

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



TESE

**BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS GRAXOS DE ORIGEM ANIMAL
DE BAIXO PONTO DE FUSÃO PARA PRODUÇÃO DE
BIODIESEL AUXILIADO POR BIOSSURFACTANTES**

Roger Vasques Marques

Pelotas, Setembro de 2015.

ROGER VASQUES MARQUES

BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS GRAXOS DE ORIGEM ANIMAL DE BAIXO PUNTO DE FUSÃO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL AUXILIADO POR BIOSURFACTANTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação:
Prof. Dr. Érico Kunde Corrêa

Pelotas, Setembro de 2015.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M357b Marques, Roger Vasques

Bioconversão de resíduo graxos de origem animal de baixo ponto de fusão para produção de biodiesel auxiliado por biossurfactantes / Roger Vasques Marques ; Erico Kunde Correa, orientador. — Pelotas, 2015.

78 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Fermentação. 2. Biocombustível. 3. Gordura bovina. 4. Levedura. 5. Bactéria. I. Correa, Erico Kunde, orient. II. Título.

CDD : 664.3

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Érico Kunde Corrêa

Prof. Dr. Carlos Antônio da Costa Tillmann

Prof. Dr. Tito Roberto Sant'Anna Cadaval

Prof. Dr. Maurizio Silveira Quadro

Prof^a. Dr^a. Eduarda Hallal Duval

Dedicatória

Dedico esta tese à minha mãe Rosa Maria e irmão Alex, pela constante presença em minha vida, pelo apoio incondicional, incentivo e por acreditarem na importância desse trabalho para mim.

Dedico também ao meu companheiro de todas as horas Guilherme, um dos pilares de fundação para que essa obra de engenharia e arquitetura pudesse ser planejada, construída e finalmente concluída.

Sem o apoio de vocês, este trabalho nunca teria sido realizado. A vocês, meu muitíssimo obrigado.

Dedico ainda ao meu querido pai José Roger e avô João Vasques, que infelizmente não estão mais presentes entre nós para prestigiar esse importante momento em minha vida.

Por fim, dedico essa tese ao meu orientador Prof. Érico Kunde Corrêa, em ser exemplo de pessoa e profissional, pelo grande incentivo e cobrança para fazer com que todos seus orientados se tornem excelentes profissionais. Pela garra demonstrada para ver o andamento do trabalho e atividades rotineiras de laboratório ir em frente, pela grande dedicação em exaltar o nome da Universidade e do Centro de Engenharias, também pela compreensão e condução dos melhores caminhos a serem tomados, e pela grande visão macro dos caminhos da ciência.

Agradecimentos

A Profa. Dra. Luciara Bilhalva Corrêa, por controlar o clima do laboratório quando ele se tornava muito exaltado, pela grande paciência e calma que levava aos seus orientados colocando a cabeça de todos no lugar para o bom andamento das atividades.

A empresa Frigorífico Famile S.A. nas pessoas de Sra. Angelita Soares e Sr. Mauri, pela incrível receptividade quanto ao trabalho proposto, disponibilizando prontamente toda sua indústria para auxiliar na condução do trabalho.

As alunas de iniciação científica Thayli Araújo e Pâmela Cabral pela grande amizade e apoio conferidos nessa trajetória, sempre dispostas a enfrentar jornadas múltiplas de trabalho em laboratório, possibilitando a execução desse trabalho.

A todos os alunos do Núcleo de Educação, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade, sejam os que passaram como os que ainda estão no NEPERS, pela grande amizade criada, confiança e disposição tanto em horário de trabalho como fora, me aturando sempre entre uma careta ou um profundo suspiro quando pedia pra fazer alguma atividade extra, mas também pelos momentos de risadas, fofocas, piadas, lágrimas, tristezas, enfim, tudo foi uma inesquecível experiência e esperarei reencontrar todos um dia em algum lugar desse mundo a fora, e lá vai ter café sim, não se preocupem.

Aos meus colegas Matheus da Paz, Lauren Vieira, Juliana Carriconde, Camilo Fonseca, Michel Gerber, José Juscelino e João Brandalise pela grande parceria, paciência em ouvir os resmungos e reclamações das segundas de manhã e sextas à tarde. Colegas de novo um dia?

A banca examinadora, por aceitar o convite e disponibilizar seu tempo para contribuir com este trabalho.

A UFPel pela estrutura física e profissional disponibilizadas aos alunos do programa de pós-graduação.

A CAPES pelo auxílio financeiro que viabilizou a execução desse trabalho.

Ao completar um trabalho, percebemos que muitos contribuíram para que ele se realizasse. Quero agradecer a todos que não foram citados aqui, mas que direta ou indiretamente, fizeram parte dessa jornada.

Resumo

MARQUES, Roger Vasques. **Bioconversão de resíduos graxos de origem animal de baixo ponto de fusão para produção de biodiesel auxiliado por biossurfactantes**. 2015. 78f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

A intensa atividade da cadeia produtiva de carnes brasileira gera uma imensa quantidade de resíduos agroindustriais, dentre eles os resíduos de gorduras animais, que podem alternativamente ser convertidos em biodiesel, dada a quebra de algumas barreiras tecnológicas e econômicas que impedem a difusão desse biocombustível a partir dessas fontes na matriz energética nacional. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo quebrar a primeira dessas barreiras, que foi a redução do ponto de fusão de diferentes gorduras animais como matéria-prima para biodiesel utilizando cepas de *Staphylococcus xylosus*, utilizando biossurfactantes como coadjuvantes tecnológicos de origem microbiana utilizando os mesmos resíduos graxos. Assim, foi pré-selecionada uma cepa de *Yarrowia lipolytica* para produção de biossurfactantes que posteriormente, foram aplicados na fermentação de gordura residual bovina por *S.xylosus*. Os resíduos modificados microbiologicamente foram inseridos em blendas com resíduos de óleo de fritura para avaliação dos efeitos das reações de transesterificação e produção de ésteres metílicos, bem como os efeitos da fermentação das gorduras animais causadas por essa bactéria nos pontos de fusão desses resíduos graxos. Os biossurfactantes com as melhores características tecnológicas foram produzidos com até 45% m/v de gordura no mosto. Sua aplicação na fermentação da gordura bovina por *S.xylosus* reduziu o ponto de fusão destes resíduos para 37 °C e esse material produzido pôde ser convertido a biodiesel por intermédio de blenda com resíduo de óleo de fritura com rendimento de ésteres metílicos de 85%. Dessa forma o encadeamento de processos aqui propostos identificaram uma rota alternativa de valorização de resíduos agroindustriais e potencial fornecimento de matéria-prima para o setor energético.

Palavras-chave: Fermentação, Biocombustível, Gordura bovina, Levedura, Bactéria

Abstract

MARQUES, Roger Vasques **Bioconversão de resíduos graxos de origem animal de baixo ponto de fusão para produção de biodiesel auxiliado por biossurfactantes**. 2015. 78f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

The intense production of Brazilian meat generates an immense amount of agro-industrial waste, including animal fatty wastes, which can alternatively be converted into biodiesel, given the breakdown of some technological and economic barriers that prevent the dissemination of biofuel from these sources in the national energy matrix. Thus, this study aimed to break the first of these barriers, which was to reduce the melting point bovine fats as feedstock for biodiesel using strains of *Staphylococcus xylosus* and biosurfactants as technological coadjuvants of microbial origin using the same fatty waste. Thus, a pre-selected *Yarrowia lipolytica* strain was chosen to produce biosurfactants which then were applied in the fermentation of bovine fatty waste by *S.xylosus*. The microbiologically modified wastes were inserted into blends with fried waste cooking oil to evaluate the transesterification reaction effect and production of methyl esters, also, the effects of animal fats fermentation caused by this bacterium in the melting points of these fatty wastes. The biosurfactant with the best technical characteristics have been produced up to 45% w/v fat in the wort. *S.xylosus* fermentation reduced the fatty wastes melting point to 37 ° C and this produced material can be converted into biodiesel blend with through frying oil residue in a yield of methylic esters of 85%. Thus the chain of processes here proposed can be an alternate route for recovery of agro-industrial waste and potential supply of raw materials for the energy sector.

Keywords: Fermentation, Biofuel, Bovine fat, Yeast, Bacterium

Sumário

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2. HIPÓTESES.....	14
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
4.1. Matriz energética global	15
4.2. Classificação dos biocombustíveis	16
4.3. Biodiesel.....	16
4.4. Levedura com aplicabilidade industrial: <i>Yarrowia lipolytica</i>	18
4.5. <i>Staphylococcus xylosus</i> – Características gerais.....	18
4.6. Biossurfactantes.....	19
4.7. Ponto de fusão	19
ARTIGO 1 – POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO DE RESÍDUO GRAXO BOVINO POR YARROWIA LIPOLYTICA	22
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. Coleta e armazenamento das amostras.....	23
2.2. Obtenção e cultivo das cepas estoque.....	24
2.3. Caracterização dos resíduos graxos bovinos.....	24

2.4. Delineamento experimental.....	25
2.5. Processo fermentativo.....	26
2.6. Análises físico-químicas das gorduras bovinas.....	26
2.7. Análises de pH.....	27
2.8. Determinação de biossurfactante – Técnica do espalhamento de óleo.....	27
2.9. Índice de emulsificação (IE).....	27
2.10. Análise estatística.....	28
3. RESULTADOS.....	29
3.1. Avaliação do pH.....	29
3.2. Avaliação dos parâmetros ao final da fermentação.....	31
4. DISCUSSÃO.....	33
4.1. pH.....	33
4.2. Biossurfactante e biomassa.....	34
5. CONCLUSÃO.....	36
6. REFERÊNCIAS.....	36
ARTIGO 2 – OBTENÇÃO DE RESÍDUO GRAXO BOVINO DE BAIXO PONTO DE FUSÃO POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA ASSISTIDA POR BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR YARROWIA LIPOLYTICA.....	41
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1. Coleta e armazenamento das amostras.....	43
2.2. Cepas estoque e obtenção do biossurfactante.....	44
2.3. Delineamento experimental.....	45
2.4. Processo fermentativo.....	45
2.5. Análises físico-químicas das gorduras bovinas.....	45

2.6. Análise do Ponto de Fusão (PF)	46
2.7. Análise estatística	47
3. RESULTADOS.....	47
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÃO	51
6. REFERÊNCIAS.....	51
ARTIGO 3 – PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE RESÍDUO GRAXO BOVINO DE BAIXO PONTO DE FUSÃO.....	57
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1. Coleta e armazenamento das amostras.....	59
2.2. Cepas estoque e processo fermentativo	60
2.3. Delineamento experimental.....	60
2.4. Procedimento experimental.....	61
2.5. Análises físico-químicas das gorduras bovinas	61
3. RESULTADOS.....	61
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÃO	63
6. REFERÊNCIAS.....	63
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
6. REFERÊNCIAS GERAIS.....	67

1. Introdução Geral

Atualmente a sociedade utiliza energia predominante oriunda de fontes fósseis e não renováveis, incitando a busca por maneiras de substituir ou complementar a crescente escassez de oferta por combustíveis originados da crosta terrestre e que impactem de forma menos significativa o ambiente (SINGH & SINGH, 2010). Além disso, com o aumento populacional e da demanda *per capita* de energia, um grande desafio da próxima geração será não somente produzir mais energia, mas também produzi-la de forma sustentável e economicamente viável. Projeções para o ano de 2035 indicam que o mix da matriz global de energia sofrerá mudanças de forma que não haverá mais um único combustível predominante, dando destaque aos combustíveis renováveis que devem aumentar sua contribuição global para 8% dos anteriores 3% em 2013, ultrapassando a energia nuclear já no começo de 2020 e a energia hidroelétrica no começo dos anos de 2030 (BP, 2015).

Nesse âmbito de transição para o emprego de tecnologias de baixa geração de carbono na matriz energética global, o biodiesel se destaca por ser dominante nos setores dos transportes e o aprimoramento de seus processos de obtenção pode contribuir para uma sociedade mais sustentável, já que ele apresenta um maior conteúdo de oxigênio e sua combustão resulta em menores emissões de material particulado, monóxido de carbono, enxofre, aromáticos, hidrocarbonetos e fumaça (CENGIZ & SEHMUS, 2009; XUE et al., 2011). Além de ser renovável, o biodiesel já é comercialmente distribuído em diversos países ao redor do mundo, sendo usado em diferentes graus de diluição em petro-diesel sem que comprometa o desempenho dos motores das frotas atuais (ZHANG et al., 2003a). Contudo, a expansão para países em desenvolvimento é drasticamente freada devido ao seu preço elevado que dificulta futuros incrementos na mistura ao diesel de petróleo.

A conversão de resíduos graxos de origem animal em biodiesel produz um biocombustível caracterizado como de segunda geração por não competir com a produção de alimentos, já que são produzidos a partir de biomassa não comestível, priorizando dessa forma o uso de terras férteis para produção de alimentos ao invés de energia como é o caso do perfil contemporâneo das matérias-primas para tal fim (NAIK et al., 2010; CARRIQUIRY et al., 2011). Por ser uma fonte abundante, os resíduos graxos de matadouros podem ser uma matéria-prima promissora em grandes potências agropecuárias como Estados Unidos, Brasil, União Européia (EU-

28) e China. Em 2013 estes países produziram 11,2; 9,0; 7,7 e 6,5 milhões de toneladas de carne bovina respectivamente, representando aproximadamente 85% da carne comercializada mundialmente (OECD-FAO, 2014). De maneira geral, estimasse que cerca de 10% do peso vivo do animal seja transformado em resíduos graxos dependendo da espécie, época do ano e gênero (VERHEIJEN et al., 1996).

No entanto um dos principais desafios tecnológicos a serem transpostos pelo biodiesel oriundo de resíduos graxos animais é seu alto ponto de fusão deste resíduo. Isto acarreta na produção de um biocombustível com elevado ponto de entupimento de filtro a frio, o que inviabiliza seu emprego em veículos que transitam em regiões que apresentem temperaturas abaixo de 15°C (JOSHI & PEGG, 2007; SARIN et al., 2009). Com o ponto de fusão das gorduras girando em torno de 70°C, uma demanda significativa de energia necessária para liquefazer esse resíduo e o manter nesse estado é evidenciada, desde seu transporte para a planta de processamento até as condições reacionais, contribuindo para a elevação do preço final do biodiesel oriundo dessas fontes. (DEMIRBAS et al., 2011). Outro fator que contribui de forma significativa para o preço elevado do biodiesel é o custo da matéria-prima, o que pode incentivar o uso e aplicação de resíduos nessa cadeia produtiva em contraponto aos óleos vegetais que são atualmente a fonte majoritária de insumos para a produção desse biocombustível (SILITONGA et al., 2013).

Nesse contexto, surgem os biossurfactantes, um tipo de composto com potencial para servir como coadjuvante tecnológico. Estes compostos são capazes de reduzir a tensão superficial de soluções aquosas perante a mistura de hidrocarbonetos ou outros compostos imiscíveis em água. Diferentemente dos surfactantes químicos obtidos a partir do petróleo, os biossurfactantes possuem origem biológica, sendo usualmente leveduras, fungos e/ou bactérias e suas aplicações na indústria variam desde a remediação de ambientes contaminados, controle biológico, agente recuperador de óleos e promotor de reações em meio semissólido (DESAI & BANAT, 1997; MULLIGAN, 2005). Devido a essas características, os biossurfactantes poderiam ser aplicados a fim de aperfeiçoar reações biológicas que envolvam modificações químicas de resíduos lipídicos (RUFINO et al., 2013; LUNA et al., 2015).

Diversos micro-organismos vêm sendo estudados ao longo da última década a fim de promover a união entre a produção sustentável de combustível e a

biotecnologia, seja na obtenção de produtos energéticos ou no tratamento de seus resíduos (DAMASCENO et al., 2012; AFFANDI et al., 2014; ROCHA E SILVA et al., 2014; ZOUARI et al., 2014). Tratando mais especificamente de resíduos graxos bovinos e seu potencial para conversão em biodiesel, a busca por uma microbiota capaz de ser aplicada a bioprocessos constitui uma promissora estratégia para ampliar o emprego desse resíduo como matéria-prima para biocombustíveis, seja por aplicação *in vivo* ou pelo uso de suas enzimas ou metabólitos excretados ao meio (JANG et al., 2012; SHARMA et al., 2014; MARQUES et al., 2015; ZHAO et al., 2015).

Dois micro-organismos lipolíticos que possuem aplicação na indústria são: a levedura *Yarrowia lipolytica* e a bactéria *Staphylococcus xylosus*, ambas possuindo certificação GRAS (do inglês, Generally Recognized As Safe). A primeira é comumente obtida a partir de indústrias de beneficiamento de azeite de oliva e produtos lácteos. É uma levedura aeróbia estrita que exhibe uma ampla gama de possíveis metabólitos oriundos de suas rotas metabólicas, os quais são produzidos dependendo das condições de cultivo. Algumas subespécies possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, produzir diversos ácidos orgânicos, além de biossurfactantes (BARTH & GAILLARDIN, 1997; PAPANIKOLAOU et al., 2006).

S.xylosus por sua vez, é uma bactéria coco gram positivo, usualmente usado como cultura iniciadora em produtos cárneos fermentados devido às suas características proteolíticas e lipolíticas, responsáveis pela formação do sabor e aroma, redução de peróxidos e estabilização da cor desses produtos (KOZACINSKI et al., 2008). A maquinaria genética desta bactéria permite ainda a produção de diversas lipases com possibilidade de aplicação em outros ramos da indústria, catalisando reações como acidólise, alcoólise, esterificação e transesterificação, todas com possibilidade de serem controladas a partir das condições do processo (FIEGLER & BRUCKNER, 1997; GUPTA et al., 2004; MOSBAH et al., 2006; FENG et al., 2013).

2. Hipóteses

A fermentação de resíduos graxos de bovinos por *Yarrowia lipolytica* produz biossurfactantes em quantidades significativas e dentro dos padrões de qualidade para uso no tratamento e valorização desses resíduos agroindustriais.

O biossurfactante produzido facilita a modificação da cadeia carbonada dos triglicerídeos a partir da fermentação de gordura residual bovina por *Staphylococcus xylosus*, reduzindo seu ponto de fusão.

A fermentação de gorduras bovinas por *Staphylococcus xylosus*, auxiliada pelo biossurfactante de *Yarrowia lipolytica*, transforma o resíduo graxo em matéria-prima para produção de biodiesel dentro dos padrões exigidos pela legislação pertinente.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi obter biossurfactantes produzidos por *Y.lipolytica*, com uso de resíduo graxo bovino como matéria-prima de baixo custo e aplicar esse coadjuvante no pré-tratamento de gordura bovina de forma a otimizar o bioprocessamento de modificação para queda do ponto de fusão desses resíduos, tornando-os aptos a serem convertidos em biodiesel a temperaturas mais amenas.

