



Glicerol de biodiesel

Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel

Ilustrações cedidas pelos autores

RESUMO

A intensiva busca por fontes alternativas de energia e processos sustentáveis visando a redução da poluição ambiental e o aquecimento global do planeta tem estimulado o mercado mundial de combustíveis limpos. Os biocombustíveis, como o biodiesel, representam uma alternativa renovável e ambientalmente segura aos combustíveis fósseis. Sua produção encontra-se em crescimento acelerado, e como consequência, a quantidade de subprodutos gerados de sua produção, principalmente o glicerol bruto. Com o objetivo reduzir os futuros problemas ambientais por acumulação de glicerol e tornar a produção de biodiesel mais rentável, a implementação de estratégias biotecnológicas que utilizam o glicerol como única fonte de carbono para obtenção de produtos de maior valor agregado, vem sendo estudado como uma promissora alternativa e solução. Este trabalho descreve estudos bem documentados sobre o mecanismo metabólico de glicerol por microrganismos e pertinentes com a proposta de utilização do glicerol em processos microbianos. Da mesma forma são apresentadas novas estratégias que podem ser exploradas visando o aproveitamento deste material e sua bioconversão em bioprodutos de alto valor agregado.

Palavras-chave: glicerol, fermentação, bioproduto.

Biotechnological strategies for glycerol utilization derived from biodiesel production

ABSTRACT

The claim for reducing environment pollution stimulates the world market of clean fuels. Biofuels as biodiesel, represents a renewable and environmentally safety alternative to fossil fuel. Nonetheless, its production is increasing considerably, and as a consequence, the amount of raw glycerol (byproduct) generated is growing exponentially. With the aim to reduce environment problems due to accumulation of glycerol, biotechnological strategies for its bioconversion in value-added products are being implementing. This work presents detailed arguments on the metabolic mechanisms of glycerol assimilation by microorganisms, as well as, a description of the most recent biotechnological processes applied to obtain bioproducts from glycerol.

Keywords: glycerol; fermentation; bioproduct.

INTRODUÇÃO

A utilização de fontes alternativas de energia é umas das grandes prioridades atuais, que vem contribuir significativamente para contornar os graves problemas ocasionados pelo desenvolvimento tecnológico. A preocupação atual pela redução da poluição e a crise energética têm estimulado o mercado mundial de biocombustíveis. A economia global mantém-se em crescimento e a demanda por energia limpa e recursos renováveis encontra-se em contínuo aumento (BILGEN et al., 2006).

Neste sentido, a busca intensiva por combustíveis alternativos ao petróleo, como o biodiesel, apresenta grande importância principalmente para os países emergentes, uma vez que sua produção auxilia à conservação do meio ambiente, mediante a redução dos gases responsáveis pelo aquecimento global, e contribui para o desenvolvimento social mediante a geração de empregos (OLIVEIRA et al., 2006). No Brasil, a produção e comercialização de biodiesel possui importantes vantagens devido à grande disponibilidade de matéria-prima para sua produção e ao crescimento contínuo da indústria de óleos vegetais e etanol (OLIVEIRA et al. 2006, OISTI, 2006).

A produção de biodiesel está significativamente acelerada, uma vez que o governo brasileiro estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao combustível de petróleo mediante a lei 11097/2005. No ano 2013, a quantidade de biodiesel a ser adicionado deverá alcançar 5 % do volume total de diesel utilizado (ANP, 2007). O glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10 % do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol (DASARI et al., 2005). Estima-se que com o incremento do volume de biodiesel, o glicerol co-produzido aumentará de 83 para 330 milhões L/ano até o ano 2010 (MME, 2007). Com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação de glicerol e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessário a busca de alternativas para o uso do glicerol bruto gerado nesta produção. Este subproduto, na forma pura, possui inúmeras aplicações industriais (aditivos para a indústria de alimentos, química e farmacêutica). O glicerol obtido resultante da transesterificação de triglicerídios com álcool apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que lhe conferem um baixo custo (OOI et al., 2004). A rentabilidade de vários processos químicos

Juan Daniel Rivaldi*

Engenheiro Químico, Mestre em Biotecnologia Industrial
Escola de Engenharia de Lorena (EEL), Universidade de São Paulo (USP)

*Autor para correspondência:
danielrivaldi@gmail.com

Boutros Fouad Sarroub

Licenciado em Química;
Mestre em Análise de Processos na Indústria Química;
Doutor em Biotecnologia Industrial

Escola de Engenharia de Lorena (EEL), Universidade de São Paulo (USP)

Rodolfo Fiorilo

Engenheiro Químico
Gerente Industrial – DAFFER Química Ltda.

