v. 167, n. 1, p. 148-153, 2011.

CASTRO, Marcela P. et al. Influence of several gums on the growth and the production of a bacteriocin like substance from *Lactobacillus curvatus/sakei* ACU-1. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 52-54, 2012.

ČERTÍK, Milan et al. Enhancement of Nutritional Value of Cereals with γ -Linolenic Acid by Fungal Solid-State Fermentations. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 1, 2006.

CHEN, M. L. et al. Solution self-assembly and adsorption at the air– water interface of the monorhamnose and dirhamnose rhamnolipids and their mixtures. **Langmuir**, v. 26, n. 23, p. 18281-18292, 2010.

CHI, Z.; Zheng, Y.; Lucker, B.; Chen, S. Integrated System For Production Of Biofuel Feedstock. US PATENT, 12/512, 557. 2011.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHRISTOPHE, Gwendoline et al. Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food?. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 29-46, 2012..

CIRIGLIANO, Michael C.; CARMAN, George M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 747-750, 1984.

COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO, Isabel. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. p. 930 – 944. 2010

DAVEREY, Achlesh; PAKSHIRAJAN, Kannan. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food research international**, v. 42, n. 4, p. 499-504, 2009.

DELTAco₂, Centro De Energia Nuclear Na Agricultura – Cena. Pegada de carbono na producao de biodiesel de soja. Piracicaba, 2013.

DICKINSON, Eric. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1473-1482, 2009.

DURHAM, DON R.; KLOOS, WESLEY E. Comparative Study of the Total Cellular Fatty Acids of Staphylococcus Species of Human Origin†. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 223-228, 1978.

EL BIALY, Heba; GOMAA, Ola M.; AZAB, Khaled Shaaban. Conversion of oil waste to valuable fatty acids using oleaginous yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2791-2798, 2011.

ELIAS, F. O. et al. Propriedades emulsificantes de complexos de proteínas de soro de leite com polissacarídeos. **Braz. J. Food Technol., III JIPCA, jan**, p. 75, 2006.

ELLIAH, P. et al. Production of glycolipids containing biosurfactant by *Pseudomonas* species. **Indian journal of experimental biology**, v. 40, n. 9, p. 1083-1086, 2002.

ENSHAEIEH, Marjan et al. Bioconversion of different carbon sources in to microbial oil and biodiesel using oleaginous yeasts. **J. Biol. Todays World**, v. 1, n. 2, p. 82-92, 2012.

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

FRANZETTI, Andrea et al. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. **Chemosphere**, v. 75, n. 6, p. 801-807, 2009.

FRANZETTI, A. P. et al., (2011). Hierarchicalzeolites as catalysts for biodiesel production from *Nannochloropsis microalga oil*. **Catalysis Today**, 167, 148–153, 2011.

FRANZETTI, Andrea et al. Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by *Variovorax paradoxus* 7bCT5. **Bioresource technology**, v. 108, p. 245-251, 2012.

FROST & SULLIVAN. Analysis of the Brazilian and Argentinian surfactants Market: strategic opportunities for a fast pace growing Market. **Mountain View**, 2013.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Nº 25 – 2013. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/324.pdf> . Acesso em: 20/10/2015

GAO, Difeng et al. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. **Bioresource technology**, v. 133, p. 315-321, 2013.

GERPEN, VAN. Jon. Biodiesel processing and production. **Fuel processing technology**, v. 86, n. 10, p. 1097-1107, 2005.

GROENEWALD, Marizeth et al. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 3, p. 187-206, 2014.

GUDIÑA, Eduardo J. et al. Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 14, 2015.

GUTIERREZ, Tony et al. Emulsifying and metal ion binding activity of a glycoprotein exopolymer produced by *Pseudoalteromonas* sp. strain TG12. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4867-4876, 2008.

HEYMAN, Bart et al. Guar and xanthan gum differentially affect shear induced breakdown of native waxy maize starch. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 546-556, 2014.

IHS, Surfactants. Douglas County, 2013. Abstract. Disponível em: www.ihs.com

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, n. 7, p. 985-992, 2005.

ISLAM, Muhammad Aminul et al. Influence of fatty acid structure on fuel properties of algae derived biodiesel. **Procedia Engineering**, v. 56, p. 591-596, 2013.