3.2. Objetivos específicos

- Produzir e caracterizar biossurfactante oriundo de *Y.lipolytica* obtido a partir de fermentação de resíduo graxo bovino;

- Definir uma faixa ideal de condições de processo (pH, temperatura e tempo) para obtenção de biossurfactante de *Y.lipolytica* a partir de gordura bovina, caracterizando-o quali e quantitativamente;

- Estudar uma concentração de biossurfactante que auxilie no processo de redução do ponto de fusão de resíduo graxo bovino;

- Obter biodiesel a partir de resíduos graxos bovinos de baixo ponto de fusão fermentados por *S.xylosus*.

4. Revisão Bibliográfica

4.1. Matriz energética global

A sociedade contemporânea tem infundida na sua cultura e nos seus hábitos diários o uso de diversas formas de energia para atender seus anseios por uma qualidade de vida ideal, e para tanto, produtos e processos utilizados dependem sumariamente de fornecimento ininterrupto de energia e não obstante, energia esta de qualidade, com preço competitivo e que impacte da menor forma possível o meio ambiente. A matriz energética global é composta principalmente pelo uso de combustíveis fósseis e portanto, não renováveis o que preocupa os órgãos internacionais que monitoram o tema quando projeções apontam para uma redução da oferta de petróleo e carvão em até 60% já nos próximos 15 anos, elevando os custos para sua obtenção acarretando na disparada de preços dos produtos e processos envolvidos (SINGH & SINGH, 2010; IEA, 2014; BP, 2015).

Como medida de controle para essa situação, diferentes países – merecendo destaque Brasil, Estados Unidos e parte da União Européia – tradicionais potências agropecuárias, vêm investindo no desenvolvimento de diferentes biocombustíveis (CRAGO, 2010). Além disso, os biocombustíveis são considerados menos poluentes, já que sua combustão emite uma menor taxa de monóxido de carbono, compostos sulfurados e hidrocarbonetos aromáticos (XUE et al., 2011; AN et al., 2011; SANTORI et al., 2012). Sendo renováveis, os biocombustíveis podem ser obtidos a partir de matéria pertencente ao ciclo biológico, este que é significativamente mais curto quando comparado a insumos oriundos do petróleo e carvão mineral. Dessa forma, vegetais como cana-de-açúcar, milho e soja, resíduos graxos e microalgas, constituem potenciais matérias-primas para produção de energia de forma sustentável (KNOTHE, 2010).

Sustentabilidade não é um termo novo, sendo difundido nos ramos da engenharia, ciência e tecnologia somente na última década, graças ao apoio dos órgãos governamentais e organizações que prezam o controle do desenvolvimento desordenado e ambientalmente agressivo. No entanto, ainda precisa chegar as grandes massas populacionais para permitir que a geração atual supra suas necessidades sem afetar as próximas gerações de suprirem as suas (ONU, 1987).

4.2. Classificação dos biocombustíveis

Biocombustíveis são classificados em gerações, baseado na sua matéria-prima de obtenção. A primeira geração teve seu início em meados dos anos 2000, fomentada por programas governamentais de incentivo a pesquisa e produção de energias renováveis a partir de vegetais comestíveis. Dessa forma, uma nova cadeia produtiva se consolidou e uma parcela de alimentos como soja, milho e cana-de-açúcar passou a ser destinada para a produção de energia ao invés de ser usada apenas como fontes nutricionais (RICO & SAUER, 2015). Assim, uma competição por matérias-primas se estabeleceu, causando principalmente um desequilíbrio no preço dos alimentos, pois áreas férteis estavam sendo usadas para produção unicamente de energia enquanto que cerca de 12% da população mundial sofre com a subnutrição (GOH & LEE 2011; NAIK et al., 2010).

Após cerca de uma década de produção intensiva de biocombustíveis de primeira geração, uma linha paralela de tecnologia chamava atenção por não apresentar o revés da promulgação da fome, assim os biocombustíveis de segunda geração ganharam foco dos órgãos de fomento a pesquisa. São caracterizados por não competirem com a produção de alimentos, já que são produzidos a partir de biomassa vegetal não comestível, ricos em lignocelulose, ou ainda obtidos de vegetais modificados biotecnologicamente para se adaptarem às condições adversas de cultivo (NAIK et al, 2010; HAVLIK et al., 2011; CARRIQUIRY et al., 2011). Também se enquadram nessa classificação os resíduos graxos de origem animal as microalgas, pois usam matéria-prima com custo irrisório para produção de biocombustível e podem ser obtidas com abundância, principalmente em países com produção agropecuária expressiva (CUNHA et al., 2011; NIGAN & SINGH, 2011; HAVLIK et al., 2011).

4.3. Biodiesel

Tecnicamente, biodiesel é definido como um éster alcoólico (metílico ou etílico) produzido através de uma reação de transesterificação com um álcool e um catalisador químico ou enzimático, proveniente de fontes renováveis de energia como óleos vegetais ou gorduras animais, resultando em uma mistura de ésteres de ácidos graxos e como subproduto o glicerol. Esse biocombustível está atrelado a

utilização em motores de ignição por compressão, também conhecidos como motores a ciclo-diesel, e que atendendo as especificações estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP). (BRASIL, 2005; FERRARI et al, 2005).

A reação de produção do biodiesel baseia-se na reação estequiométrica do alquil glicerol com álcool em presença de um catalisador formando ésteres alquílicos e glicerol (DEMIRBAS, 2008). Yusoff et al. (2014) relatam que os principais alcoóis usados para produção de biodiesel são os de cadeia curta, principalmente etanol e metanol resultando respectivamente em ésters etílicos e metílicos. Tratando especificamente de gordura bovina como matéria-prima, existe a preferência pelo uso do etanol na reação pois o resíduo é totalmente solubilizado a 68°C enquanto que em metanol a maior solubilidade é de apenas 19% v/v a 100°C. Além disso, o etanol é um insumo renovável e de toxicidade inferior ao metanol (Ma et al., 1998).

O processo catalítico da produção de biodiesel pode ser realizado pelo uso de catalisadores químicos, como ácidos homogêneos (H_2SO_4 , HCl, H_3PO_4) ou heterogêneos (resinas sulfuradas), bases homogêneas (NaOH, KOH) ou heterogêneas (MgO, CaO). Alternativamente, é possível o uso de lipases microbianas para acelerar a transesterificação dos triacilgliceróis (MARCHETTI et al., 2007; CHRISTOPHER et al., 2014).

Alguns parâmetros da gordura bovina precisam ser avaliados antes de submetê-la à conversão para biodiesel, sendo um deles o teor de ácidos graxos livres, pois eles competem pelo catalisador dando início a reação de saponificação paralela a transesterificação, ocasionando a queda no rendimento dos ésteres pela dificuldade de separar o do biodiesel da fração de glicerina, além da perda de catalisador que se torna irre recuperável (LOTERO et al., 2005). Outra característica indesejável da matéria-prima animal ou vegetal é o teor de umidade. Assim como os ácidos graxos livres, a água interfere negativamente na síntese de biodiesel por via alcalina, pois promulga a formação de sabão e emulsões, dificultando o processo de separação das fases do glicerol e dos ésteres, e por consequência, decai o rendimento da reação (MA et al., 1998b).

O processo de transesterificação enzimática é mais lento que os químicos, entretanto permite condições de operação mais leves acarretando na redução de gastos energéticos e evitando a corrosão dos equipamentos (HAMA & KONDO, 2013; CHRISTOPHER et al., 2014).

Segundo Jaeger & Eggert (2002), as enzimas atuantes em alcilgliceróis de cadeia acima de dez átomos de carbono liberando ácidos graxos e glicerol, são classificadas como serina hidrolases (E.C.3.1.1.3), as quais realizam catálise em sistemas com pequenas concentrações de água como em reações de esterificação, transesterificação, alcoólise, acidólise entre outras. Grande parte dessas lipases possui seletividade a enantiômeros, tornando-as atraentes para diversos segmentos industriais.

No entanto um dos grandes desafios a serem transpostos pelo biodiesel oriundo de resíduos graxos de origem animal é seu alto ponto de entupimento a frio, inviabilizando seu emprego em veículos que transitam em regiões que apresentem temperaturas abaixo de 17 °C (JOSHI & PEGG, 2007; SARIN et al., 2009). O elevado ponto de fusão das gorduras bovinas (> 70 °C) demanda um significativo consumo energético para liquefazer esse resíduo, contribuindo para a elevação do preço final do biodiesel oriundo dessas fontes, o que justifica a barreira econômica que impede a difusão desta matéria-prima no mercado de maneira significativa (DEMIRBAS et al., 2011).

4.4. Levedura com aplicabilidade industrial: *Yarrowia lipolytica*

Y.lipolytica é uma levedura dimórfica, não patogênica, ascomicética, aeróbia estrita com capacidade de produção de diversos metabólitos de uso industrial como ácidos orgânicos, açúcares e lipídios (FONTES et al., 2010). Seu uso se estende ainda a indústria energética e a interesses ambientais *devido a sua capacidade de produção de biodiesel por rota enzimática, além de sua habilidade inata de produção de enzimas específicas para esterificação e transesterificação de lipídios e também a biorremediação de áreas contaminadas principalmente por consumir derivados do petróleo (FERREIRA et al., 2009; AARTHY et al., 2014; ZINJARDE et al., 2014).

4.5. *Staphylococcus xylosus* – Características gerais

Pertencente a família das *Micrococcaceae*, *Staphylococcus xylosus* é uma bactéria mesófila, gram-positiva, anaeróbio facultativo, porém apresenta crescimento ótimo em aerobiose. É amplamente empregado na indústria de alimentos devido a sua capacidade de produzir compostos corantes, flavorizantes e de redução de nitratos, a partir da hidrólise de proteínas e lipídios, servindo como uma das culturas iniciadoras, juntamente com bactérias ácido-láticas, no processamento de queijos e

produtos cárneos fermentados em geral (CICHOSKI et al., 2011; MANSOUR et al., 2009; OLESEN & STAHNKE, 2004).

A principal característica que diferencia esse micro-organismo das bactérias patogênicas do mesmo gênero como *S. aureus* e *S. intermedius*, é sua incapacidade de produzir exoenzimas do tipo coagulase, que formam um complexo aglutinante com as fibrinas do sangue causando a coagulação sanguínea (MOSCHETTI et al., 1997).

4.6. Biosurfactantes

O ponto de ação dos surfactantes é na tensão superficial entre sólidos e fluídos, formando emulsões onde antes era obtida uma mistura entre componentes imiscíveis. Essa característica é dada pela formação de microemulsões, que permitem uma interação em nível molecular entre dois compostos que não se misturariam naturalmente (BANAT, 2010). Em contraponto aos similares sintéticos, os biosurfactantes têm origem biológica e, portanto, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade e particularmente possuem atividade em ampla faixa de pH e temperatura e são usualmente caracterizados por serem lipopeptídeos (SATPUTE et al., 2010; SOUZA-SOBRINHO et al., 2013).

Biosurfactantes são produzidos por um grande número de micro-organismos, principalmente quando expostos aos meios com substratos carbonados imiscíveis, sugerindo que algumas rotas metabólicas podem ser favorecidas através do controle dos componentes do substrato a fim de obter compostos de interesse, já que para eles, a liberação de biosurfactantes no meio facilita a solubilização da matéria orgânica e consequente absorção de energia (LIU et al., 2009; GEYS & BOGAERT, 2014). Assim como o biodiesel, o custo total para produção de biosurfactantes é altamente dependente da matéria-prima utilizada, o que favorece ainda mais o uso de resíduos no processo, o que contribui para a sustentabilidade do sistema produtivo ao destinar esse material para fins mais nobres (HAZRA et al., 2011; RAMANI et al., 2012; LUNA et al., 2015; VELIOGLU & UREK, 2015)

4.7. Ponto de fusão

O ponto de fusão de um material é dado como a temperatura na qual ele passa do estado sólido para o líquido e esse parâmetro é explicado basicamente

pela estrutura e conformação química do mesmo. Dessa maneira, o ponto de fusão de ácidos graxos está relacionado com a capacidade que as moléculas têm de aproximarem-se uma as outras permitindo que ocorra atração entre moléculas de polaridade semelhante e por consequência, aumentando a energia necessária para ocasionar um afastamento entre elas, resultando em um ponto de fusão mais elevado. Assim, tanto o número de átomos de carbono quanto a existência de ligações trans ao longo da cadeia carbonada afetam proporcionalmente o ponto de fusão, e inversamente, influenciam o número de pontos de insaturação da molécula, por ocasionar impedimento estérico entre as cadeias resultando em forças de Van der Waals mais fracas, baixando o ponto de fusão (TURATTI et al., 2002; ATKINS & LORETA, 2006).

A única diferença entre um óleo e uma gordura é seu estado físico em temperatura ambiente, sendo o primeiro líquido e o último sólido. Esse fator é explicado pelo número de insaturações ao longo da cadeia dos triglicerídeos o que caracteriza os óleos vegetais e ácidos graxos essenciais como óleos enquanto que resíduos graxos de origem animal estão sob a forma de gordura (ANASTOPOULOS et al., 2009). A Tab. 1 a seguir representa o teor de ácidos graxos presentes em gorduras animais e óleos vegetais, e seus respectivos Pontos de Fusão (PF).

Tabela 1 - Ácidos graxos de gorduras animais, óleos vegetais e respectivas porcentagens e pontos de fusão

Ácido	Nomenclatura	Gorduras animais (%)			Óleos Vegetais (%)			PF (°C)
		Bovino	Suíno	Frango	Soja	Girassol	Canola	
Láurico	12:0	0,15	0,15	0,10	*	-	-	44,8
Mirístico	14:0	3,00	1,35	1,00	*	*	*	54,4
Palmítico	16:0	23,90	24,06	20,74	9,09	6,20	4,90	62,9
Esteárico	18:0	19,05	13,95	6,74	2,17	3,70	1,60	70,1
Oléico	18:1 (n-9)	38,20	41,84	42,68	35,34	25,20	33,0	16,3
Linoléico	18:2 (n-6)	3,10	9,70	20,68	53,40	63,10	20,40	- 5,0
Linolênico	18:3 (n-3)	0,60	0,95	1,30	*	0,30	7,90	- 11,0
Araquidônico	20:4 (n-6)	0,20	1,70	0,10	*	0,20	9,30	- 49,5
Behênico	22:0	-	-	-	*	0,70	-	80,0
Erúcico	22:1 (n-9)	-	-	-	*	0,10	23,0	33,8
Lignocérico	24:0	-	-	-	*	0,20	-	84,0

Fonte: Adaptado de ORDÓNEZ, 2005; ROSTAGNO et al., 2011; HINGU et al., 2010; ANASTOPOULOS et al., 2009

* Não detectado

Projeto de pesquisa

ESTABILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUTRIAIS TRATADOS PELO SISTEMA DE COMPOSTAGEM, registrado sob o número 6631 sob coordenação do Prof. Dr. Érico Kunde Corrêa, vinculado ao Centro de Engenharias da Universidade Federal de Pelotas.

Relatório de campo

Os procedimentos, equipamentos e técnicas empregadas estão detalhadamente descritas a seguir dentro das seções de “Material e Métodos” dos respectivos artigos científicos propostos.

ARTIGO 1 – POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO DE RESÍDUO GRAXO BOVINO POR YARROWIA LIPOLYTICA

1. INTRODUÇÃO

Compostos surfactantes são aqueles com a peculiaridade de reduzir a tensão superficial de líquidos, sendo normalmente usados com intuito de solubilizar moléculas antes imiscíveis, favorecendo reações químicas e biológicas em estado semissólido. Os similares de origem biológica são denominados biossurfactantes e são amplamente empregados como coadjuvantes em biorremediação de áreas degradadas por derivados de petróleo e outros compostos hidrofóbicos, pois viabilizam a dissolução e consequente degradação da matéria orgânica pela microbiota presente no meio (DESAI & BANAT, 1997; RUFINO et al., 2013). Além disso, biossurfactantes são biodegradáveis, possuem alta especificidade e baixa toxicidade e são obtidos a partir de uma determinada gama de micro-organismos como bactérias, leveduras e alguns fungos (GAUTAM & TYAGI, 2006; CAMPOS et al., 2014).

Os substratos comumente utilizados como fonte de nutrientes para propiciar a liberação de biossurfactantes, são alcanos de cadeia longa ou outra fonte de matéria-orgânica biodegradável naturalmente imiscível em água. Esse fato caracteriza o efeito indutivo da fonte de carbono nos micro-organismos, induzindo-os a se adaptarem as condições do meio para extraírem energia, enquanto liberam metabólitos de interesse (SARAVANAN & VIJAYAKUMAR, 2014; BEN BELGACEM et al., 2015). De forma que o custo final de obtenção do biossurfactante provém da matéria-prima utilizada, fica evidente a importância do uso de substratos de baixo custo e abundantes como é o caso de resíduos graxos bovinos. Assim, o impacto econômico e ambiental causado pela geração destes resíduos pode ser reduzido, quando novas rotas alternativas para uso mais nobre são desenvolvidas (FONTES et al., 2010. DAMASCENO et al., 2012).

A produção de biossurfactantes é altamente dependente do tipo de micro-organismo usado, bem como da fonte de matéria orgânica disponibilizada no meio

(MNIF et al., 2013; LONG et al., 2014). Desse modo, a *Yarrowia lipolytica*, uma levedura dimórfica, não patogênica, ascomicética, aeróbia estrita com capacidade de produção de diversos metabólitos de uso industrial como ácidos orgânicos, açúcares e lipídios se destaca por sua aplicabilidade em diferentes setores, podendo ser aplicada também na indústria energética e para fins de interesse ambiental. Esta levedura apresenta capacidade de produção de biodiesel por rota enzimática, além de sua habilidade inata de produção de enzimas específicas para esterificação e transesterificação de lipídios e também a biorremediação de áreas contaminadas principalmente por consumir derivados do petróleo a partir da produção de biossurfactantes (FERREIRA et al., 2009; FONTES et al., 2010; AARTHY et al., 2014; ZINJARDE et al., 2014).