Silvio Silvério da Silva

Engenheiro de Alimentos;
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos;
Doutor em Tecnologia Bioquímica- Farmacêutico
Escola de Engenharia de Lorena (EEL), Universidade de São Paulo (USP)

depende em parte, da venda dos subprodutos, permitindo a redução dos custos de produção e conseqüentemente, do preço final do produto. Dessa forma, existe um grande interesse na purificação do glicerol ou no seu reaproveitamento direto, sem tratamento, o que proporcionará à viabilização do processo de produção de biodiesel, permitindo que este se torne competitivo no crescente mercado de biocombustíveis. Os processos para sua purificação incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para a remoção principalmente de K^+ e Na^+ utilizados como catalisadores (YONG et al. 2001). No entanto, os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando conseqüentemente os problemas e riscos ambientais.

A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (ITO et al., 2005). Neste sentido, a biotecnologia moderna, com todo seu avanço trará grandes contribuições e permitirá a obtenção de biomoléculas e produtos com importantes propriedades.

NATUREZA E CARACTERÍSTICAS DO GLICEROL

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva. Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano.

Na natureza, o glicerol existe em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão manso) e animais em formas combinadas de glicerina com ácidos graxos. O glicerol é também um composto considerado fundamental dentro do sistema metabólico de microrganismos; onde atua como precursor de numerosos compostos; e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (LAGES, SILVA-GRAÇA, LUCAS, 1999).

Em microrganismos eucarióticos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos (WANG et al., 2001).

Em humanos, o glicerol participa na termo-regulação do corpo, resistência a altas temperaturas, na resistência dos músculos em atividades físicas e na resposta neural da variação da glicemia (YANG et al., 1999). O glicerol na sua forma pura apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e em clorofórmio.

Devido às suas características físicas e químicas

e ao fato de ser inócuo, o glicerol puro apresenta diferentes aplicações na indústria de cosméticos, farmacêutica, detergentes, na fabricação de resinas e aditivos e na indústria de alimentos. Apesar de o glicerol apresentar estas aplicações na forma pura, poucos estudos estão sendo direcionados para a utilização de glicerol bruto na forma direta.

OBTENÇÃO E TRATAMENTO DO GLICEROL BRUTO

Subproduto natural do processamento de óleos e gorduras, o glicerol pode ser obtido mediante reação de saponificação de ácidos graxos (óleos, azeites ou sebo) com hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, como co-produto da fabricação de biodiesel e em menor proporção, mediante síntese microbiana. A produção sintética de glicerina a partir de cloreto de alil via epícloridrina encontra-se em declínio devido ao excesso no mercado de glicerol do processo de biodiesel. Dentro deste contexto, o glicerol constitui o maior subproduto gerado no processo de produção do biodiesel via esterificação de ácidos graxos vegetais ou gordura animal com álcool (metanol ou etanol) para produzir ésteres e glicerol na presença de catalisador (KOH ou $NaOH$) (DIECKELMANN e HEINZ, 1988)

A equação global de transesterificação é apresentada na Figura 1a, onde são necessários três moles de álcool por cada mol de triglicerídeo utilizado. Esta reação global é conseqüência de um número de reações reversíveis e consecutivas mostradas na Figura 1b. A primeira consiste na conversão de triglicerídeos em diglicerídeos, seguida da conversão destes diglicerídeos em monoglicerídeos, e finalmente de glicerídeos a glicerol, rendendo uma molécula de é-

ter de álcool por cada glicerídeo em cada etapa da reação.