JAGTAP, Shweta et al. Production of bioemulsifier by *Acinetobacter* species isolated from healthy human skin. **Ind J Exp Biol**, v. 48, p. 70-76, 2010.

JILLAVENKATESA, Ajit; DAPKUNAS, Stanley J.; LUM, Lin-Sien H. Particle size characterization. **NIST Special publication**, 2001.

JOSHI, Sanket et al. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource technology**, v. 99, n. 1, p. 195-199, 2008.

KHOT, Mahesh et al. Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. **Microbial cell factories**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012.

KNOTHE, Gerhard. "Designer" biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties†. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 2, p. 1358-1364, 2008.

LANGANKE, R. **Conservação para ensino médio**. Disponível em: <http://eco.ib.usp.br/lepac/conservacao/ensino/lixo_residuos.htm. Acesso em 04/11/2015.

LANGEVIN, D. et al. Crude oil emulsion properties and their application to heavy oil transportation. **Oil & gas science and technology**, v. 59, n. 5, p. 511-521, 2004.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B. e NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v.87, n.2, p.167-198. 2003.

LI, Qiang; DU, Wei; LIU, Dehua. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 749-756, 2008.

LI, Mei et al. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and bioenergy**, v. 34, n. 1, p. 101-107, 2010.

LI, Xiangyu et al. Efficient production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* through integrating fed-batch culture with a two-stage pH control strategy. **Bioresource technology**, v. 181, p. 275-282, 2015.

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

LÔBO, Ivon Pinheiro; FERREIRA, Sérgio Luis Costa; CRUZ, Rosenira Serpa. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428-434, 2002.

MAKRI, Anna; FAKAS, Stylianos; AGGELIS, George. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2351-2358, 2010.

MANOCHA, M. S.; SAN-BLAS, G.; CENTENO, Sonia. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 147-154, 1980.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 11, n. 6, p. 1300-1311, 2007

MARTINS, et al. Influência da fonte de carbono na hidrofobicidade de *Yarrowia lipolytica*. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 2009.

MENEGUETTI C. C, DOMINGUES J. L. Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos. **Revista eletrônica Nutritime**, Vol. 5, No 2, p. 512-536, 2008.

MENG, Xin et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Benefícios Ambientais da Produção e do Uso do Biodiesel . 1ª Edição. Relatório apresentado a Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Oleaginosas e Biodiesel. Brasília, 2013.

MONTEIRO, A. S. et al. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5186-5193, 2010.

MORIKAWA, Masaaki; HIRATA, Yoshihiko; IMANAKA, Tadayuki. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 3, p. 211-218, 2000.

NAVON-VENEZIA, S. et al. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3240-3244, 1995.

NETA, Nair do Amaral Sampaio et al. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 324-331, 2012.

NICAUD, Jean-Marc et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **FEMS yeast research**, v. 2, n. 3, p. 371-379, 2002.

NITSCHKE, Marcia et al. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource technology**, v. 82, n. 1, p. 43-49, 2002a.

PAPANIKOLAOU, S. et al. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of applied microbiology**, v. 92, n. 4, p. 737-744, 2002a.

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

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 8, p. 1031-1051, 2011.

PEDROSA, T. D. et al. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos na compostagem de resíduos agroindustriais. **Nativa Sinop**, v. 01, n. 01, p. 44-48. 2013

PELIZER, L.H. ;PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de Resíduos Agroindustriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**. Vol 2, 2007.

PENFOLD, Jeff et al. Solution self-assembly of the sophorolipid biosurfactant and its mixture with anionic surfactant sodium dodecyl benzene sulfonate. **Langmuir**, v. 27, n. 14, p. 8867-8877, 2011.

POOMTIEN, Jamroonsri et al. Production and Characterization of a Biosurfactant from *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52T. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 77, n. 12, p. 2362-2370, 2013.

POUSA, Gabriella PAG; SANTOS, André LF; SUAREZ, Paulo AZ. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 35, n. 11, p. 5393-5398, 2007.

PUPIN, Antonio Marcos et al. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 121-128, 2000.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos Vol. 2. **da**, 2002.