Diversos estudos estão descritos na literatura a fim de estabelecer possíveis substratos para produção de metabólitos de interesse industrial pela *Y. lipolytica*, tais como glicerol (AMARAL et al., 2009; RYWINSKA et al., 2013), óleo diesel (SOUZA et al., 2012) e resíduos de agroindústrias (DUBEY & JUWARKAR, 2001; FONTES et al., 2012; LUNA et al., 2015). No entanto, o efeito do uso de resíduo graxo bovino como fonte de carbono e indutor da produção de biossurfactantes por *Y. lipolytica* ainda é desconhecido. Não obstante, o emprego dos mais diversos substratos na fermentação caracteriza usualmente uma dispersão com não mais de 10% de sólidos no mosto, abrindo uma oportunidade para utilização de quantidades mais significativas de resíduo no meio fermentativo (LUNA et al., 2015).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi obter biossurfactantes a partir da fermentação em elevada concentração de resíduos graxos de origem animal por *Yarrowia lipolytica*, caracterizando o biossurfactante quanto às suas propriedades emulsificantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e armazenamento das amostras

As amostras de resíduo graxo bovino foram coletadas em frigorífico-abatedouro da região Sul do Estado do Rio Grande do Sul. A gordura bovina foi obtida a partir de animais recém-abatidos e durante a evisceração das carcaças. Foram coletadas amostras do invólucro renal graxo de 25 animais abatidos, cada uma com massa aproximada de 1,4 kg. A coleta nesse ponto visou pré-selecionar

resíduos com o menor resquício de sangue possível, contribuindo para a homogeneidade das amostras.

Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas em caixa térmica com gelo até o Núcleo de Educação, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade da Universidade Federal de Pelotas, onde, assepticamente, as amostras foram fracionadas e estocadas a temperatura de -18°C até o momento das análises. Previamente a cada análise, porções das amostras eram descongeladas durante a noite sob-refrigeração a 4°C .

2.2. Obtenção e cultivo das cepas estoque

Culturas estoque de *Y.lipolytica* NRRL YB-423 foram utilizadas no experimento. Uma cultura leve foi retirada com agulha para tubos de ensaio contendo ágar YM (*Yeast Malt*; glicose 1%; peptona 0,5%; extrato de malte 0,3%; extrato de levedura 0,3%; ágar-ágar 2%) inclinado e posteriormente foram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ por 48 h ou até a produção de biomassa visível. A fermentação foi conduzida usando caldo YM como fase aquosa, conforme composição descrita acima, exceto ágar-ágar.

2.3. Caracterização dos resíduos graxos bovinos

Os parâmetros de caracterização do resíduo graxo bovino *in natura* usado no experimento estão apresentados na Tabela 1, onde é possível observar que os parâmetros de acidez livre, índice de saponificação e matéria mineral estão de acordo com os valores encontrados na literatura para gordura bovina. O índice de iodo da gordura usada no experimento apresentou um valor menor do encontrado por Moraes et al. (2008), reflexo da alta saturação das cadeias dos triglicerídeos. Os teores de umidade e impurezas encontrados foram superiores aos relatados por Mendonça et al. (2011), caracterizando a gordura *in natura* usada com 0,20% de umidade e 1,92% de impurezas.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas da gordura residual bovina in natura usada como substrato para produção de biossurfactante. Resultados expressos como médias \pm desvio padrão obtidos de triplicata experimental.

Parâmetro	Gordura bovina <i>in natura</i>	Referencial	Referência
Acidez livre (mg KOH.g ⁻¹)	0,603 \pm 0,076	0,69	Moraes et al. (2008)
Índice de saponificação (mg KOH.g ⁻¹)	189,19 \pm 2,51	193-202	Dogan (2013)
Índice de iodo (g I ₂ . 100g ⁻¹)	12,00 \pm 0,061	44,65	Moraes et al. (2008)
Umidade (% m/m)	0,20 \pm 0,04	0,01	Mendonça et al. (2011)
Matéria mineral (% m/m)	ND	< 0,01	Mendonça et al. (2011)
Impurezas (% m/m)	1,92 \pm 0,05	0,16	Mendonça et al. (2011)

ND: não detectado

2.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental aplicado seguiu arranjo completamente casualizado, com três repetições, em esquema fatorial sendo o fator de tratamento “concentração de gordura” (0; 25; 40; 55; 70% m/v), durante 72h de processo e 150 rpm. Nestas condições, as variáveis dependentes foram agrupadas de acordo com a matriz analítica, para a gordura in natura foi procedida às análises de “acidez livre”, “índice de saponificação”, “índice de iodo”, “teor de umidade”, “teor de cinzas” e “teor de impurezas”. Ao final da fermentação, foram determinados a partir do mosto os teores de biomassa produzida expressa como “biomassa seca”, concentração de biossurfactante bruto produzido e índice de emulsificação.

Para avaliação do parâmetro “pH”, foi introduzido um segundo fator de tratamento no mesmo experimento “tempo de fermentação” (0; 12; 24; 36; 48; 60; 72

h), mensurando o pH a cada intervalo a partir de alíquotas de todos os reatores com as diferentes concentrações de gordura.

2.5. Processo fermentativo

O cultivo foi conduzido em fermentação semissólida em batelada. O resíduo graxo bovino foi constituinte insolúvel e fonte de carbono e material de ancoragem para as leveduras, caldo YM como fase aquosa e fonte primária de nitrogênio e secundária de carbono, e por fim, o inóculo (1% v/v). O inóculo foi obtido a partir de inoculação prévia em ágar YM e incubados a 30°C por 48 h. O volume total nos reatores foi de 200 mL. O meio permaneceu com duas fases distintas ao longo do processo.

As amostras de gordura bovina foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e após adição do caldo YM, foram homogeneizadas em “Stomacher” por 2 min e transferidos para erlenmeyers onde foi procedida a fermentação.

2.6. Análises físico-químicas das gorduras bovinas

Os resíduos graxos bovinos foram caracterizados quanto aos seus valores de acidez livre, índice de saponificação e índice de iodo. A acidez livre foi determinada segundo método EN 14104:2003 (EN Standard, 2003) onde uma alíquota da amostra de gordura foi previamente pesada e solubilizada em solução de etanol/água, seguindo da adição de indicador fenolftaleína e titulação com NaOH.

O índice de saponificação foi determinado de acordo com as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz – IAL 328/IV e American Oil Chemists Society – AOCS Cd 3-25 (IAL, 2008; AOCS, 2013) com modificações, onde uma alíquota da gordura bovina foi macerada, seca e filtrada e então uma massa aproximada de 4 g foi pesada para análise. O analito foi colocado em um balão previamente tarado onde foram adicionados 50 mL de solução alcoólica de KOH, levando o frasco para aquecimento até ebulição do solvente em manta térmica, acoplado um sistema de condensação na saída do balão. A reação ocorreu por 80 min e, após resfriamento, foi adicionado indicador fenolftaleína e titulado com HCl padronizado até viragem do indicador da coloração rósea para incolor. O índice de saponificação foi expresso em mg de KOH consumido por g de amostra.

O índice de iodo foi determinado pelo método de Wijs segundo metodologia descrita por AOAC International – AOAC Official Method 993.20 (AOAC, 2000).

O teor de impurezas caracteriza quantitativamente a presença de sangue e tecido conjuntivo na gordura bovina e foi determinado por fusão da gordura bovina em aproximadamente 75°C seguido de filtração na mesma temperatura com auxílio de papel filtro quantitativo Unifilm® ($\varnothing = 4\sim 7\mu\text{m}$), obtendo a massa de impureza por gravimetria.

2.7. Análises de pH

Ao longo do tempo de fermentação alíquotas do mosto foram assepticamente retiradas a fim de determinar o pH, que foi determinado utilizando um peagâmetro digital MS Tecnopeon® modelo mPA-210.

2.8. Determinação de biossurfactante – Técnica do espalhamento de óleo

Para determinação quantitativa de biossurfactantes produzidos, o sobrenadante livre de células foi obtido via centrifugação (9000 x G) e submetido ao teste do espalhamento de óleo conforme metodologia adaptada de Fontes et al. (2010). Em uma placa de petri foram adicionados 30mL de água destilada e em seguida, 400 μL de óleo mineral. No centro da superfície oleosa formada foram adicionados 150 μL do sobrenadante livre de células, e após 1min, foi observado o diâmetro da zona límpida formada. Para obtenção da concentração do biossurfactante, uma curva padrão foi construída seguindo os mesmos procedimentos com concentrações conhecidas de solução aquosa do padrão Dodecil Sulfato de Sódio (DSS – 0; 300; 400; 500; 600; 700; 1000; 1500; 2000; 2500mg.mL⁻¹). Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

2.9. Índice de emulsificação (IE)

O índice de emulsificação foi obtido conforme metodologia descrita por Luna et al. (2015), onde uma alíquota de 2 mL do biossurfactante bruto livre de células foi adicionado em um tubo de ensaio e em seguida adicionado 2 mL de óleo automotivo 10W-40. O tubo foi agitado em vórtex por 2 min e deixado em repouso a temperatura ambiente por 24h. Após esse período, foram mensuradas com auxílio de paquímetro digital a altura da camada emulsificada (mm) e a altura total das fases (mm). O IE foi

calculado a partir da divisão da altura da fase emulsificada pela altura total das fases e expressa em percentagem, conforme Equação 1.

$$IE (\%) = \frac{\text{altura da camada emulsificada (mm)}}{\text{altura total das fases (mm)}} \times 100 \quad (1)$$

2.10. Análise estatística

Foi realizado teste de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, a homocedasticidade das amostras pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos por análise gráfica. As variáveis foram normalizadas e foram submetidas a análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$). Averiguando significância estatística, os dados foram analisados via regressão não-linear com ajuste ao modelo polinomial e ao modelo linear-plateau, descritos na Equações 2 e 3 respectivamente.

$$y = y_0 + ax + bx^2 \quad (2)$$

$$y = \begin{cases} \frac{y_1(T_1-x) + y_2(x-x_{min})}{T_1-x_{min}}, & x_{min} \leq x \leq T_1 \\ \frac{y_2(x_{max}-x) + y_3(x-T_1)}{x_{max}-T_1}, & T_1 \leq x \leq x_{max} \end{cases} \quad (3)$$

Onde, “y” foram as variáveis resposta estimadas, “y₀”, “a” e “b” as constantes das equações e “x” a concentração de gordura no mosto.

O parâmetro pH foi avaliado pela metodologia de superfície de resposta onde os dados foram ajustados à uma equação polinomial de segunda ordem (Eq. 4) gerada por análise de regressão. A resposta foi inicialmente ajustada para os fatores por regressão múltipla. A seleção do modelo foi baseada em: (a) baixo valor residual; (b) baixo p-value; (c) baixo desvio padrão; (d) alto valor de R² e R² ajustado.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (4)$$

onde “y” é o valor resposta estimado (pH), x_i é o primeiro fator independente (concentração de gordura), x_j é o Segundo fator independente (tempo de fermentação), β₀ é o intercepto, β_i e β_j são os coeficientes de primeira ordem, β_{ii} e β_{ij}

são os coeficientes quadráticos para os fatores i e j . Por fim, o coeficiente β_{ij} é o coeficiente linear para a interação entre os fatores de tratamento i e j . Todos os dados foram analisados com auxílio do software *The R Project* (versão 3.1.0) da *The R Foundation*®.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação do pH

Os valores estimados entre os fatores de tratamento estão apresentados na Tabela 2. O nível de significância (p) indica que somente o intercepto e o coeficiente linear do fator “tempo de fermentação” são significativos ($p < 0,05$). Nenhum dos coeficientes estimados para o fator “concentração de gordura” apresentaram significância estatística ($p > 0,05$) em nenhuma forma matemática, sugerindo que o comportamento do pH foi influenciado unicamente pelo tempo de fermentação de maneira linear e de forma isolada, visto que o fator que representa a interação entre ambos também não apresentou significância estatística ($p > 0,05$).

Dessa forma, o comportamento do pH foi avaliado somente perante os fatores significativos (tempo de concentração) e os novos coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 2. Assim, foi possível plotar a variação do pH ao longo do tempo de fermentação (Figura 1), onde é possível observar uma queda no pH do meio fermentativo conforme transcorre o processo, partindo de um pH estimado de 5,70 e atingindo uma faixa mínima de pH estimado em 4,45 para períodos acima de 48 h de fermentação.

Tabela 2 – Resumo estatístico com os coeficientes estimados, erro padrão, t value, e a significância do modelos para a variação do pH durante a fermentação dos resíduos graxos bovinos por *Y.lipolytica* e das curvas de regressão para o índice de emulsificação, biomassa produzida e concentração de biossurfactante obtido

Fator	Estimado	DF	Erro padrão	t	p	r ²
<i>pH – Superfície de resposta*</i>						0,867
Intercepto	6,069	71	0,110	54,83	< 0,001	
X ₁	-0,003	71	0.003	-1,202	0,234	
X ₂	-0,080	71	0.005	-15,325	< 0,001	
X ₁ ²	0,0004	71	522,3	-8,18.10 ⁻⁷	1	
X ₂ ²	0,0004	71	522,3	-8,18.10 ⁻⁷	1	
X ₁ X ₂	-7,82.10 ⁻⁵	71	5,61.10 ⁻⁵	-1,392	0,168	
<i>pH – Regressão</i>						0,782
y1	5,952	161	0,035	169,016	< 0,001	
y2	4,565	161	0,070	64,819	< 0,001	
y3	4,227	161	0,045	93,918	< 0,001	
T1	27,777	161	1,898	14,634	< 0,001	
<i>Índice de emulsificação</i>						0,830
Intercepto	48,78	10	5,676	8,594	< 0,001	
a	0,221	10	0,086	-5,303	< 0,001	
b	-0,009	10	0,001	3,537	< 0,001	
<i>Biomassa</i>						0,873
Intercepto	0,680	11	0,081	4,336	0,003	
a	0,136	11	0,016	8,295	< 0,001	
<i>Concentração de biossurfactante</i>						0,984
y1	230,778	10	23,783	9,703	< 0,001	
y2	193,755	10	36,670	5,589	< 0,001	
y3	850,033	10	21,711	39,152	< 0,001	
T1	36,527	10	2,139	17,078	< 0,001	

*X₁: Concentração de gordura (% m/v); X₂: Tempo de fermentação (h);

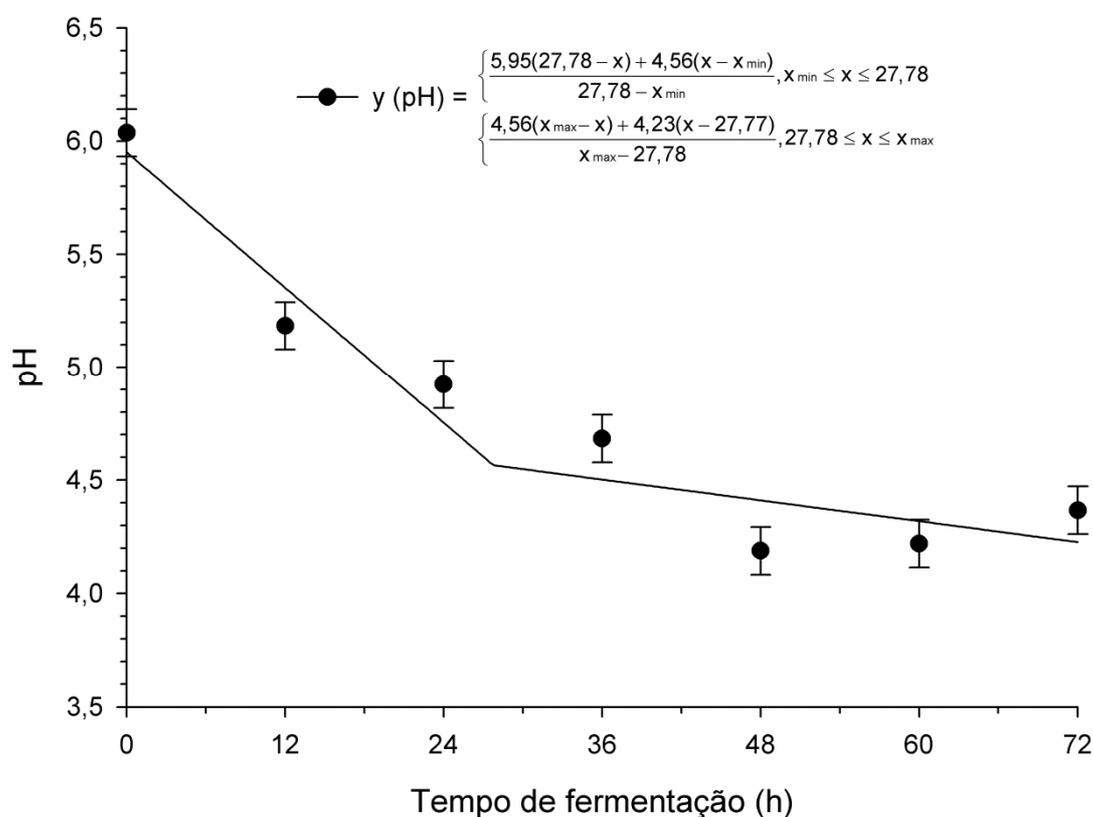


Figura 1 – Efeito do tempo de fermentação no pH do mosto fermentado por *Y. lipolytica*.

3.2. Avaliação dos parâmetros ao final da fermentação

Na Figura 2 estão demonstrados os efeitos da concentração da gordura no meio fermentativo perante a concentração e o índice de emulsificação do biossurfactante bruto produzido pela *Y. lipolytica*, bem como a biomassa obtida ao final da fermentação. Observando a Fig. 2A, é possível visualizar que *Y. lipolytica* produziu biossurfactantes com maior índice de emulsificação na faixa de concentração de resíduo graxo compreendida entre 10% e 40%, no qual apresentou emulsificação de 50,08 (x=10) e 43,18% (x=40) respectivamente, sem diferença significativa entre ambas ($p > 0,05$), enquanto que quando as concentrações de gordura anteriores e posteriores a essa faixa, o índice de óleo emulsificado foi significativamente menor ($p < 0,05$).

A Fig. 2b demonstra que a produção de biomassa possui relação positiva a concentração de gordura, tendo produzido $10,20 \text{ g.L}^{-1}$ (x=70) de biomassa seca ao final de 72 h de fermentação, valor significativamente maior que nas concentrações

de resíduo graxo inferiores ($p < 0,05$), demonstrando uma alta aptidão das leveduras para crescer em meios com elevada presença de gordura bovina, quando partiu de $0,68\text{g.L}^{-1}$ ($x=0$) para o tratamento controle. O mesmo comportamento observado para a biomassa também pode ser visto para a produção quantitativa de biossurfactantes (Fig. 2c) onde a maior produção foi observada em 70% de gordura no meio, tendo um estimado de $830,21\text{mg.L}^{-1}$ ($x=70$), o que foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a concentração de resíduo graxo mais próxima testada, onde é possível averiguar uma produção estimada de $631,25\text{mg.L}^{-1}$ ($x=55$). Cabe ressaltar que a produção de biossurfactantes permaneceu significativamente constante ($p > 0,05$) nos mostos com menos de 40% de resíduo graxo bovino, apresentando uma concentração estimada entre $230,78\text{mg.L}^{-1}$ e $243,01\text{mg.L}^{-1}$ ($x=0$ e $x=40$, respectivamente).