No final da etapa de transesterificação, o glicerol e ésteres formam uma massa líquida de duas fases, que são facilmente separáveis por decantação ou centrifugação. A fase superior, a mais leve ou menos densa, contém os ésteres metílicos ou etílicos constituintes do biodiesel. A fase inferior ou pesada encontra-se composta de glicerol bruto e impurezas.

O valor do glicerol bruto obtido da produção de biodiesel encontra-se entre 0,2 a 0,4 R\$/kg. Este baixo valor é atribuído ao conteúdo de aproximadamente 30 % (p/p) de impurezas e ao grande volume deste co-produto gerado pelas indústrias. O glicerol bruto apresenta-se na forma de líquido viscoso pardo escuro, que contém quantidades variáveis de sabão, álcool (metanol ou etanol), monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros e água (OOI et al., 2004). A porcentagem de glicerol na mistura varia entre 65 a 70 % (p/p), sendo a maior parte das impurezas sabão formado pela reação dos ácidos graxos livres com excesso de catalisador (saponificação). Dessa forma, o aspecto do glicerol bruto encontra-se estreitamente relacionado ao conteúdo de sabão, que proporciona aparência de viscoso e escuro. Para reduzir o sabão gerado, recomenda-se conduzir a reação de transesterificação com matérias primas (triglicerídeos) com baixo conteúdo em ácidos graxos livres e água, ao mesmo tempo de reduzir a quantidade de catalisador (OOI et al., 2004).

A mistura residual resultante é submetido ao processo de acidulação com ácido concentrado (HCl , H_2SO_4 , ou H_3PO_4) para a separação de glicerol e ácidos graxos do sabão (Figura 2a). No entanto, a maior parte dos processos de tratamento de glicerol é conduzida utilizando HCl ou H_2SO_4 , sendo

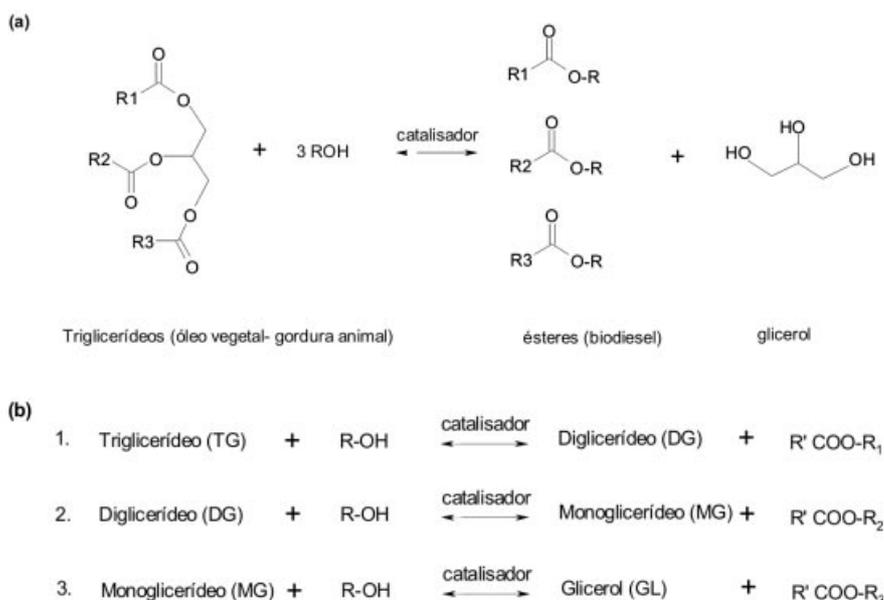


Figura 1. (a) Reação global e (b) Reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos. R_1 , R_2 , R_3 e R representam grupos alquilas

o H_3PO_4 restrito pelo alto custo. Durante a acidulação, forma-se certa quantidade de sal (reação do ácido inorgânico com íon do sabão) que se deposita na fase inferior de um líquido de três fases, estando a fase superior constituída pelos ácidos graxos livres, e a fase intermédia composta principalmente por glicerol e álcool (Figura 2b). O glicerol recuperado alcança concentrações superiores a 80 % (p/p), com quantidades variáveis de água, corantes e álcool. Posteriormente, o glicerol com excesso de ácido é neutralizado com solução de NaOH e submetido a tratamento térmico (70°C) para eliminar os componentes voláteis (recuperação de álcool)(OOI et al., 2004; FUKUDA, KONDO, NODA, 2001). Nesta forma, parcialmente livre de impurezas, o glicerol pode ser utilizado como substrato de fermentação por várias espécies de microrganismos.