RATLEDGE, Colin. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807-815, 2004.

RODRIGUES, Lígia R. et al. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 49, n. 1, p. 79-86, 2006.

ROCHA, Maria VP et al. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1295-1299, 2006.

ROSA, M. F. et al. Valorização de resíduos da agroindústria. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS – SIGERA, 2., 2011, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: Embrapa, 2011. v. 1.

ROSENBERG, E. et al. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 402-408, 1979.

ROSSI, Maddalena et al. Getting lipids for biodiesel production from oleaginous fungi. **Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies**, v. 1, p. 72-74, 2011.

RUFINO, Raquel D. et al. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 907-914, 2008.

RUFINO, R. D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 1-5, 2011.

RUFINO, Raquel Diniz et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34-38, 2014.

RYWIŃSKA, Anita et al. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. **biomass and bioenergy**, v. 48, p. 148-166, 2013.

SANTOS, L.F., ISHII, P. L. Xilanases: Principais Metodologias e Parâmetros Cinéticos. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 2:7-15. 2012.

SANTOS, Danyelle KF et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43-50, 2013.

SAMAVATI, Vahid; EMAM-DJOMEH, Zahra; MEHDINIA, Ali. Thermodynamic and kinetic study of volatile compounds in biopolymer based dispersions. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 556-562, 2014.

SARUBBO, Leonie A. et al. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 59-67, 2001.

SARUBBO, Leonie A.; FARIAS, Charles BB; CAMPOS-TAKAKI, Galba Maria. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 68-73, 2007.

SATPUTE, S. K. et al. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 37, n. 3, p. 243, 2008.

SATPUTE, Surekha K. et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 4, p. 436-450, 2010.

SEKHON-RANDHAWA, K. K. Biosurfactants produced by genetically manipulated microorganisms: challenges and opportunities. **Biosurfactants**, ed. N. Kosaric and FV Sukan, **CRC Press, Boca Raton, FL**, p. 49-67, 2014.

SHEEHAN, H. L.; STOREY, G. W. An improved method of staining leucocyte granules with Sudan black B. **The Journal of pathology and bacteriology**, v. 59, n. 1-2, p. 336-337, 1947.

SMYTH, T. J. P. et al. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In: **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 3705-3723.

SILVA ANDRADE, Nadielly R. et al. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 9, p. 15377-15395, 2014.

SITEPU, Irnayuli R. et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 7, p. 1336-1360, 2014.

SOUZA, F. A. S. D.; SALGUEIRO, A. A.; ALBUQUERQUE, C. D. C. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 61-67, 2012.

SUTHAR, Harish et al. Evaluation of bioemulsifier mediated microbial enhanced oil recovery using sand pack column. **Journal of microbiological methods**, v. 75, n. 2, p. 225-230, 2008.

THIERRY Dulermo; NICAUD, Jean-Marc. Involvement of the G3P shuttle and β -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic engineering**, v. 13, n. 5, p. 482-491, 2011.

THAVASI, Rengathavasi; JAYALAKSHMI, Singaram; BANAT, Ibrahim M. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3366-3372, 2011.

TSIGIE, Yeshitila Asteraye et al. Maximizing biodiesel production from *Yarrowia lipolytica* Po1g biomass using subcritical water pretreatment. **Bioresource technology**, v. 111, p. 201-207, 2012.

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

VICENTE, Gemma et al. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 5, p. 3173-3178, 2010.

VORAPREEDA, Tayvich et al. Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 217-228, 2012.

WASYLENKO, Thomas M.; AHN, Woo Suk; STEPHANOPOULOS, Gregory. The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic engineering**, v. 30, p. 27-39, 2015.

WILLUMSEN, Pia A.; KARLSON, Ulrich. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415-423, 1996.

ZHAO, Xin et al. 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, n. 5, p. 405-412, 2008.

ZHAO, Lina et al. 13 C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Bioresource technology**, v. 197, p. 23-29, 2015.

ZHENG, Yubin et al. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.

ZINOVIEV, Sergey et al. Next-generation biofuels: survey of emerging technologies and sustainability issues. **ChemSusChem**, v. 3, n. 10, p. 1106-1133, 2010.