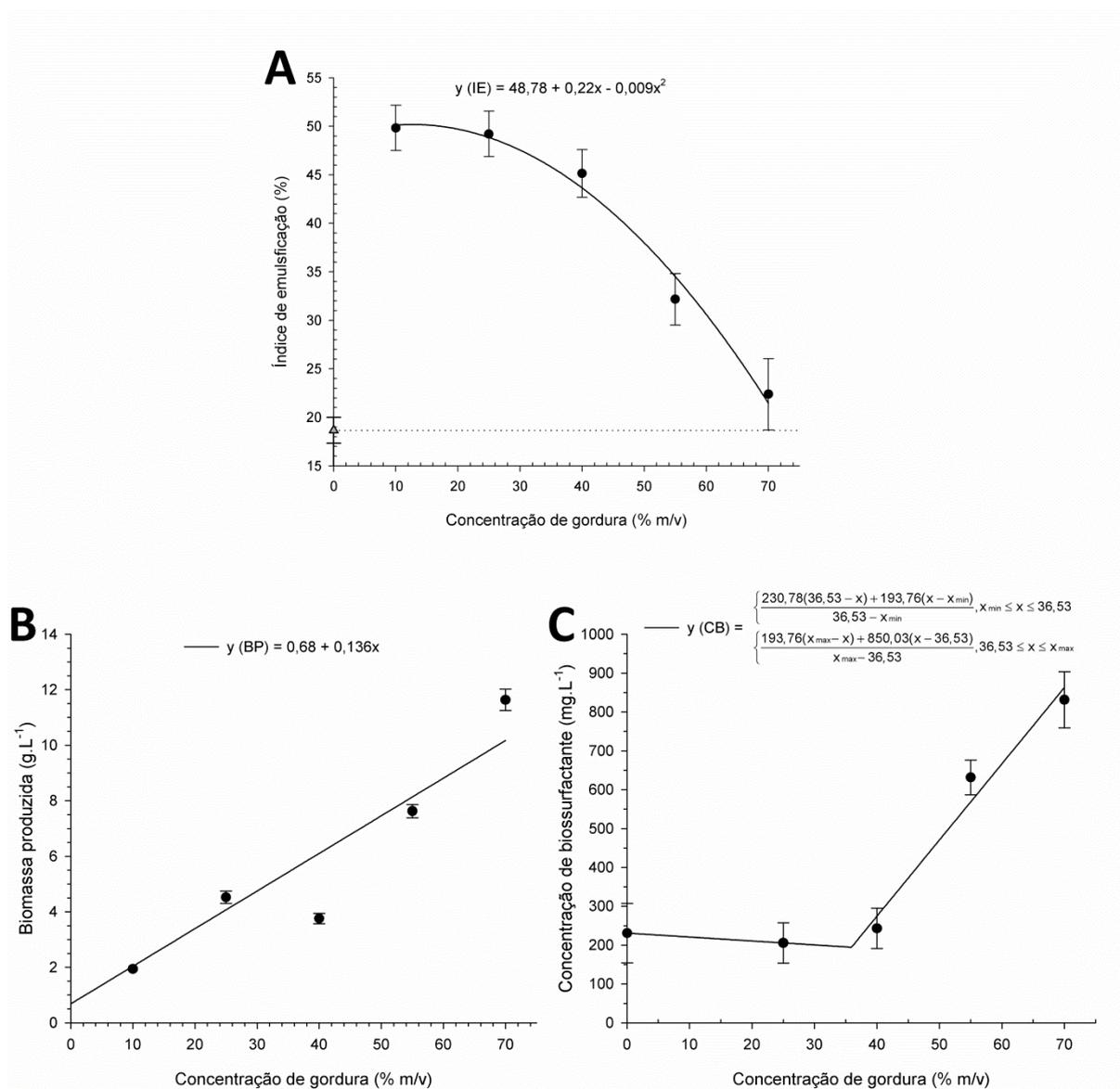


Figura 2 – Efeito de concentração de gordura dispersa no mosto e sua relação com o índice de emulsificação do biossurfactante produzido (A), com a biomassa de *Y.lipolytica* produzida (B) e com a concentração de biossurfactante liberada no meio (C).

4. DISCUSSÃO

4.1. pH

Aplicando os parâmetros calculados na Tab. 2 na Eq. 2, podem ser estimados os valores de pH para um amplo espectro de condições experimentais que podem ocorrer durante as 72 h de processo fermentativo mensuradas neste estudo. A variação no pH pode ser explicada pela capacidade de *Y.lipolytica* em produzir

diversos ácidos orgânicos, principalmente ácido cítrico a partir de 72 h de fermentação, em diversas faixas de relações carbono:nitrogênio do mosto (LEVINSON et al., 2007). Devido a facilidade em extrair energia de diversas formas de carbono orgânico, *Y.lipolytica* não teve seu metabolismo inibido pela presença resíduo graxo bovino em diversas concentrações no meio, demonstrando que sua atividade é mantida mesmo em concentrações de nutrientes de fácil absorção menores do que o ideal (ZHAO et al., 2015).

Dulermo et al. (2015) relatam a importância da manutenção do pH baixo para *Y.lipolytica* está intimamente ligada a sua capacidade de produzir ácidos graxos intracelulares, devido à ativação da enzima ATP:Citrato liase que é especificamente responsável pela produção desses compostos a partir do citrato obtido no ciclo de Krebs.

4.2. Biossurfactante e biomassa

O biossurfactante produzido apresentou um índice de emulsificação máximo próximo a 45% (Fig. 2A) o que está de acordo com o relatado por Fontes et al. (2010) que atingiram um IE de até 40% cultivando *Y.lipolytica* em meios com diferentes fontes de carbono e velocidade de agitação dos frascos. Luna et al. (2015) obtiveram biossurfactantes com diferentes IE perante óleo automotivo (78,12%), óleo de soja (21,74%) e óleo de milho (24,0%), a partir do cultivo de *Candida sphaerica* em meios contendo os últimos dois substratos, esse fato sugere que a presença de nitrogênio no meio de cultura desloca o metabolismo da levedura para a produção de biomassa ao invés de produção de compostos que agiriam na tensão superficial da fonte de carbono imiscível (KIM et al., 2006). Zinjarde et al. (2014) reportam que a liberação de compostos ao meio extracelular é altamente dependente da afinidade entre os compostos do meio externo e interno, indicando que ao utilizar uma gordura de alta saturação como substrato hidrofóbico, favoreceria a liberação de biossurfactantes ao meio fermentativo ao contrário de óleos vegetais de alta insaturação.

Os resultados de biomassa seca produzida (Fig. 2B) indicam que o meio fermentativo permaneceu próprio para o crescimento de *Y.lipolytica* não importando a composição do mosto. Isto sugere que a levedura pode retirar energia tanto do meio de cultivo quando do resíduo graxo aplicado. Rufino et al. (2014) cultivaram

Candida lipolytica UCP 0988 em meio mineral, suplementado com 6% de resíduo industrial de óleos vegetais e 1% de ácido glutâmico, obtendo rendimentos de biomassa no em torno de $10,5 \text{ g.L}^{-1}$, o que é plausível com o encontrado neste trabalho, já que usualmente os biossurfactantes são excretados da célula durante as fases de crescimento logarítmica e/ou estacionária (LIN, 1996). Os microorganismos em geral têm a capacidade de desviar substratos para diferentes rotas metabólicas a fim de melhor se adaptarem ao estresse aplicado pelo meio, conforme relatam trabalhos na literatura, as condições de cultivos são de sumária importância para produção tanto de biomassa, quando de outros metabólitos de interesse (ABEER et al., 2014; VELIOGLU & OZTURK UREK, 2015).

Outro fator que pode ter contribuído para a produção de biomassa mesmo nas concentrações com menos meio de cultura e conseqüente menos nitrogênio disponível, foi a presença de impurezas na gordura, principalmente os resquícios de sangue oriundos da linha de processamento. Estes contaminantes podem ter sido fonte de nitrogênio, limitante nos reatores com menor quantidade de caldo YM, para dentro do mosto, favorecendo o crescimento celular mesmo nestas condições (STAJIC et al., 2006; FONSECA et al., 2007). Atrelado a esse fator, a produção de biossurfactante significativamente mais elevada ($p < 0,05$) encontrada a partir de 40% de gordura no meio indica que *Y.lipolytica* tem propensão a liberação de biossurfactante em sua fase de crescimento exponencial. No entanto, quando a concentração do biossurfactante (Fig. 2C) é comparada com o IE, é notável que houve uma mudança no perfil do composto liberado, já que ambos não apresentaram o mesmo comportamento ao longo da concentração de resíduo graxo no meio. George & Jayachandran (2009) relata a existência de uma Concentração Micelar Crítica (CMC), dada como a concentração máxima de surfactante que causa a maior queda na tensão superficial da fase aquosa, e a partir dela há a formação de micelas de gordura ao invés da queda na tensão superficial e acrescenta ainda que, os melhores biossurfactantes são aqueles com menores valores de CMC, de forma que menores quantidades deles são necessários para reduzir a tensão superficial ao máximo.

Ainda observando esses fatores, Wadekar et al. (2012) aplicaram diferentes fontes de carbono durante a fermentação de óleos vegetais, obtendo diversas concentrações de biossurfactantes baseado na fase de crescimento em que o micro-

organismo estava, sugerindo que mudanças no meio de cultura podem afetar seus metabólitos produzidos naquele momento em diante. Portanto, a queda significativa no IE do caldo livre de células obtido neste experimento, em níveis superiores a 55% de resíduo graxo disperso no meio fermentativo (Fig. 2A) pode ter sido causada pela extrapolação do CMC e consequente formação de micelas de gordura, o que dificultou o ataque microbiano as cadeias lineares dos ácidos graxos que passaram de um estado disperso e fisicamente passível de sofrer ataque por *Y.lipolytica*, para um estado aglomerado e com maior proteção a ação das leveduras, forçando as mesmas a priorizar outras rotas metabólicas para absorção de matéria e energia. Dessa forma, é importante ressaltar que as características do meio fermentativo devem ser cuidadosamente controladas a fim de não exceder a CMC, o que pode causar uma queda da emulsificação dos biossurfactantes produzidos.

5. CONCLUSÃO

Através desse trabalho é possível concluir que, a levedura *Y.lipolytica* têm potencial para produzir biossurfactantes a partir de fermentação em alta concentração de resíduos graxos bovinos, com índices de emulsificação dentro dos parâmetros de outros compostos tensoativos similares obtidos de outras fontes de carbono. O biossurfactante obtido apresentou índice de emulsificação máximo de aproximadamente 45% na faixa de concentração de gordura bovina dispersa no meio compreendida entre 25 e 40% m/v, sendo que nessa mesma faixa foram produzidos entre 205,44 e 243,01 mg.L⁻¹ de biossurfactante respectivamente.

6. REFERÊNCIAS

- AARTHY M, SARAVANAN P, GOWTHAMAN MK, ROSE C, KAMINI NR. Enzymatic tranesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**. v.92, p.1591-1601, 2014.
- ABEER MM, AMIN MCIM, LAZIM AM, PANDEY M, MARTIN C. Synthesis of a novel acrylated abietic acid-g-bacterial cellulose hydrogel by gamma irradiation. **Carbohydrate Polymers**. v.110, p.505-512, 2014.
- AMARAL PFF, FERREIRA TF, FONTES GC, COELHO MAZ. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**. v.87, p.179-186, 2009.

- American Oil Chemist Society – AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. 6th Edition. Official method Cd 3-25. 2013.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. v. 2, 17TH ed. Gaithersburg - USA: AOAC. Official method 993-20. 2000.
- BAIÃO NC, LARA LJC. Oil and fat in broiler nutrition. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.7, p.129-141, 2005.
- BANKJOVIC-ILIC IB, STOJKOVIC IJ, STAMENKOVIC OS, VELJKOVIC VB, HUNG Y. Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 32, p.238-254, 2014.
- BEN BELGACEM Z, BIJTTEBIER S, VERRETH C, VOORSPOELS S, VAN DE VOORDE I, AERTS G, WILLEMS KA, JACQUEMYN H, RUYTERS S, LIEVENS B. Biosurfactant production by Pseudomonas strains isolated from floral nectar. **Journal of Applied Microbiology**. v.118, p.1370-1384, 2015.
- CAMPOS JM, STAMFORD TL, SARUBBO LA. Production of bioemulsifier with potential application in the food industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.172, p.3234-3252, 2014.
- CENGIZ O, SEHMUS A. Biodiesel production from inedible animal tallow and a experimental investigation of its use as an alternative fuel in a direct injection diesel engine. **Applied Energy**. v.86, p.14-20, 2009.
- DAMASCENO FRC, CAMMAROTA MC, FREIRE DMG. The use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.95, p.241-246, 2012.
- DESAI JD, BANAT IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.61, p.47-64, 1997.
- DOGAN TH, TEMUR H. Effect of fractional winterization of beef tallow biodiesel on the cold flow properties and viscosity. **Fuel**. v.108, p.793-796, 2013.
- DUBEY K, JUWARKAR A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.17, p.61-69, 2001.
- DULERMO R, MELÉNDEZ HG, AMARO RL, THÉVENIEAU F, NICAUD JM. Unraveling fatty acid transport and activation mechanisms in Yarrowia lipolytica. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1851, p.120-1217, 2015.

DUNNE PG, MONAHAN FJ, O'MARA FP, MOLONEY AP. Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history.

Meat Science. v.81, p.28-45, 2009.

EN Standards. *Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of Ester and linolenic acid methyl ester contents.* EN 14103. 2003.

FERREIRA T, AZEVEDO D, COELHO MA, ROCHA-LEÃO MH. The crude oil degrading potential of *Yarrowia lipolytica*. **New Biotechnology.** v.25, p.S80 – S81, 2009.

FONSECA RR, SILVA AJR, DE FRANÇA FP, CARDOSO VL, SÉRVULO EFC. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** v.137, p.471-486, 2007.

FONTES GC, AMARAL PFF, NELE M, COELHO MAZ. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** v. 2010, Article ID 821306, 8 pages, 2010.

FONTES GC, RAMOS NM, AMARAL PFF, NELE M, COELHO MAZ. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering.** v.29, p.483-493, 2012.

GAUTAM KK, TYAGI VK. A review of microbial surfactant. **Journal of Oleo Science.** v.55, p.155-166, 2006.

GEORGE S, JAYACHANDRAN K. Analysis of rhamnolipids biosurfactants produced through submerged fermentation using Orange fruit peelings as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** v.158, p.694-705, 2009.

Instituto Adolfo Lutz – IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª Edição. 1ª Edição digital. Método IAL 328/IV. 2008.

KIM HS, JEON JW, KIM BH, AHN CY, OH HM, YOON BD. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 70, p. 391–396, 2006.

LEVINSON WE, KURTZMAN CP, KUO TM. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme and Microbial Technology.** v.41, p.292-295, 2007.

- LIN SC. Biosurfactants: Recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.66, p.109-120, 1996.
- LONG X, MENG Q, ZHANG G. Application of biosurfactant rhamnolipid for cleaning of UF membrane. **Journal of Membrane Science**. v.457, p.113-119, 2014.
- LUNA JM, RUFINO RD, JARA AMAT, BRASILEIRO PPF, SARUBBO LA. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v.480, p.413-418, 2015.
- MA, F. R.; CLEMENTS, L. D.; HANNA, M. A. The effects of catalyst, free fatty acids, and water content on transesterification of beef tallow. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**. v.41, p.1261-1264, 1998.
- MENDONÇA DR, ANDRADE HMC, GUIMARÃES PRB, VIANNA RF, MENEGHETTI SMP, PONTES LAM, TEIXEIRA LSG. Application of full factorial design and Doehlert matrix for the optimization of beef tallow methanolysis via homogenous catalysis. **Fuel Processing Technology**. v.92, p.342-348, 2011.
- MNIF I, ELLOUZE-CHAABOUNI S, GHRIBI D. Economic production of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant using local agro-industrial wastes and its application in enhancing solubility of diesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v.88, p.779-787, 2013.
- MORAES MAS, KRAUSE LC, CUNHA ME, FACCINI CS, MENEZES EW, VESES RC, RODRIGUES MRA, CARAMÃO EB. Tallow biodiesel: Properties evaluation and consumption tests in a diesel engine. **Energy & Fuels**. v.22, p.1949-1954, 2008.
- RUFINO RD, LUNA JM, MARINHO PHC, FARIAS CBB, FERREIRA SRM, SARUBBO LA. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science and Engineering**. v.109, p.117-122, 2013.
- RYWINSKA A, JUSZCZYK P, WOJTATOWICZ M, ROBAK M, LAZAR Z, TOMASZEWSKA L, RYMOWICZ W. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. **Biomass and Bioenergy**. v.48, p.148-166, 2013.
- SARAVANAN V, VIJAYAKUMAR S. Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* PB3A using agro-industrial wastes as a carbon source. **Malaysian Journal of Microbiology**. v.10, p.57-62, 2014.

SOUZA FASD, SALGUEIRO AA, ALBUQUERQUE CDC. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.29, p.61-67, 2012.

STAJIC M, PERSKY L, FRIESEM D, HADAR Y, WASSAR SP, NEVO E, VUKOJEVIC J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**. v.38, p.65-73, 2006.

VELIOGLU Z, OZTURK UREK R. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Article in Press. 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.007>

WADEKAR SD, KALE SB, LALI AM, BHOWMICK DN, PRATAP AM. Jatropha oil and karanja oil as carbon sources for production of sophorolipids. European **Journal of Lipid Science and Technology**. v.114, p.823-832, 2012.

Zhao X, Qi F, Yuan C, Du W, Liu D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.44, p.182-197, 2015.

ZINJARDE S, APTE M, MOHITE P, KUMAR AR. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. **Biotechnology Advances**. v.32, p.920-933, 2014.

ARTIGO 2 – OBTENÇÃO DE RESÍDUO GRAXO BOVINO DE BAIXO PONTO DE FUSÃO POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA ASSISTIDA POR BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR YARROWIA LIPOLYTICA

1. INTRODUÇÃO

A sociedade contemporânea tem infundida na sua cultura e nos seus hábitos diários o uso de diversas formas de energia para atender seus anseios por uma qualidade de vida ideal, e para tanto, produtos e processos utilizados dependem sumariamente de fornecimento ininterrupto de energia e não obstante, energia esta de qualidade, com preço competitivo e que impacte da menor forma possível o meio ambiente. A matriz energética global é composta principalmente pelo uso de combustíveis fósseis e, portanto, não renováveis, o que preocupa os órgãos internacionais que monitoram o tema quando projeções apontam para uma redução da oferta de petróleo e carvão em até 60% já nos próximos 15 anos, elevando os custos para sua obtenção acarretando na disparada de preços dos produtos e processos envolvidos (SINGH & SINGH, 2010; IEA, 2011; BP, 2015).