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel. No entanto, a procura pela glicerina purificada é muito maior, devida ao seu valor econômico. A

aplicação do glicerol na indústria está condicionada ao grau de pureza, que deve ser igual ou superior a 95%. Para obter grau de pureza superior a 95% (p/p)(grau alimentício ou farmacêutico), o glicerol deve ser submetido a destilação, mas sob custo elevado .

Por outro lado, de acordo com a Tabela 2, o glicerol bruto contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, e que são factíveis de serem utilizados por microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos (THOMPSON, HE, 2006).

ASSIMILAÇÃO, METABOLISMO E CONVERSÃO MICROBIOLÓGICA DO GLICEROL.

O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas¹⁹ para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (DILLIS et al., 1980).

Vários estudos foram desenvolvidos visando a utilização de glicerol como fonte de carbono por microrganismos, especialmente por bactérias. Muitos deles apontam principalmente a mecanismos de assimilação de glicerol por estes microrganismos para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (PAPANIKOLAOU et al., 2002; ITO et al., 2005; CHENG et al 2007).

O transporte do glicerol através da membrana celular constitui a primeira etapa para o seu metabolismo. De uma forma geral, a assimilação de glicerol por parte dos microrganismos envolve o transporte passivo (GANCEDO, GANCEDO, 1968) e transporte ativo (LAGES, SILVA-GRAÇA, LUCAS, 1999) através da membrana plasmática.

O transporte passivo inclui a difusão simples (permeação não específica) e a difusão facilitada mediada por proteínas localizadas nas camadas mais internas da membrana plasmática (MIP), as permeases. A difusão simples, sendo ATP não dependente, requer um gradiente de concentração para o transporte do substrato através da membrana. Conseqüentemente, a concentração do substrato no interior da célula não

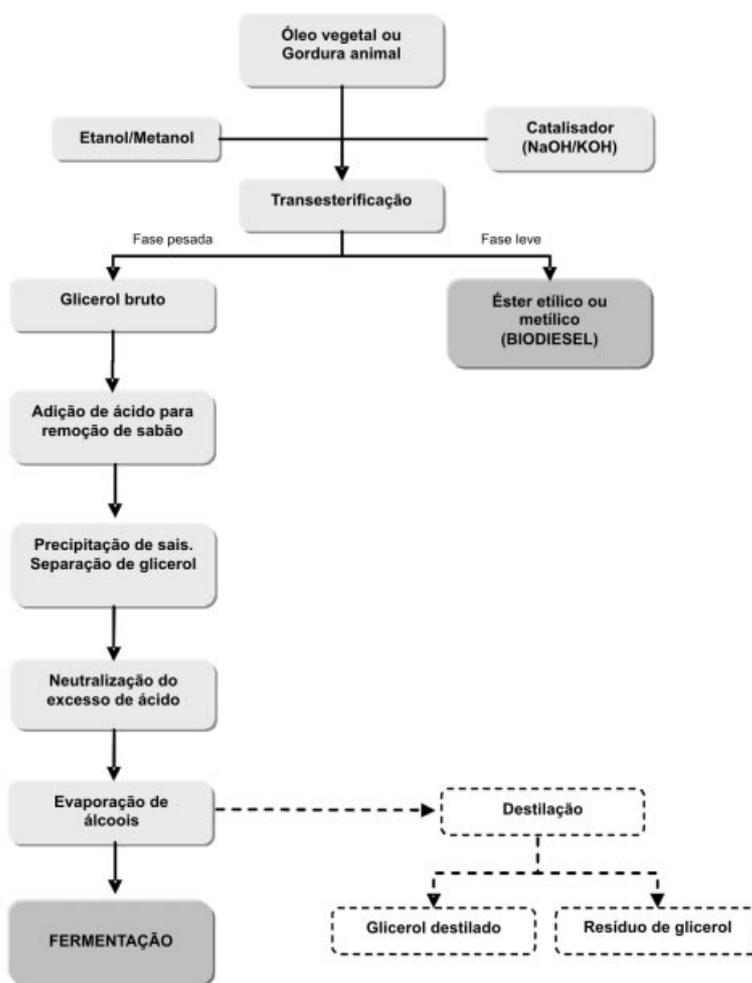


Figura 2.

(a) - Fluxograma de produção de biodiesel e tratamento de purificação do glicerol



Figura 2.

(b)- Separação do glicerol após tratamento com ácido concentrado, a fase superior corresponde a ácidos graxos, fase intermédia: glicerol, fase inferior: glicerol + sais

supera aquela encontrada no meio de cultura(MOAT, FOSTER, SPECTOR, 2002). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estudos desenvolvidos por Luyten et al. (1995), assinalaram a existência de permeases FPS1, específicas para transporte de glicerol (Figura 3).

O glicerol é um dos poucos substratos que atravessa a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas. Em bactérias como *Escherichia coli*, a proteína do

tipo poro-canal-G1pF atua por sensibilização mecânica sem gasto energético na presença de glicerol. Este facilitador permite a assimilação, além de glicerol, de pequenas moléculas de polihidroxi álcoois, uréia e glicina, mas exclui moléculas carregadas como gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (HOLST et al., 2000). Em quanto aos mecanismos genéticos, foram descritos três genes responsáveis pela assimilação e regulação do conteúdo intercelular de glicerol em *Saccharomyces cerevisiae*, o GUP1 e GUP2 (HOLST et al., 2000) e FPS1 (LUYTEN et al., 1995) associados diretamente com o transporte facilitado e que são expressas conforme estímulos provocados nas células, como o estresse osmótico. Por outro lado, mecanismos de transporte ativo simporte glicerol/H⁺ e simporte glicerol/Na⁺ (dependentes de ATP) foram descritos em numerosas espécies de leveduras, entre elas *Debaryomyces hansenii*, *Pichia sorbitophila*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* (LAGES, SILVA-GRAÇA, LUCAS, 1999). Tanto as acumulações de glicerol por estresse, como a existência de mecanismos ativos, são comuns em grande variedade de leveduras (LAGES, LUCAS, 1997).

Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática pelos possíveis mecanismos, o glicerol pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas independentes, apresentado na Figura 4.

Uma das rotas, provavelmente a principal para a oxidação de glicerol por leveduras, consiste na fosforilação do glicerol pela enzima glicerol-quinase para formar glicerol-3-fosfato, que é reduzido a dihidroxiacetona fosfato pela enzima mitocondrial glicerol fosfo-ubiquinona oxidoreductase (FAD dependente) (GANCEDO, SERRANO, 1989).

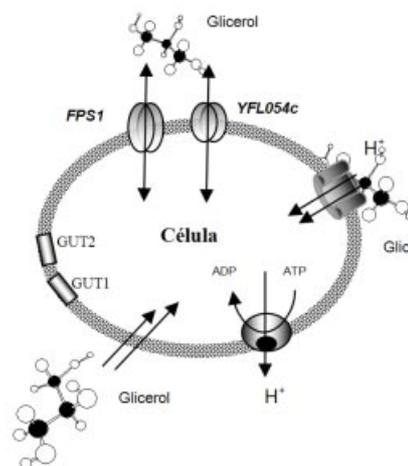


Figura 3. Tipos de transporte para a assimilação de glicerol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. FPS1 e YFL054c são proteínas de transporte, GUT1 e GUT2 são genes para expressão de enzimas de assimilação de glicerol. (Baseado em: NEVES, LAGES, LUCAS, 2004)

Estudos demonstraram que, os genes que controlam a síntese das enzimas glicerol-quinase e fosfo-ubiquinona oxidoreductase são GUT1 e GUT2, respectivamente (GRAUSLUND, LOPES, RONNOW, 1999). A expressão dessas enzimas é reprimida durante o crescimento celular em substratos fermentescíveis como glicose, mas desregulado quando glicerol ou etanol é utilizado como a principal fonte de carbono (GRAUSLUND, RONNOW, 2000).