Relevando estes aspectos, o aprimoramento de tecnologias alternativas a decadente oferta de matéria-prima para os combustíveis atuais e que possibilitem a desejada sustentabilidade energética, constitui-se em um dos grandes desafios de nossa sociedade. Além de serem obtidos de matéria-prima renovável como biomassa, efluentes e resíduos graxos, os biocombustíveis são considerados menos poluentes, pois sua combustão emite maiores teores de monóxido de carbono, compostos sulfurados, material particulado e hidrocarbonetos aromáticos (FARGIONE et al., 2008; XUE et al., 2011; SANTORI et al., 2012; SELVAM & VADIVEL, 2013; SHOJAEEFARD et al., 2013).

Assim, o aperfeiçoamento das tecnologias para produção de biodiesel a partir de resíduos agroindustriais pode ser uma importante alternativa, pois podem ser transformados em biocombustíveis de segunda geração não competindo por áreas férteis para produção de alimentos, tendo custo irrisório quando comparado as fontes vegetais e sendo abundantes em países potências agropecuárias,

contribuindo não somente para o fornecimento de matéria-prima para o setor energético mas também reduzindo o impacto no ambiente pela destinação mais nobre desses resíduos (BHATTI et al., 2008; GUI et al., 2008; AN et al., 2011; CARRIQUIRY et al., 2011; GOH & LEE, 2011).

Diversos fatores tecnológicos ainda barram a produção de biodiesel de resíduos graxos de maneira economicamente atrativa e sustentável, tais como elevada temperatura reacional, volume de catalisador utilizado, presença de água e ácidos livres, alto ponto de entupimento de filtro a frio, glicerina ligada e seu estado físico a temperatura ambiente (JOSHI & PEGG, 2007; ONER & ALTUN, 2009; JANCHIV et al., 2012). Dessa forma, mesmo a matéria-prima tendo custo inferior aos óleos vegetais, a tecnologia para transformar o resíduo graxo animal em biodiesel precisa ser aperfeiçoada desde as suas etapas de obtenção até o produto final, tornando-o mais competitivo (JANAUN & ELLIS, 2010).

Nesse contexto, uma prática que vêm se tornando cada vez mais comum é o emprego de micro-organismos, seja para produção direta ou assistida de lipídios e/ou de biocombustível (JANG et al., 2012; SHARMA et al., 2014; THLIVEROS et al., 2014; ZHANG et al., 2014; ZHAO et al., 2015). Assim, a busca por uma microbiota lipolítica com capacidade para ser utilizada em processos de tratamento e valorização de resíduos graxos de origem animal, aliada a evidente necessidade em suplementar a matriz energética com fontes renováveis e menos agressivas ao meio ambiente, se mostra uma promissora estratégia para obtenção de um resíduo com melhores condições tecnológicas para produção de biodiesel, com a desejada qualidade e também, em condições economicamente mais favoráveis (YOO et al., 2011; XING et al., 2012; CASPETA & NIELSEN, 2013; XU et al., 2014).

Um micro-organismo que pode ser encaixar nessas premissas é o *Staphylococcus xylosus*, o qual é um coco gram positivo, com certificação de segurança GRAS (Generally Recognized As Safe) e conhecida atividade proteolítica e lipolítica. É usualmente empregado na indústria de alimentos na fermentação de produtos cárneos, responsável pela produção e intensificação do flavor característico desses produtos, estabilização da cor e decomposição de peróxidos (MAURIELLO et al., 2004; MANSOUR et al., 2009; CHICHOSKI et al., 2011).

Além de possuir aplicação viável in vivo, tanto *S.xylosus* como outras espécies do mesmo gênero possuem a importante característica de produzir

exoenzimas que catalisam reações em lipídios (LANSER & NAKAMURA, 1996; FIEGLER & BRUCKNER, 1997; MOSBAH et al., 2006; SOUISSI et al., 2009; BROD et al., 2010; KIM et al., 2013; ZHAO et al., 2015). Dentre esse grupo de enzimas secretadas estão as serinas acetiltransferases (E.C.3.1.1.3). Seus mecanismos reacionais de catálise de alcoólise, esterificação, transesterificação, hidrólise, dentre outras, estão relatados na literatura (AL-ZUHAIR, 2005; FENG et al., 2013). Além disso, a facilidade em obter e cultivar o *S.xylosus* pode torná-lo um potencial agente de valorização de resíduos graxos bovinos para a produção de biodiesel graças às possíveis modificações que suas lipases podem causar nessa matéria lipídica (JAEGER & EGGERT, 2002).

Marques et al. (2015) aplicaram cepas de *S.xylosus* em resíduos graxos de frangos e obtiveram redução de aproximadamente 23°C no ponto de fusão dessas gorduras após fermentação em estado semissólido. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi aplicar cepas de *Staphylococcus xylosus* em resíduos graxos bovinos de forma a reduzir seu ponto de fusão para temperaturas mais amenas, utilizando biossurfactantes produzidos por *Yarrowia lipolytica* obtidos a partir da mesma matéria-prima, como coadjuvantes na fermentação bacteriana dos resíduos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e armazenamento das amostras

As amostras de resíduo graxo bovino foram coletadas em frigorífico-abatedouro da região Sul do Estado do Rio Grande do Sul. A gordura bovina foi obtida a partir de animais recentemente abatidos, durante a evisceração das carcaças. Foram coletadas amostras do invólucro renal graxo de 25 carcaças, cada uma com massa aproximada de 1,4 kg. A coleta nesse ponto visou pré-selecionar resíduos com o menor resquício de sangue possível, contribuindo para a homogeneidade das amostras.

Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas em caixa térmica com gelo até o Núcleo de Educação, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade da Universidade Federal de Pelotas, onde, assepticamente, as amostras foram fracionadas e estocadas em temperatura

de -18°C até o momento das análises. Previamente a cada análise, porções das amostras eram descongeladas durante a noite sob-refrigeração a 4°C.

2.2. Cepas estoque e obtenção do biossurfactante

Culturas estoque de *S.xylosus* NRRL B-14776 foram utilizadas no experimento. Uma alçada de biomassa bacteriana foi previamente transferida para tubos de ensaio contendo caldo BHI (*Brain Hearth Infusion*) e incubados a 30°C ± 0,1°C *overnight*, removendo as células do estado de latência. A determinação da contagem de células ao final deste período foi realizada por contagem padrão em placas, pela técnica do esgotamento em superfície em Ágar Padrão de Contagem (PCA – *Plate Count Agar*).

O biossurfactante foi produzido por culturas estoque de *Y.lipolytica* NRRL YB-423 obtidas em experimento prévio (dados não mostrados). Uma cultura leve foi transferida para tubos de ensaio contendo ágar YM (*Yeast Malt*; glicose 1%; peptona 0,5%; extrato de malte 0,3%; extrato de levedura 0,3%; ágar-ágar 2%) inclinados e incubados a 35°C ± 0,1°C por 48 h ou até a produção de biomassa visível. A fermentação foi conduzida com uso de caldo YM como fase aquosa, seguindo mesma composição descrita acima, exceto a adição de ágar-ágar. A Tabela 1 mostra os parâmetros físico-químicos da gordura utilizada no experimento e obtenção dos biossurfactantes e suas propriedades.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas da gordura residual bovina *in natura* usada como substrato para produção de biossurfactante e as propriedades emulsificantes deste composto

Parâmetro	Gordura bovina <i>in natura</i>	Biossurfactante
Acidez livre (mg KOH.g ⁻¹)	0,609 ± 0,074	-
Índice de saponificação (mg KOH.g ⁻¹)	188,26 ± 2,77	-
Índice de iodo (g I ₂ . 100g ⁻¹)	12,26 ± 0,08	-
Umidade (% m/m)	0,31 ± 0,08	-
Matéria mineral (% m/m)	ND	-
Impurezas (% m/m)	1,92 ± 0,05	-
Índice de emulsificação (%)	-	45,56

ND: não detectado

2.3. Delineamento experimental

O delineamento experimental aplicado seguiu arranjo completamente casualizado, com três repetições, em esquema fatorial, sendo o primeiro fator de tratamento “concentração de gordura” (40; 45; 50; 55; 60% m/v), e o segundo fator “adição de biossurfactante” (0 – controle negativo -; 12,5; 25; 37,5 mg) durante 4 h de processo fermentativo em incubadora com agitação orbital modelo shaker a 100 rpm. A variável resposta avaliada foi o ponto de fusão dos resíduos graxos bovinos obtidos ao final da fermentação.

2.4. Processo fermentativo

O cultivo foi conduzido em fermentação semissólida em batelada. Sendo o resíduo graxo bovino o constituinte insolúvel, fonte de carbono e material de ancoragem para bactérias, o caldo BHI como fase aquosa e fonte primária de nitrogênio e secundária de carbono, e por fim, o inóculo (1% v/v) o qual foi obtido a partir de inoculação prévia em tubo com ágar BHI, incubado a 30°C por 48 h. A partir deste, uma alíquota foi transferida para caldo BHI e incubado a 30°C *overnight*. Na manhã seguinte, foram retiradas assepticamente alíquotas de 1 mL e adicionadas nos erlenmeyers contendo o mosto, procedendo o processo fermentativo em seguida. O volume total nos reatores foi de 100 mL. O meio permaneceu com duas fases distintas ao longo do processo.

O mosto foi preparado a partir das amostras de gorduras de origem animal, que foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e após adição do caldo BHI, foram homogeneizadas em “Stomacher” por 2 min e transferidos para erlenmeyers onde foi procedida a fermentação.

2.5. Análises físico-químicas das gorduras bovinas

Os resíduos graxos bovinos foram caracterizados quanto aos seus valores de acidez livre, índice de saponificação e índice de iodo. A acidez livre foi determinada segundo método EN 14104:2003 (EN Standard, 2003) onde uma alíquota da amostra de gordura foi previamente pesada e solubilizada em solução de etanol/água, seguida da adição de indicador fenolftaleína e titulação com NaOH.

O índice de saponificação foi determinado de acordo com as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz – IAL 328/IV e American Oil Chemists Society – AOCS Cd 3-25 (AOCS, 2013) com modificações, onde uma alíquota da gordura bovina foi macerada, seca e filtrada e então uma massa aproximada de 4 g foi pesada para análise. O analito foi transferido para balão previamente tarado e foram adicionados 50 mL de solução alcoólica de KOH, levando o frasco para aquecimento até ebulição do solvente em manta térmica, acoplado um sistema de condensação na saída do balão. A reação ocorreu por 80 min e, após resfriamento, foi adicionado indicador fenolftaleína e titulado com HCl padronizado até viragem do indicador da coloração rósea para incolor. O índice de saponificação foi expresso em mg de KOH consumido por g de amostra.

O índice de iodo foi determinado pelo método de Wijs segundo metodologia descrita por AOAC International – AOAC Official Method 993.20 (AOAC, 2000).

O teor de impurezas caracteriza quantitativamente a presença de sangue e tecido conjuntivo na gordura bovina e foi determinado por fusão da gordura em temperatura de aproximadamente 75 °C seguido de filtração a mesma temperatura com auxílio de papel filtro quantitativo Unifilm® ($\varnothing = 4\sim 7\mu\text{m}$), obtendo a massa de impureza por gravimetria.

2.6. Análise do Ponto de Fusão (PF)

Tubos de ensaio contendo aproximadamente 1g de resíduo graxo fermentado foram parcialmente imersos em balão com água e submetidos a aquecimento em manta térmica, elevando lentamente a temperatura de 30 °C até 80 °C. Este método adaptado da American Oil Chemists Society (AOCS, 2009) propõe a detecção de três temperaturas que caracterizam o ponto de fusão de ácidos graxos, correspondentes a três ácidos graxos conforme descrito por Douaire et al. (2014). Knothe & Dunn (2009) relatam que as temperaturas iniciais e finais de fusão são afetadas pela quantidade de amostra utilizada na análise. Assim foi considerada somente a temperatura central de fusão das amostras no decorrer do experimento, observando a temperatura na qual a amostra apresentava escoamento por um capilar.

2.7. Análise estatística

Os dados foram obtidos tiveram sua normalidade analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, a homocedasticidade das amostras pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos por análise gráfica. As variáveis foram normalizadas e foram submetidas a análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$). O parâmetro ponto de fusão foi primeiramente avaliado pela metodologia de superfície de resposta onde os dados foram ajustados à uma equação polinomial de segunda ordem (Eq. 4) gerada por análise de regressão. A resposta foi inicialmente ajustada para os fatores por regressão múltipla. A seleção do modelo foi baseada em: (a) baixo valor residual; (b) baixo p-value; (c) baixo desvio padrão; (d) alto valor de R^2 e R^2 ajustado.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (4)$$

onde “y” é o valor resposta estimado (PF), x_i é o primeiro fator independente (concentração de gordura), x_j é o Segundo fator independente (adição de biossurfactante), β_0 é o intercepto, β_i e β_j são os coeficientes de primeira ordem, β_{ii} e β_{jj} são os coeficientes quadráticos para os fatores i e j . Por fim, o coeficiente β_{ij} é o coeficiente linear para a interação entre os fatores de tratamento i e j . Todos os dados foram analisados com auxílio do software *The R Project* (versão 3.1.0) da *The R Foundation*®. Todos os dados foram analisados com auxílio do software *The R Project* (versão 3.1.0) da *The R Foundation*®.

3. RESULTADOS

O resumo da análise estatística aplicada para avaliar o experimento está apresentado na Tabela 2. Podemos observar que não houve efeito significativo para a interação entre ambos fatores de tratamento, bem como para o parâmetro quadrático e linear do efeito da concentração de gordura no ponto de fusão dos resíduos graxos bovinos ($p > 0,05$). No entanto, foi identificada interação significativa para ambos os parâmetros linear e quadrático do fator adição de biossurfactante ($p < 0,05$) e seus coeficientes foram novamente estimados via regressão linear e estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados do ponto de fusão obtidos na fermentação de resíduos graxos bovinos auxiliada por biossurfactantes estão apresentados na Tabela 3 e Figura 1. O

processo de modificação de gordura residual bovina sem adição de biossurfactantes apresentou uma queda de aproximadamente 23 °C no ponto de fusão da gordura in natura, parâmetro significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado ao bioprocesso assistido por biossurfactantes que apresentou uma queda adicional de 10 °C, chegando a aproximadamente 37 °C ($p < 0,05$) em todos os tratamentos aplicados. Foi possível observar ainda que a concentração de gordura no mosto não afetou significativamente o ponto de fusão ($p > 0,05$), ao contrário do que foi observado quando adicionado biossurfactante que apresentou a queda máxima na temperatura de fusão ao adicionar 37,5 mg de biossurfactante ao mosto, obtendo aproximadamente 37,46 °C, temperatura significativamente igual aquela obtida ao adicionar 12,5 mg de biossurfactante que foi de 37,67 °C ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Resumo estatístico com os coeficientes estimados para o modelo matemático, erro padrão, t value, e a significância do modelo de superfície de resposta e regressão linear para a variação do ponto de fusão dos resíduos graxos bovinos fermentados por *S.xylosus* com a adição de biossurfactantes produzidos por *Y.lipolytica*

Fator	Estimado	DF	Erro padrão	t	p	r ²
<i>PF – superfície de resposta</i>						0,912
Intercepto	50,823	35	11,480	4,427	< 0,001	
X_1	-0,130	35	0,465	-0,281	0,780	
X_2	-0,837	35	0,110	-7,612	< 0,001	
X_1^2	0,0009	35	0,005	0,198	0,844	
X_2^2	0,0147	35	0,001	10,525	< 0,001	
X_1X_2	0,0010	35	0,001	0,544	0,590	
<i>PF – Regressão linear</i>						0,999
Intercepto	37,468	4	0,064	583,76	0,001	
a	9,606	4	0,082	117,753	0,005	
b	0,308	4	0,036	8,528	0,047	

* X_1 : Concentração de gordura (% m/v); X_2 : Adição de biossurfactante (mg)

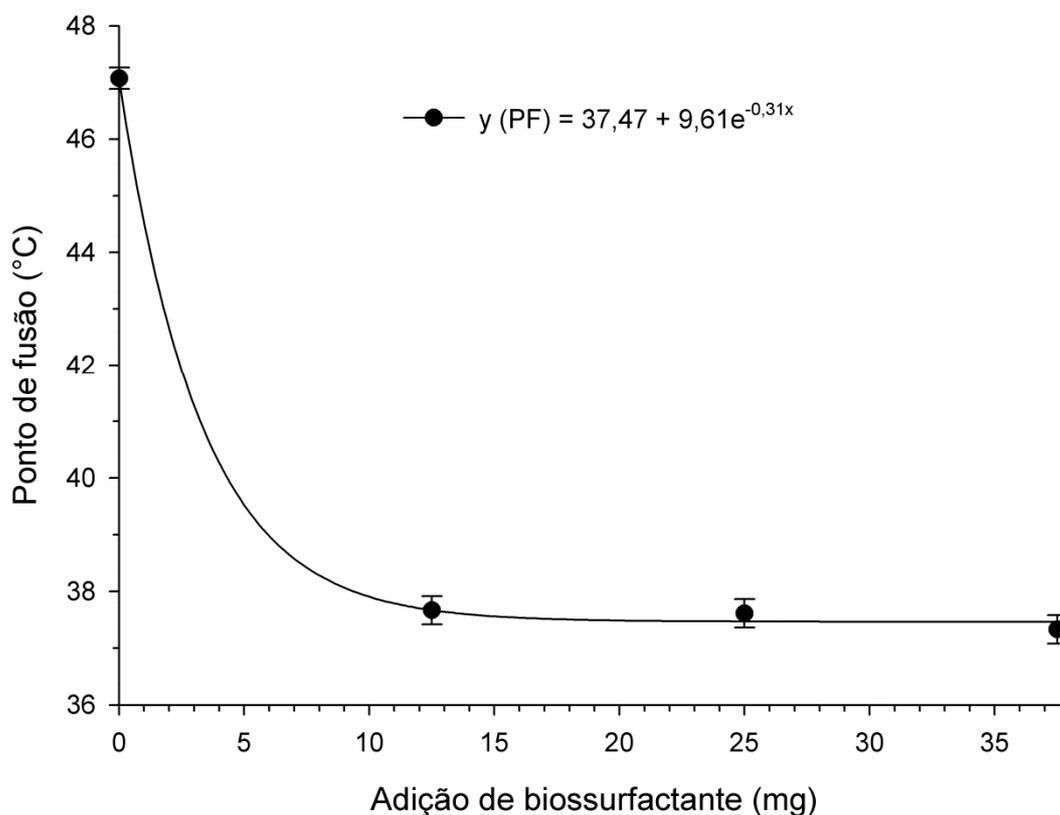


Figura 1 – Influência da adição de biossurfactante produzidos por *Y.lipolytica* nos pontos de fusão dos resíduos graxos bovinos fermentados por *S.xylosus*.

Tabela 3 – Respostas do ponto de fusão dos resíduos graxos bovinos tratados por fermentação semissólida de *S.xylosus*, assistida por biossurfactantes produzidos por *Y.lipolytica*.

Concentração de gordura (% m/v)	PF (°C)
40	40,18 ^{ns}
45	40,05
50	39,90
55	40,16
60	39,80

ns : Médias sem diferença significativa pelo teste F ($p < 0,05$; $n = 15$).

4. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Figura 1 indicam que a adição de biossurfactante no mosto causa um efeito significativamente positivo na atividade microbiana no resíduo graxo bovino ($p < 0,05$), indicando que a formação de microemulsões no mosto auxiliou a ação de *S.xylosus* nas gorduras bovinas, facilitando a degradação enzimática pelo aumento da superfície de contato na interface líquido-sólido (MARCHANT & BANAT, 2012; MULLER et al., 2012). As concentrações de gordura empregadas nesse estudo não demonstraram interação significativa com o ponto de fusão das gorduras residuais, conforme o estudo de MARQUES et al. (2015), que empregaram bioprocesso semelhante, sem o adição de biossurfactantes microbianos em gorduras residuais de aves, supondo dessa forma, que há um limiar de teor de gordura sólida no mosto no qual promove a produção e liberação de serina hidrolases específicas para atuar nos resíduos graxos de forma a serem absorvidos pelas células na forma de energia.

O patamar de temperatura de fusão semelhante obtida, em torno de 37°C, para todas as concentrações de biossurfactantes aplicadas sugerem que o limite para que haja efeitos concretos no ponto de fusão das gorduras após a fermentação microbiana está entre as concentrações testadas e que teores adicionais de biossurfactantes somente auxiliariam na redução da Tensão Superficial (TS) até a Concentração Micelar Crítica (CMC), ponto mínimo de TS no qual a partir dele não há mais redução desse parâmetro e micelas de gordura começam a ser formadas (GEORGE & JAYACHANDRAN, 2009).

A presença de tensoativos no meio fermentativo possibilitou a obtenção de gordura bovina em estado semissólido a temperatura ambiente. De acordo com Bankjovic-Ilic et al. (2014), a gordura fermentada neste estudo pode ser caracterizada pela sua aparência e propriedades de escoamento como sendo gordura amarela de alta viscosidade, assim transformada a partir um estado completamente sólido com viscosidade nula. Adicionalmente, Oner & Altun (2009) ressaltam a problemática do estado físico natural da gordura animal quando a produção de biodiesel é almejada, bem como o possível alto teor de ácidos livres o que implica em uma nova etapa na produção do biocombustível que visa a eliminação dessas cargas iônicas a fim de aumentar o rendimento e tornar o produto final no mínimo uma alternativa possível.

Análises de custo realizadas por Nelson & Schrock (2006) revelam que o fator crítico que causa impacto no preço do biodiesel oriundo de gordura residual bovina é justamente a matéria-prima enquanto que o menor fator é a venda da glicerina residual da reação de transesterificação. Demonstram ainda que o desvio do resíduo para uma rota de valorização contribui não somente para a economia dos setores envolvidos pela produção de um produto de maior valor agregado, mas também por desafogar as estações de tratamento e processos dispendiosos de disposição dos mesmos (CHAKRABORTY et al., 2014). Dessa forma, a redução extra no ponto de fusão dos resíduos graxos bovinos atribuída a aplicação de biossurfactante de *Y.lipolytica*, renovável, e obtido a partir da mesma matéria-prima da fermentação bacteriana, exalta uma cadeia de processos consecutivos que visam reaproveitar e valorizar ao máximo os resíduos gerados na própria fonte, aparado ainda pela Política Nacional de Resíduos Sólidos – PNRS gerando uma alternativa para uma produção sustentável de um biocombustível produzido em condições mais próximas possíveis das ambientais (BRASIL, 2010).

5. CONCLUSÃO

Concluimos que a fermentação de resíduos graxos bovinos por *S.xylosus* assistida por biossurfactante produzido pela levedura *Y.lipolytica* reduz o ponto de fusão das gorduras para aproximadamente 37°C, uma redução de 10°C ao processo proposto anteriormente sem a adição de tensoativos. Esse estudo abre portas para pesquisa com um novo material modificado para produção de biocombustíveis em temperaturas reacionais mais próximas às temperaturas ambientais e em estado físico mais suscetível a processos químicos, físicos e biológicos.

6. REFERÊNCIAS

- AL-ZUHAIR S. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetic study. **Biotechnology Progress**. v.21, p.1442-1448, 2005.
- American oil chemists society – AOCS. *AOCS Official Method Cj 1-94: Melting Properties of Fats and Oils*. 2009.
- American Oil Chemist Society – AOCS. *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*. 6th Edition. Official method Cd 3-25. 2013.

- AN H, WILHELM WE, SEARCY SW. Biofuel and petroleum-based fuel supply chain research: A literature review. **Biomass Bioenergy**. v.35, p. 3763-3774, 2011.
- Association Of Analytical Communities - AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. v. 2, 17TH ed. Gaithersburg - USA: AOAC. Official method 993-20. 2000.
- BANKJOVIC-ILIC IB, STOJKOVIC IJ, STAMENKOVIC OS, VELJKOVIC VC, HUNG YT. Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.32, p.238-254, 2014.
- BHATTI HN, HANIF MA, QASIM M, REHMAN AU. Biodiesel production from waste tallow. **Fuel**. v.87, p.2961-2966, 2008.
- BP Group. Energy outlook 2035. February 2015. Available at: bp.com/energyoutlook. Accessed June 01, 2015.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria Recursos Hídricos e Ambiente Urbano. Lei Nº 12.305, de 02 de Agosto de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília, 2010.
- BROD FCA, PELISSER MR, BERTOLDO JB, VERNAL J, BLOCH JR C, TEREZI H, ARISI ACM. Heterologous expression and purification of a heat-tolerant *Staphylococcus xylosus* lipase. **Molecular Biotechnology**. v.44, p.110-119, 2010.
- CARRIQUIRY MA, DU XD, TIMILSINA GR. Second generation biofuels: Economics and policies. **Energy Policy**. v.39, p.4222-4234, 2011.
- CASPETA L, NIELSEN J. Economic and environmental impacts of microbial biodiesel. **Nature Biotechnology**. v.31, p.789-793, 2013.
- CHAKRABORTY R, GUPTA AK, CHOWDHURY R. Conversion of slaughterhouse and poultry farm animal fats and wastes to biodiesel: Parametric sensitivity and fuel quality assessment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.29, p.120-134, 2014.
- CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, A. P.; DI LUCCIO, M. Viability of *Staphylococcus xylosus* during shelf-life of *dulce de leche* prepared by vacuum evaporation. **Ciência Rural**. v.41, n.11, p.2026-2031, 2011.
- DOUAIRE, M.; di BARI, V.; NORTON, J. E.; SULLO, A.; LILLFORD, P.; NORTON, I. T. Fat crystallization at oil-water interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.203, p.1-10, 2014.

- EN Standards. *Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of Ester and linolenic acid methyl ester contents. EN 14103*. 2003.
- FARGIONE J, HILL J, TILMAN D, POLASKY S, HAWTHORNE P. Land clearing and the biofuel carbon debt. **Science**. v.319, p.1235-1238, 2008.
- FENG X, PATTERSON DA, BALABAN M, EMANUELSSON EAC. Characterization of tributyrin hydrolysis by immobilized lipase on woolen cloth using conventional batch and novel spinning cloth disc reactor. **Chemical Engineering Research and Design**. v.91, p.1684-1692, 2013.
- FIEGLER H, BRUCKNER R. Identification of the serine acetyltransferase gene of *Staphylococcus xylosus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.148, p.181-187, 1997.
- GEORGE S, JAYACHANDRAN K. Analysis of rhamnolipids biosurfactants produced through submerged fermentation using Orange fruit peelings as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.158, p.694-705, 2009.
- GOH CS, LEE KT. Second-generation biofuel (SGB) in Southeast Asia via lignocellulosic biorefinery: Penny-foolish but pound-wise. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.15, p.2714-2718, 2011.
- GUI MM, LEE KT, BHATIA S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**. v.33, p.1646-1653, 2008.
- Instituto Adolfo Lutz – IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª Edição. 1ª Edição digital. Método IAL 328/IV. 2008.
- International energy agency – IEA. Key world energy statistics 2014. International energy agency. Available at: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2014.pdf>. 2014. Paris OECD/IEA. Accessed February 22, 2015.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**. v.13, n.4, p.390-397, 2002.
- JANAUN J, ELLIS N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.14, p.1312-1320, 2010.
- JANCHIV A, OH Y, CHOI S. High quality biodiesel production from pork lard by high solvent additive. **ScienceAsia**. v.38, p.95-101, 2012.
- JANG Y, PARK JM, CHOI S, CHOI YJ, SEUNG DY, CHO JH, LEE SY. Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on system

metabolic engineering approaches. **Biotechnology Advances**. v.30, p.989-1000, 2012.

JOSHI RM, PEGG MJ. How properties of biodiesel fuel blends at low temperatures. **Fuel**. v.86, p.143-151, 2007.

KIM SH, KIM S, PARK S, KIM HK. Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.85-86, p.10-16, 2013.

KNOTHE G, DUNN RO. A comprehensive evaluation of the melting points of fatty acids and esters determined by differential scanning calorimetry. **Journal of American Oil Society**. v.86, p.843-856, 2009.

LANSER AC, NAKAMURA LK. Identification of a *Staphylococcus warneri* species that converts oleic acid to 10-ketostearic acid. **Current Microbiology**. v.32, p.260-263, 1996.

ONER C, ALTUN S. Biodiesel production from inedible animal tallow and a experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct inject diesel engine. **Applied Energy**. v.86, p.2114-2120, 2009.

MANSOUR, S.; BAILLY, J.; LANDAUD, S.; MONNET, C.; SARTHOU, A. S.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LEROY, S.; IRLINGER, F.; BONNARME, P. Investigation of association of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosus*, and *Lactococcus lactis* in culture as a first step in microbial interaction analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. v.75, n.20, p.6422-6430, 2009.

MARCHANT R, BANAT IM. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**. v.30, p.558-565, 2012.

MARQUES RV, DUVAL EH, CORREA LB, CORREA EK. Increase of unsaturated fatty acids (low melting point) of broiler fatty waste obtained through *Staphylococcus xylosus* fermentation. **Current Microbiology**. 2015. DOI: 10.1007/s00284-015-0890-y

MAURIELLO G, CASABURI A, BLAIOTTA G, VILLANI F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**. v.67, p.149-158, 2004.

MOSBAH H, SAYARI A, BEZZINE S, GARGOURI Y. Expression, purification, and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosus* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala. **Protein Expression and Purification**. v.47, p.516-523, 2006.

MULLER MM, KUGLER JH, HENKEL M, GERLITZKI M, HORMANN B, POHNLEIN M, SYLDATK C, HAUSMANN R. Rhamnolipids – Next generation surfactants?. **Journal of Biotechnology**. v.162, p.366-380, 2012.

NELSON RG, SCHROCK MD. Energetic and economic feasibility associated with the production, processing and conversion of beef tallow to a substitute diesel fuel. **Biomass and Bioenergy**. v.30, p.584-591, 2006.

SANTORI G, DI NICOLA G, MOGLIE M, POLONARA F. A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. **Applied Energy**. v.92, p.109-132, 2012.

SELVAM DJP, VADIVEL K. An experimental investigation on performance, emission, and combustion characteristics of a diesel engine fueled with methyl esters of waste pork lard and diesel blends. **International Journal of Green Energy**. v.10, p.908-923, 2013.

SINGH SP, SINGH D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.14, p.200-216, 2010.

SHARMA M, SINGH SS, MANN P, SHARMA M. Biocatalytic potential of lipase from *Staphylococcus* sp. MS1 for transesterification of jatropha oil into fatty acid methyl esters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.30, p.2885-2897, 2014.

SHOJAEEFARD MH, ETGAHNI MM, MEISAMI F, BARARI A. Experimental investigation on performance and exhaust emissions of castor oil biodiesel from a diesel engine. **Environmental Technology**. v.34, p.2019-2026, 2013.

SOUISSI N, BOUGATEF A, TRIKI-ELLOUZ Y, NASRI M. Production of lipase and biomass by *Staphylococcus simulans* grown on sardinella (*Sardinella aurita*) hydrolysates and peptone. **African Journal of Biotechnology**. v.8, p.451-457, 2009.

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

XING MN, ZHANG XZ, HUANG H. Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis. **Biotechnology Advances**. v.30, p.920-929, 2012.

- XU X, KIM JY, OH YR, PARK JM. Production of biodiesel from carbon sources of macroalgae *Laminaria japonica*. **Bioresource Technology**. v.169, p.455-461, 2014.
- XUE J, GRIFT TE, HANSEN AC. Effect of biodiesel on engine performances and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.15, p.1098-1116, 2011.
- YOO HY, SIMKHADA JR, CHO SS, PARK DH, KIM SW, SEONG CN, YOO JC. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. **Bioresource Technology**. v.102, p.6104-6111, 2011.
- ZHANG X, YAN S, TYAGI RD, SURAMPALLI RY, VALÉRO JR. Wastewater sludge as raw material for microbial oil production. **Applied Energy**. v.135, p.192-201, 2014.
- ZHAO X, QI F, YUAN C, DU W, LIU D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.44, p.182-197, 2015.

ARTIGO 3 – PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE RESÍDUO GRAXO BOVINO DE BAIXO PONTO DE FUSÃO

1. INTRODUÇÃO

As décadas recentes da história da humanidade foram marcadas pelo aumento da população mundial, que demandam mais recursos naturais, notadamente alimentos e energia (BANERJEE & CHAKRABORTY, 2009; GODFRAY et al., 2010). O modelo energético do mundo atual baseia-se na utilização de combustíveis fósseis como fonte primária de energia, de forma que 86% de toda a energia consumida ao redor do planeta são não renováveis (BANKOVIC-ILIC et al., 2012). Nesta perspectiva, os custos para a extração destes combustíveis tornar-se-ão cada vez mais onerosos, até que seja atingido um patamar onde a utilização dessas fontes energéticas seja inviável economicamente ou que suas reservas se esgotem (AZAD et al., 2014). Paralelamente, a demanda de energia do planeta está em ascensão, usada basicamente para todos os processos de transformações nas indústrias, criando produtos que atendem as expectativas dos consumidores quanto à qualidade de vida almejada por uma sociedade cada vez mais globalizada (GODFRAY et al., 2010).

Nesse contexto, alertas de aquecimento global pela emissão de carbono fóssil na atmosfera, poluição ambiental, e considerável queda na oferta de petróleo nas próximas duas décadas servem como um propulsor para o desenvolvimento de novas tecnologias que possam substituir ou complementar a demanda atual e futura por energia nos diversos setores da sociedade (ATADASHI et al., 2011). O aprimoramento de tecnologias alternativas a decadente oferta de petróleo e que possibilitem a desejada sustentabilidade energética, constitui-se em um dos grandes desafios de nossa sociedade. Além disso, os biocombustíveis são considerados menos poluentes, já que sua combustão emite uma menor taxa de monóxido de carbono, compostos sulfurados e hidrocarbonetos aromáticos (XUE et al., 2011; AN et al., 2011; SANTORI et al., 2012). Como vantagem adicional, estes combustíveis podem ser obtidos a partir de recursos como biomassa (cana de açúcar, milho, microalgas, oleaginosas), resíduos graxos e dejetos. Todo combustível originado

desses tipos de recursos, são chamados de biocombustíveis e atualmente seu emprego e concepção são difundidos pelo mundo (KNOTHE, 2010).

Nesse sentido, o biodiesel vem sendo alvo de aprimoramento em grande parte das instituições de pesquisa do mundo, no intuito de substituir gradativamente o diesel de petróleo – ou petrodiesel -, de maneira que os atuais equipamentos possam usufruir dessa fonte alternativa, sem apresentar quedas significativas na potência, evitando grandes mudanças em sua estrutura (AYDIN & İLKILIÇ, 2010; XUE et al., 2011). Atualmente é conhecido que o uso de 20% de biodiesel em mistura com diesel de petróleo possa ser aplicado aos atuais motores de ciclo-diesel sem a necessidade de mudanças estruturais nos mesmos.

Contudo, as legislações que regulamentam o teor de biodiesel a diluir e usar nos veículos são variados em cada país e região (McCARTHY et al., 2011; CHAUHAN et al., 2010). As adaptações dos veículos que seriam necessárias para circularem com biodiesel podem ser minimizadas ou mesmo evitadas, ao submeter os ácidos graxos à modificação química por transesterificação, dessa forma permitindo a diluição simples do biodiesel em petrodiesel (DEMIRBAS, 2009; ABBASZADEH et al., 2012; BRUNSCHWIG et al., 2012; ENCINAR et al., 2011).

Tecnicamente, a Agência Nacional do Petróleo (ANP), define biodiesel como um éster alcoólico (metílico ou etílico) produzido através de uma reação de transesterificação com um álcool e um catalisador químico ou enzimático, proveniente de fontes renováveis de energia como óleos vegetais ou gorduras animais, resultando em uma mistura de ésteres de ácidos graxos e como subproduto o glicerol (BRASIL, 2005). Um agravante da extração de óleo para abastecimento do setor energético é a questão da segurança alimentar e a competição por áreas férteis para produção de energia ao invés de alimentos. O preço de oleaginosas, portanto, pode sofrer reajustes não somente por quebras de safra por fenômenos naturais, mas também pela alta demanda do setor energético por combustíveis, revés de qualquer combustível de primeira geração (TSAI, 2009).

Superando a contracorrente que os órgãos internacionais de combate a fome exercem nos biocombustíveis de primeira geração, o biodiesel proveniente de resíduos graxos, como biocombustível de segunda geração, se torna uma excelente alternativa aqueles que utilizam estoques de alimentos para sua produção, dado evidentemente ajustes técnicos para corrigir problemas que podem ser causados

nos atuais motores de ciclo-diesel, que compõem a frota mundial de veículos terrestres pesados. (AL-ZUHAIR et al., 2012). As vantagens tecnológicas do uso de gorduras de origem animal em misturas com diesel de petróleo, ou petrodiesel, incluem sua alta disponibilidade e preço irrisório, tendem a apresentar baixa água e acidez livre, seus ésteres metílicos apresentam maior número de cetano, e não são corrosivos. Em contraponto, as blends com petrodiesel devem possuir controle em alguns parâmetros, como alto ponto de fluidez, alta viscosidade e alto ponto de fulgor além de dificuldades inerentes em processar uma matéria-prima sólida (SHEEDLO, 2008; GURU et al., 2009; GURU et al., 2010; BALAT & BALAT, 2010).

Dessa forma, o emprego de matérias-primas renováveis, de baixo custo e que possam ser misturadas com outras matérias-primas com diferentes propriedades físicas, químicas e tecnológicas se torna uma alternativa para aperfeiçoar as características de ambos os materiais, de forma que a blend apresente um balanceamento nessas características, proporcionando uma rota alternativa para uso desses resíduos (ENCINAR et al., 2011; CANOIRA et al., 2008).

Tendo em vista esses aspectos, o objetivo deste trabalho foi utilizar resíduo graxo de baixo ponto de fusão obtido por fermentação microbiana para produção de biodiesel, caracterizando o biocombustível obtido perante a legislação brasileira pertinente de forma a transformar o resíduo graxo bovino em matéria-prima passível de se tornar um componente na blend com resíduos graxos de origem vegetal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e armazenamento das amostras

As amostras de resíduo graxo bovino foram coletadas em frigorífico-abatedouro da região Sul do Estado do Rio Grande do Sul. A gordura bovina foi obtida a partir de animais recentemente abatidos, durante a evisceração das carcaças. Foram coletadas amostras do invólucro renal graxo de 25 carcaças, cada uma com massa aproximada de 1,4 kg. A coleta nesse ponto visou pré-selecionar resíduos com o menor resquício de sangue possível, contribuindo para a homogeneidade das amostras.

Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas em caixa térmica com gelo até o Núcleo de Educação, Pesquisa e

Extensão em Resíduos e Sustentabilidade da Universidade Federal de Pelotas, onde, assepticamente, as amostras foram fracionadas e estocadas em temperatura de -18°C até o momento das análises. Previamente a cada análise, porções das amostras eram descongeladas durante a noite sob-refrigeração a 4°C .

2.2. Cepas estoque e processo fermentativo

Culturas estoque de *S.xylosus* NRRL B-14776 foram utilizadas no experimento. Uma alçada de biomassa bacteriana foi previamente transferida para tubos de ensaio contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubados a $30^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ *overnight*, removendo as células do estado de latência. A determinação da contagem de células ao final deste período foi realizada por contagem padrão em placas, pela técnica do esgotamento em superfície em Ágar Padrão de Contagem (PCA – *Plate Count Agar*). O cultivo foi controlado a fim de obter uma concentração celular inicial para fermentação da gordura bovina de $8 \log \text{UFC.mL}^{-1}$.

A fermentação foi conduzida em estado semissólido em batelada. Sendo o resíduo graxo bovino o constituinte insolúvel, fonte de carbono e material de ancoragem para bactérias, o caldo BHI como fase aquosa e fonte primária de nitrogênio e secundária de carbono, e por fim, o inóculo ($1\% \text{ v/v}$; $8 \log \text{UFC.mL}^{-1}$). Na manhã seguinte, foram retiradas assepticamente alíquotas de 1 mL e adicionadas nos erlenmeyers contendo o mosto, procedendo o processo fermentativo em seguida. O volume total nos reatores foi de 100 mL. O meio permaneceu com duas fases distintas ao longo do processo.

O mosto foi preparado a partir das amostras de gorduras de origem animal, que foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e após adição do caldo BHI, foram homogeneizadas em “Stomacher” por 2 min e transferidos para erlenmeyers onde foi procedida a fermentação. As concentrações de gordura utilizadas variaram entre 40 e 60% m/v, determinadas através de experimento prévio (dados não divulgados).

2.3. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido utilizando delineamento completamente casualizado, com três repetições, em esquema unifatorial, sendo o fator de tratamento “fonte de triglicerídio” (gordura bovina fermentada por *S.xylosus*; blenda de resíduo de óleo de fritura – 95% - e gordura bovina fermentada – 5% v/v). As

variáveis respostas avaliadas foram “rendimento reacional”, “massa específica”, “acidez livre”.

2.4. Procedimento experimental

As seguintes condições reacionais foram fixadas: temperatura de 55°C, metanol em proporção molar de 8:1 de resíduo graxo, metilato de sódio 1% como catalisador e tempo reacional de 1,5 h. Os ésteres metílicos obtidos foram purificados via decantação por 45 min, sendo que o produto oriundo da gordura bovina foi mantido sob aquecimento (65°C) enquanto que o processo da blenda foi conduzido a temperatura ambiente.

2.5. Análises físico-químicas das gorduras bovinas

Os ésteres etílicos foram caracterizados quanto aos seus valores de acidez livre. A acidez livre foi determinada segundo método EN 14104:2003 (EN Standard, 2003) onde uma alíquota da amostra de biodiesel foi previamente pesada e solubilizada em solução de etanol/água, seguindo da adição de indicador fenolftaleína e titulação com NaOH.

O rendimento da reação foi calculado pela razão simples da massa inicial de resíduo graxo e a final de éster obtido. A massa específica foi determinada por densímetro de bancada.

A fim de averiguar a produção de ésteres metílicos, os produtos reacionais foram analisados por cromatografia em camada delgada, pareando seus resultados com um padrão de ésteres metílicos caracterizado em experimento anterior. A fase estacionária usada foi a sílica branca, enquanto que a móvel foi uma solução de iodo.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos na produção de biodiesel estão descritos na Tabela 1. Através desses resultados é possível observar que o resíduo graxo bovino apresentou um rendimento de 40% enquanto que quando presente como um componente de blenda de resíduo de óleo de fritura, o rendimento chegou a 85%, sem afetar tanto os parâmetros de acidez e massa específica dos ésteres metílicos produzidos perante a blenda.

Avaliando os resultados da cromatografia em camada delgada (Figura 1) é possível observar que foram obtidos ésteres metílicos a partir dos resíduos graxos bovinos e que o mesmo biodiesel foi produzido ao utilizar a blenda de resíduo graxo bovino com o de óleo de fritura. As manchas do biodiesel padrão quando comparada com os testados nesse experimento, aliado aos resultados da Tabela 1, corroboram o fato de que o biodiesel oriundo de resíduo graxo animal pode ser produzido com rendimentos aceitáveis, principalmente quando adicionados em blenda como matéria-prima.

Tabela 1 – Resultados de produção de biodiesel de diferentes matérias-primas e suas propriedades físico-químicas

Matéria-prima	Rendimento (%)	Acidez (mg KOH. g ⁻¹)	Massa específica (g.mL ⁻¹)
Resíduo graxo	40	0	0,89
Blenda	85	0	0,89

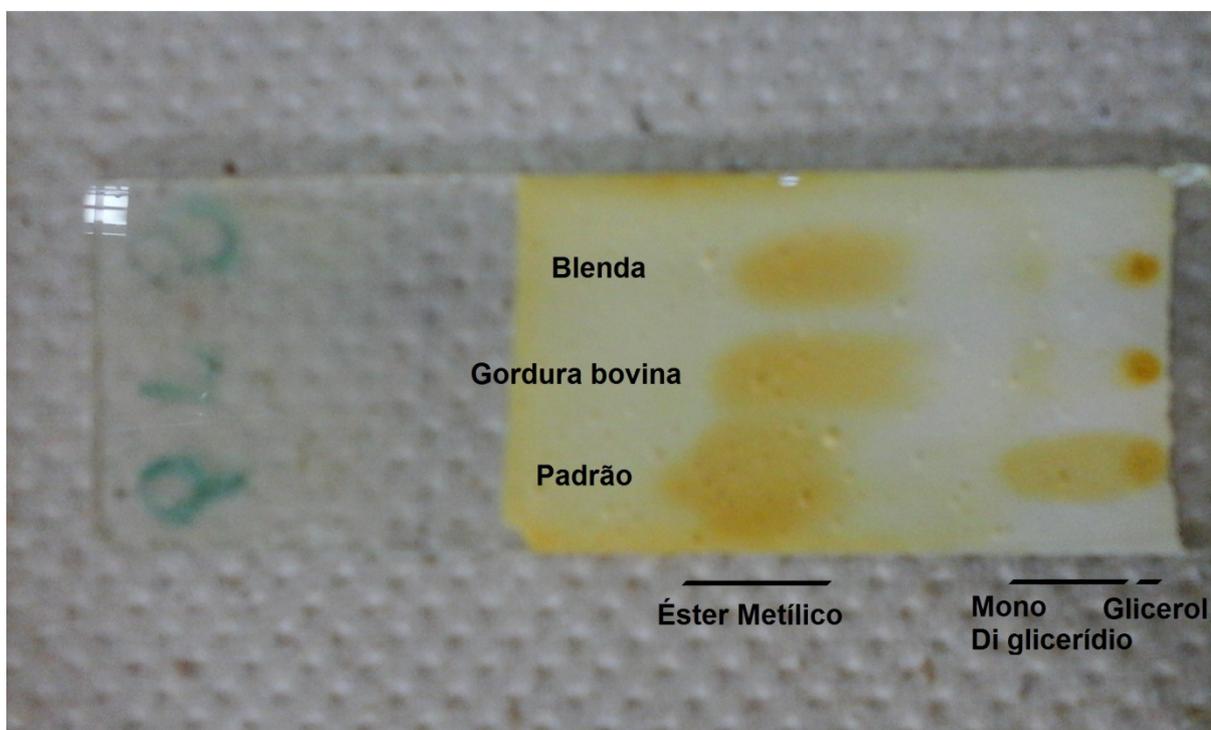


Figura 1 – Placa cromatográfica em camada delgada de biodiesel de resíduo de óleo de fritura (padrão) e dos demais produzidos ésteres produzidos neste experimento

4. DISCUSSÃO

A produção de ésteres metílicos a partir da blenda de resíduos graxos bovinos de baixo ponto de fusão com resíduos de óleo de fritura apresentou rendimento semelhante a blendas com o mesmo resíduo vegetal e banha suína, entre 81 e 88% (DIAS et al., 2008). Os mesmos autores relatam que o rendimento da transesterificação dessas matérias-primas foram inferiores quando obtidos isoladamente ao invés de usar blendas. Lu et al. (2007) relatam que o efeito da temperatura reacional é proporcional ao rendimento de ésteres da reação em qualquer rota catalítica, mais precisamente na rota alcalina, onde o rendimento operacional 88,6% a 65°C enquanto que no experimento realizado neste estudo, rendimentos próximos foram obtidos já em 55°C, o que pode caracterizar uma economia de energia ao utilizar esse processo. Além disso, o emprego da blenda de resíduo graxo bovino e resíduo de óleo de fritura apresentou características de acidez livre e massa específica dentro dos padrões internacionais ISO 3675 e ISO 660 respectivamente (massa específica entre 0,86 e 0,9 g.mL⁻¹ e acidez inferior a 0,8 mg KOH. g⁻¹).

A blenda testada nesse experimento sugere que o resíduo graxo bovino modificado pode servir como um material promissor na produção de biodiesel, não somente pelo produto obtido no final do processamento, mas também pelo seu baixo custo, abundância, redução da geração de resíduos na fonte, desvio de resíduos para as estações de tratamento à uma alternativa para valorização de subprodutos.

5. CONCLUSÃO

Através desse trabalho é possível concluir que o resíduo graxo bovino fermentado serve como uma matéria-prima para produção de biodiesel quando acrescentado em blendas com resíduos de óleos vegetais, mais especificamente dos oriundos de frituras. Servindo como um componente extra para produção de ésteres metílicos com qualidade para serem empregados na indústria energética.

6. REFERÊNCIAS

ABBASZAADEH A, GHOBADIAN B, OMIDKHAH MR, NAJAFI G. Current biodiesel production technologies: a comparative review. **Energy Conversion & Management**. v.63, p.138-148, 2012.

- AL-ZUHAIR, S.; HUSSEIN, A.; AL-MARZOUQI, A. H.; HASHIM, I. Continuous production of biodiesel from fat extracted from lamb meat in supercritical CO₂ media. **Biochemical Engineering Journal**. v.60, p.106-110, 2012.
- American Oil Chemist Society – AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. 6th Edition. Official method Cd 3-25. 2013.
- AN, H.; WILHELM, W. E.; SEARCY, S. W. Biofuel and petroleum-based fuel supply chain research: A literature review. **Biomass and Bioenergy**. v.35, p.3763-3774, 2011.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. v. 2, 17TH ed. Gaithersburg - USA: AOAC. Official method 993-20. 2000.
- ATADASHI IM, AROUA MK, ABDUL AZIZ A. Biodiesel separation and purification: a review. **Renewable Energy**. v.36, p.437-443, 2011.
- AYDIN, H.; İLKILIÇ, C. Effect of ethanol blending with biodiesel on engine performance and exhaust emissions in a CI engine. **Applied Thermal Engineering**. v.30, p.1199-1204, 2010.
- AZAD AK, KHAN MMK, AHASAN T, AHMED SF. Energy scenario: production, consumption and prospect of renewable energy in Australia. **Journal of Power and Energy Engineering**. v.2, p.19-25, 2014.
- BALAT M, BALAT H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**. v.87, p.1815-1835, 2010.
- BANERJEE, A.; CHAKRABORTY, R. Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production – A review. **Resources, Conservation and Recycling**. v.53, p.490-497, 2009.
- BANKJOVIC-ILIC IB, STOJKOVIC IJ, STAMENKOVIC OS, VELJKOVIC VB, HUNG Y. Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 32, p.238-254, 2014.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Agência Nacional do Petróleo (ANP). Lei N° 11.097 de 13 de Janeiro de 2005. **Introdução do biodiesel na matriz energética brasileira**. Brasília, DF, 2005.
- BRUNSCHWIG, C.; MOUSSAVOU, W.; BLIN, J. Use of bioethanol for biodiesel production. **Progress in Energy and Combustion Science**. v.38, p.283-301, 2012.
- CANOIRA L, RODRÍGUEZ-GAMERO M, QUEIROL E, ALCANTARA R, LAPUERTA M, OLIVA F. Biodiesel from low-grade animal fat: production process assessment

and biodiesel properties characterization. **Industrial and Chemical Engineering Research**. v.47, p.7997-8004, 2008.

CHAUHAN, B. S.; KUMAR, N.; CHO, H. M. Performance and emissions studies on an agriculture engine on neat Jatropha oil. **Journal of Mechanical Science and Technology**. v.24, p.529-535, 2010.

DEMIRBAS A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion & Management**. v.50, p.14-34, 2009.

DIAS JM, FERRAZ CA, ALMEIDA MF. Using mixtures of waste frying oil and pork lard to produce biodiesel. **Proceedings of World Academy of Science: Engineering Technology**. v.46, 2008.

DUFOUR, J.; SERRANO, D. P.; GÁLVEZ, J. L.; GONZÁLEZ, A.; SORIA, E.; FIERRO, J. L. G. Life cycle assessment of alternatives for hydrogen production from renewable and fossil sources. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.37, p.1173-1183, 2012.

EN Standards. Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of Ester and linolenic acid methyl ester contents. EN 14103. 2011.

ENCINAR, J. M.; SÁNCHEZ, N.; MARTÍNEZ, G.; GARCÍA, L. Study of biodiesel production from animal fats with high free fatty acid content. **Bioresource Technology**. v.102, p.10907-10914, 2011.

Instituto Adolfo Lutz – IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4^a Edição. 1^a Edição digital. Método IAL 328/IV. 2008.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, J. F. M.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food Security: The Challenge of feeding 9 billion people. **Science**. v. 327, p.812-818, 2010.

GURU M, ARTUKOGLU BD, KESKIN A, KOCA A. Biodiesel production from waste animal fat and improvement of its characteristics by synthesized nickel and magnesium additive. **Energy Conversion & Management**. v.50, p.498-502, 2009.

GURU M, KOCA A, CAN O, INAR C, SAHIN F. Biodiesel production from waste chicken fat based sources and evaluation with Mg based additive in a diesel engine. **Renewable Energy**. v.35, p.637-643, 2010.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**. v.36, p.364-373, 2010.

LU J, NIE K, XIE F, WANG F, TAN T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. **Process and Biochemistry**. v.42, p.1367-1370, 2007.

McCARTHY, P.; RASUL, M. G.; MOAZZEM, S. Comparison of the performance and emissions of different biodiesel blends against petroleum diesel. **International Journal of Low-Carbon Technologies**. v.6, p.255-260, 2011.

SAMANLI, S.; CUHADAROGLU, D.; IPEK, H.; UCBAS, Y. The investigation of grinding kinetics of power plant solid fossil fuel in ball mill. **Fuel**. v.89, p.703-707, 2010.

SANTORI G.; DI NICOLA, G.; MOGLIE, M.; POLONARA, F. A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. **Applied Energy**. v.92, p.109-132, 2012.

XUE, J.; GRIFT, T. E.; HANSEN, A. C. Effect of biodiesel on engine performances and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.15, p.1098-1116, 2011.

5. Considerações finais

Através desse trabalho é possível concluir que, a levedura *Y.lipolytica* têm potencial para produzir biossurfactantes a partir de fermentação em significativa concentração de resíduos graxos bovinos, com índices de emulsificação dentro dos parâmetros de outros compostos tensoativos similares obtidos de outras fontes de carbono. O biossurfactante obtido apresentou índice de emulsificação máximo de aproximadamente 45% na faixa de concentração de gordura bovina dispersa no meio compreendida entre 25 e 40% m/v, sendo que nessa mesma faixa foram produzidos entre 205,44 e 243,01 mg.L⁻¹ de biossurfactante respectivamente.

A aplicação do biossurfactante produzido por *Y.lipolytica* na fermentação de resíduos graxos bovinos por *S.xylosus*, reduz o ponto de fusão das gorduras bovinas para aproximadamente 37°C, uma redução de 10°C ao processo proposto anteriormente sem a adição de tensoativos. Esse estudo abre portas para pesquisa com um novo material modificado para produção de biocombustíveis em temperaturas reacionais mais próximas às temperaturas ambientais e em estado físico mais suscetível a processos químicos, físicos e biológicos.

Através desse trabalho é possível concluir que o resíduo graxo bovino de baixo ponto de fusão, obtido por fermentação de *S.xylosus* assistido por biossurfactantes, serve como uma matéria-prima para produção de biodiesel quando acrescentado em blendas com resíduos de óleos vegetais, mais especificamente dos oriundos de frituras. Servindo como um componente extra para produção de ésteres metílicos com qualidade para serem empregados na indústria energética.

6. Referências Gerais

- AARTHY M, SARAVANAN P, GOWTHAMAN MK, ROSE C, KAMINI NR. Enzymatic tranesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**. v.92, p.1591-1601, 2014.
- ABBASZAADEH A, GHOBADIAN B, OMIDKHAH MR, NAJAFI G. Current biodiesel production technologies: a comparative review. **Energy Conversion & Management**. v.63, p.138-148, 2012.
- ABEER MM, AMIN MCIM, LAZIM AM, PANDEY M, MARTIN C. Synthesis of a novel acrylated abietic acid-g-bacterial cellulose hydrogel by gamma irradiation. **Carbohydrate Polymers**. v.110, p.505-512, 2014.
- AL-ZUHAIR S. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetic study. **Biotechnology Progress**. v.21, p.1442-1448, 2005.
- AL-ZUHAIR, S.; HUSSEIN, A.; AL-MARZOUQI, A. H.; HASHIM, I. Continuous production of biodiesel from fat extracted from lamb meat in supercritical CO₂ media. **Biochemical Engineering Journal**. v.60, p.106-110, 2012.
- AMARAL PFF, FERREIRA TF, FONTES GC, COELHO MAZ. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**. v.87, p.179-186, 2009.
- American Oil Chemist Society – AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. 6th Edition. Official method Cd 3-25. 2013.
- American oil chemists society – AOCS. *AOCS Official Method Cj 1-94: Melting Properties of Fats and Oils*. 2009.
- AN H, WILHELM WE, SEARCY SW. Biofuel and petroleum-based fuel supply chain research: A literature review. **Biomass Bioenergy**. v.35, p. 3763-3774, 2011.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. v. 2, 17TH ed. Gaithersburg - USA: AOAC. Official method 993-20. 2000.

- ATADASHI IM, AROUA MK, ABDUL AZIZ A. Biodiesel separation and purification: a review. **Renewable Energy**. v.36, p.437-443, 2011.
- AYDIN, H.; İLKILIÇ, C. Effect of ethanol blending with biodiesel on engine performance and exhaust emissions in a CI engine. **Applied Thermal Engineering**. v.30, p.1199-1204, 2010.
- AZAD AK, KHAN MMK, AHASAN T, AHMED SF. Energy scenario: production, consumption and prospect of renewable energy in Australia. **Journal of Power and Energy Engineering**. v.2, p.19-25, 2014.
- BAIÃO NC, LARA LJC. Oil and fat in broiler nutrition. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.7, p.129-141, 2005.
- BALAT M, BALAT H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**. v.87, p.1815-1835, 2010.
- BANERJEE, A.; CHAKRABORTY, R. Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production – A review. **Resources, Conservation and Recycling**. v.53, p.490-497, 2009.
- BANKJOVIC-ILIC IB, STOJKOVIC IJ, STAMENKOVIC OS, VELJKOVIC VB, HUNG Y. Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 32, p.238-254, 2014.
- BEN BELGACEM Z, BIJTTEBIER S, VERRETH C, VOORSPOELS S, VAN DE VOORDE I, AERTS G, WILLEMS KA, JACQUEMYN H, RUYTERS S, LIEVENS B. Biosurfactant production by *Pseudomonas* strains isolated from floral nectar. **Journal of Applied Microbiology**. v.118, p.1370-1384, 2015.
- BHATTI HN, HANIF MA, QASIM M, REHMAN AU. Biodiesel production from waste tallow. **Fuel**. v.87, p.2961-2966, 2008.
- BP Group. Energy outlook 2035. February 2015. Available at: bp.com/energyoutlook. Accessed June 01, 2015.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Agência Nacional do Petróleo (ANP). Lei N° 11.097 de 13 de Janeiro de 2005. **Introdução do biodiesel na matriz energética brasileira**. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria Recursos Hídricos e Ambiente Urbano. Lei N° 12.305, de 02 de Agosto de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília, 2010.

- BROD FCA, PELISSER MR, BERTOLDO JB, VERNAL J, BLOCH JR C, TERENCE H, ARISI ACM. Heterologous expression and purification of a heat-tolerant *Staphylococcus xylosus* lipase. **Molecular Biotechnology**. v.44, p.110-119, 2010.
- BRUNSCHWIG, C.; MOUSSAVOU, W.; BLIN, J. Use of bioethanol for biodiesel production. **Progress in Energy and Combustion Science**. v.38, p.283-301, 2012.
- CAMPOS JM, STAMFORD TL, SARUBBO LA. Production of bioemulsifier with potential application in the food industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.172, p.3234-3252, 2014.
- CANOIRA L, RODRÍGUEZ-GAMERO M, QUEIROL E, ALCANTARA R, LAPUERTA M, OLIVA F. Biodiesel from low-grade animal fat: production process assessment and biodiesel properties characterization. **Industrial and Chemical Engineering Research**. v.47, p.7997-8004, 2008.
- CARRIQUIRY MA, DU XD, TIMILSINA GR. Second generation biofuels: Economics and policies. **Energy Policy**. v.39, p.4222-4234, 2011.
- CASPETA L, NIELSEN J. Economic and environmental impacts of microbial biodiesel. **Nature Biotechnology**. v.31, p.789-793, 2013.
- CENGIZ O, SEHMUS A. Biodiesel production from inedible animal tallow and a experimental investigation of its use as an alternative fuel in a direct injection diesel engine. **Applied Energy**. v.86, p.14-20, 2009.
- CHAKRABORTY R, GUPTA AK, CHOWDHURY R. Conversion of slaughterhouse and poultry farm animal fats and wastes to biodiesel: Parametric sensitivity and fuel quality assessment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.29, p.120-134, 2014.
- CHAUHAN, B. S.; KUMAR, N.; CHO, H. M. Performance and emissions studies on an agriculture engine on neat Jatropha oil. **Journal of Mechanical Science and Technology**. v.24, p.529-535, 2010.
- CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, A. P.; DI LUCCIO, M. Viability of *Staphylococcus xylosus* during shelf-life of *dulce de leche* prepared by vacuum evaporation. **Ciência Rural**. v.41, n.11, p.2026-2031, 2011.
- DAMASCENO FRC, CAMMAROTA MC, FREIRE DMG. The use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.95, p.241-246, 2012.

- DESAI JD, BANAT IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.61, p.47-64, 1997.
- DEMIRBAS A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion & Management**. v.50, p.14-34, 2009.
- DIAS JM, FERRAZ CA, ALMEIDA MF. Using mixtures of waste frying oil and pork lard to produce biodiesel. **Proceedings of World Academy of Science: Engineering Technology**. v.46, 2008.
- DOGAN TH, TEMUR H. Effect of fractional winterization of beef tallow biodiesel on the cold flow properties and viscosity. **Fuel**. v.108, p.793-796, 2013.
- DOUAIRE, M.; di BARI, V.; NORTON, J. E.; SULLO, A.; LILLFORD, P.; NORTON, I. T. Fat crystallization at oil-water interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.203, p.1-10, 2014.
- DUBEY K, JUWARKAR A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.17, p.61-69, 2001.
- DUFOUR, J.; SERRANO, D. P.; GÁLVEZ, J. L.; GONZÁLEZ, A.; SORIA, E.; FIERRO, J. L. G. Life cycle assessment of alternatives for hydrogen production from renewable and fossil sources. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.37, p.1173-1183, 2012.
- DULERMO R, MELÉNDEZ HG, AMARO RL, THÉVENIEAU F, NICAUD JM. Unraveling fatty acid transport and activation mechanisms in *Yarrowia lipolytica*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1851, p.120-1217, 2015.
- DUNNE PG, MONAHAN FJ, O'MARA FP, MOLONEY AP. Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. **Meat Science**. v.81, p.28-45, 2009.
- EN Standards. *Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of Ester and linolenic acid methyl ester contents. EN 14103*. 2011
- ENCINAR, J. M.; SÁNCHEZ, N.; MARTÍNEZ, G.; GARCÍA, L. Study of biodiesel production from animal fats with high free fatty acid content. **Bioresource Technology**. v.102, p.10907-10914, 2011.
- FARGIONE J, HILL J, TILMAN D, POLASKY S, HAWTHORNE P. Land clearing and the biofuel carbon debt. **Science**. v.319, p.1235-1238, 2008.

- FENG X, PATTERSON DA, BALABAN M, EMANUELSSON EAC. Characterization of tributyrin hydrolysis by immobilized lipase on woolen cloth using conventional batch and novel spinning cloth disc reactor. **Chemical Engineering Research and Design**. v.91, p.1684-1692, 2013.
- FERREIRA T, AZEVEDO D, COELHO MA, ROCHA-LEÃO MH. The crude oil degrading potential of *Yarrowia lipolytica*. **New Biotechnology**. v.25, p.S80 – S81, 2009.
- FIEGLER H, BRUCKNER R. Identification of the serine acetyltransferase gene of *Staphylococcus xylosus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.148, p.181-187, 1997.
- FONSECA RR, SILVA AJR, DE FRANÇA FP, CARDOSO VL, SÉRVULO EFC. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.137, p.471-486, 2007.
- FONTES GC, AMARAL PFF, NELE M, COELHO MAZ. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2010, Article ID 821306, 8 pages, 2010.
- FONTES GC, RAMOS NM, AMARAL PFF, NELE M, COELHO MAZ. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.29, p.483-493, 2012.
- GAUTAM KK, TYAGI VK. A review of microbial surfactant. **Journal of Oleo Science**. v.55, p.155-166, 2006.
- GEORGE S, JAYACHANDRAN K. Analysis of rhamnolipids biosurfactants produced through submerged fermentation using Orange fruit peelings as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.158, p.694-705, 2009.
- GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, J. F. M.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food Security: The Challenge of feeding 9 billion people. **Science**. v. 327, p.812-818, 2010.
- GOH CS, LEE KT. Second-generation biofuel (SGB) in Southeast Asia via lignocellulosic biorefinery: Penny-foolish but pound-wise. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.15, p.2714-2718, 2011.
- GUI MM, LEE KT, BHATIA S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**. v.33, p.1646-1653, 2008.
- Instituto Adolfo Lutz – IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4^a Edição. 1^a Edição digital. Método IAL 328/IV. 2008.

- GURU M, ARTUKOGLU BD, KESKIN A, KOCA A. Biodiesel production from waste animal fat and improvement of its characteristics by synthesized nickel and magnesium additive. **Energy Conversion & Management**. v.50, p.498-502, 2009.
- GURU M, KOCA A, CAN O, INAR C, SAHIN F. Biodiesel production from waste chicken fat based sources and evaluation with Mg based additive in a diesel engine. **Renewable Energy**. v.35, p.637-643, 2010.
- International energy agency – IEA. Key world energy statistics 2014. International energy agency. Available at: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2014.pdf>. 2014. Paris OECD/IEA. Accessed February 22, 2015.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**. v.13, n.4, p.390-397, 2002.
- JANAUN J, ELLIS N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.14, p.1312-1320, 2010.
- JANCHIV A, OH Y, CHOI S. High quality biodiesel production from pork lard by high solvent additive. **ScienceAsia**. v.38, p.95-101, 2012.
- JANG Y, PARK JM, CHOI S, CHOI YJ, SEUNG DY, CHO JH, LEE SY. Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on system metabolic engineering approaches. **Biotechnology Advances**. v.30, p.989-1000, 2012.
- JOSHI RM, PEGG MJ. How properties of biodiesel fuel blends at low temperatures. **Fuel**. v.86, p.143-151, 2007.
- KIM HS, JEON JW, KIM BH, AHN CY, OH HM, YOON BD. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 391–396, 2006.
- KIM SH, KIM S, PARK S, KIM HK. Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.85-86, p.10-16, 2013.
- KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**. v.36, p.364-373, 2010.

KNOTHE G, DUNN RO. A comprehensive evaluation of the melting points of fatty acids and esters determined by differential scanning calorimetry. **Journal of American Oil Society**. v.86, p.843-856, 2009.

LANSER AC, NAKAMURA LK. Identification of a *Staphylococcus warneri* species that converts oleic acid to 10-ketostearic acid. **Current Microbiology**. v.32, p.260-263, 1996.

LEVINSON WE, KURTZMAN CP, KUO TM. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme and Microbial Technology**. v.41, p.292-295, 2007.

LIN SC. Biosurfactants: Recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.66, p.109-120, 1996.

LONG X, MENG Q, ZHANG G. Application of biosurfactant rhamnolipid for cleaning of UF membrane. **Journal of Membrane Science**. v.457, p.113-119, 2014.

LU J, NIE K, XIE F, WANG F, TAN T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. **Process and Biochemistry**. v.42, p.1367-1370, 2007.

LUNA JM, RUFINO RD, JARA AMAT, BRASILEIRO PPF, SARUBBO LA. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v.480, p.413-418, 2015.

MA, F. R.; CLEMENTS, L. D.; HANNA, M. A. The effects of catalyst, free fatty acids, and water content on transesterification of beef tallow. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**. v.41, p.1261-1264, 1998.

MANSOUR, S.; BAILLY, J.; LANDAUD, S.; MONNET, C.; SARTHOU, A. S.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LEROY, S.; IRLINGER, F.; BONNARME, P. Investigation of association of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosus*, and *Lactococcus lactis* in culture as a first step in microbial interaction analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. v.75, n.20, p.6422-6430, 2009.

MARCHANT R, BANAT IM. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**. v.30, p.558-565, 2012.

MARQUES RV, DUVAL EH, CORREA LB, CORREA EK. Increase of unsaturated fatty acids (low melting point) of broiler fatty waste obtained through *Staphylococcus*

- xylosus fermentation. **Current Microbiology**. 2015. DOI: 10.1007/s00284-015-0890-y
- MAURIELLO G, CASABURI A, BLAIOTTA G, VILLANI F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**. v.67, p.149-158, 2004.
- McCARTHY, P.; RASUL, M. G.; MOAZZEM, S. Comparison of the performance and emissions of different biodiesel blends against petroleum diesel. **International Journal of Low-Carbon Technologies**. v.6, p.255-260, 2011.
- MENDONÇA DR, ANDRADE HMC, GUIMARÃES PRB, VIANNA RF, MENEGHETTI SMP, PONTES LAM, TEIXEIRA LSG. Application of full factorial design and Doehlert matrix for the optimization of beef tallow methanolysis via homogenous catalysis. **Fuel Processing Technology**. v.92, p.342-348, 2011.
- MNIF I, ELLOUZE-CHAABOUNI S, GHRIBI D. Economic production of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant using local agro-industrial wastes and its application in enhancing solubility of diesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v.88, p.779-787, 2013.
- MORAES MAS, KRAUSE LC, CUNHA ME, FACCINI CS, MENEZES EW, VESES RC, RODRIGUES MRA, CARAMÃO EB. Tallow biodiesel: Properties evaluation and consumption tests in a diesel engine. **Energy & Fuels**. v.22, p.1949-1954, 2008.
- MOSBAH H, SAYARI A, BEZZINE S, GARGOURI Y. Expression, purification, and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosus* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala. **Protein Expression and Purification**. v.47, p.516-523, 2006.
- MULLER MM, KUGLER JH, HENKEL M, GERLITZKI M, HORMANN B, POHNLEIN M, SYLDATK C, HAUSMANN R. Rhamnolipids – Next generation surfactants?. **Journal of Biotechnology**. v.162, p.366-380, 2012.
- NELSON RG, SCHROCK MD. Energetic and economic feasibility associated with the production, processing and conversion of beef tallow to a substitute diesel fuel. **Biomass and Bioenergy**. v.30, p.584-591, 2006.
- ONER C, ALTUN S. Biodiesel production from inedible animal tallow and a experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct inject diesel engine. **Applied Energy**. v.86, p.2114-2120, 2009.
- RUFINO RD, LUNA JM, MARINHO PHC, FARIAS CBB, FERREIRA SRM, SARUBBO LA. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant

Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science and Engineering**. v.109, p.117-122, 2013.

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

SAMANLI, S.; CUHADAROGLU, D.; IPEK, H.; UCBAS, Y. The investigation of grinding kinetics of power plant solid fossil fuel in ball mill. **Fuel**. v.89, p.703-707, 2010.

SANTORI G, DI NICOLA G, MOGLIE M, POLONARA F. A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. **Applied Energy**. v.92, p.109-132, 2012.

SARAVANAN V, VIJAYAKUMAR S. Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* PB3A using agro-industrial wastes as a carbon source. **Malaysian Journal of Microbiology**. v.10, p.57-62, 2014.

SELVAM DJP, VADIVEL K. An experimental investigation on performance, emission, and combustion characteristics of a diesel engine fueled with methyl esters of waste pork lard and diesel blends. **International Journal of Green Energy**. v.10, p.908-923, 2013.

SHARMA M, SINGH SS, MANN P, SHARMA M. Biocatalytic potential of lipase from *Staphylococcus* sp. MS1 for transesterification of jatropha oil into fatty acid methyl esters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.30, p.2885-2897, 2014.

SHOJAEEFARD MH, ETGAHNI MM, MEISAMI F, BARARI A. Experimental investigation on performance and exhaust emissions of castor oil biodiesel from a diesel engine. **Environmental Technology**. v.34, p.2019-2026, 2013.

SINGH SP, SINGH D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.14, p.200-216, 2010.

SOUZA FASD, SALGUEIRO AA, ALBUQUERQUE CDC. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.29, p.61-67, 2012.

- SOUISSI N, BOUGATEF A, TRIKI-ELLOUZ Y, NASRI M. Production of lipase and biomass by *Staphylococcus simulans* grown on sardinella (*Sardinella aurita*) hydrolysates and peptone. **African Journal of Biotechnology**. v.8, p.451-457, 2009.
- STAJIC M, PERSKY L, FRIESEM D, HADAR Y, WASSAR SP, NEVO E, VUKOJEVIC J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected Pleutorus species. **Enzyme and Microbial Technology**. v.38, p.65-73, 2006.
- THLIVEROS P, KIRAN EU, WEBB C. Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. **Bioresource Technology**. v.157, p.181-187, 2014.
- VELIOGLU Z, OZTURK UREK R. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by Pleurotus djamor in solid state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Article in Press. 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.007>
- XING MN, ZHANG XZ, HUANG H. Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis. **Biotechnology Advances**. v.30, p.920-929, 2012.
- XU X, KIM JY, OH YR, PARK JM. Production of biodiesel from carbon sources of macroalgae Laminaria japonica. **Bioresource Technology**. v.169, p.455-461, 2014.
- XUE J, GRIFT TE, HANSEN AC. Effect of biodiesel on engine performances and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.15, p.1098-1116, 2011.
- WADEKAR SD, KALE SB, LALI AM, BHOWMICK DN, PRATAP AM. Jatropha oil and karanja oil as carbon sources for production of sophorolipids. European **Journal of Lipid Science and Technology**. v.114, p.823-832, 2012.
- YOO HY, SIMKHADA JR, CHO SS, PARK DH, KIM SW, SEONG CN, YOO JC. A novel alkaline lipase from Ralstonia with potential application in biodiesel production. **Bioresource Technology**. v.102, p.6104-6111, 2011.
- ZHANG X, YAN S, TYAGI RD, SURAMPALLI RY, VALÉRO JR. Wastewater sludge as raw material for microbial oil production. **Applied Energy**. v.135, p.192-201, 2014.
- ZHAO X, QI F, YUAN C, DU W, LIU D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.44, p.182-197, 2015.

ZINJARDE S, APTE M, MOHITE P, KUMAR AR. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. **Biotechnology Advances**. v.32, p.920-933, 2014.