Outra possível via catabólica do glicerol corresponde à oxidação de glicerol e conseqüente formação de dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase. Após, a dihidroxiacetona é fosforilada a dihidroxiacetona fosfato pela enzima dihidroxiacetona quinase dependente de Adenosina Trifosfato (ATP). Gancedo e Gancedo (1968) reportaram que leveduras da espécie *Schizosaccharomyces pombe*, por exemplo, oxida glicerol mediante essa via sob condições de "stress" osmótico.

A dihidroxiacetona fosfato é considerada uma importante molécula intermediária para a gliconeogênese (síntese de hexoses), assim como para a obtenção de numerosos compostos através das vias oxidativas, incluindo, ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, etanol e outros compostos de interesse comercial (MOAT, FOSTER, SPECTOR, 2002). O crescimento de microrganismos em fontes de carbono alternativas aos carboidratos, como L-malato, acetato, ou glicerol, requer a capacidade de sintetizar hexoses necessárias para a produção de mucopeptídeos da parede celular, armazenagem de glicogênio, e outros compostos derivados de hexoses, como as pentoses, envolvidos na biosíntese de ácidos nucleicos (MOAT, FOSTER, SPECTOR, 2002).

Também, Hauge, King e Cheldelin (1955), fazem referência sobre a capacidade de algumas bactérias, entre elas *Acetobacter suboxydans*, de oxidar a molécula de dihidroxiacetona fosfato pela via pentose-fosfato, incrementando o número de bioprodutos possíveis de serem obtidos por via biotecnológica a partir de glicerol.

Em espécies de leveduras do gênero *Yarrowia sp.*, e em bactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* and *Bacillus weibii* (ZHAO, CHEN, YAO, 2006; GONZÁLEZ – PAJUELO et al., 2006; CHENG et al., 2007), observa-se que sob condições de anaerobiose, o glicerol sofre desidratação pela enzima glicerol desidratase para produzir 3-dihidroxi-propionaldeído.

Posteriormente, este intermediário é transformado pela enzima NADH dependente 1,3-propanodiol oxido-reductase para gerar 1,3-propanodiol, principal intermediário para produção de polímeros, resinas e aditivos de importantes aplicações industriais (GONZÁLEZ – PAJUELO et al., 2006; CHENG et al., 2007). Uma vez que o glicerol é assimilado no interior da célula, numerosos compostos são produzidos como conseqüência do seu metabolismo.

BIOPRODUTOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO MICROBIANA DO GLICEROL

A extraordinária expansão da indústria de biodiesel no Brasil e no mundo vem originando grandes volumes do principal co-produto, o glicerol. A superprodução de glicerol afeta negativamente o preço do biodiesel no mercado, tornando imperiosa a busca de novas

		Matéria-prima				
Composição	Mostarda*	Mostarda**	Canola	Soja	ROV	
ppm	Ca	11,7	23,0	19,7	11,0	ND
	K	ND	ND	ND	ND	ND
	Mg	3,9	6,6	5,4	6,8	0,4
	P	25,3	48,0	58,7	53,0	12,0
	S	21,0	16,0	14,0	ND	19,0
	Na	1,17	1,23	1,07	1,2	1,4
%	C	24,0	24,3	26,3	26,0	37,7
	N	0,04	0,04	0,05	0,04	0,12

Ida Gold, ** Pac Gold, ROV: resíduos de óleo vegetal(óleo usado),ND: não detectado

Tabela 1. Composição do glicerol bruto obtido durante a produção de biodiesel em função de diferentes matérias prima. (Adaptado de: THOMPSON, HE ,2006)

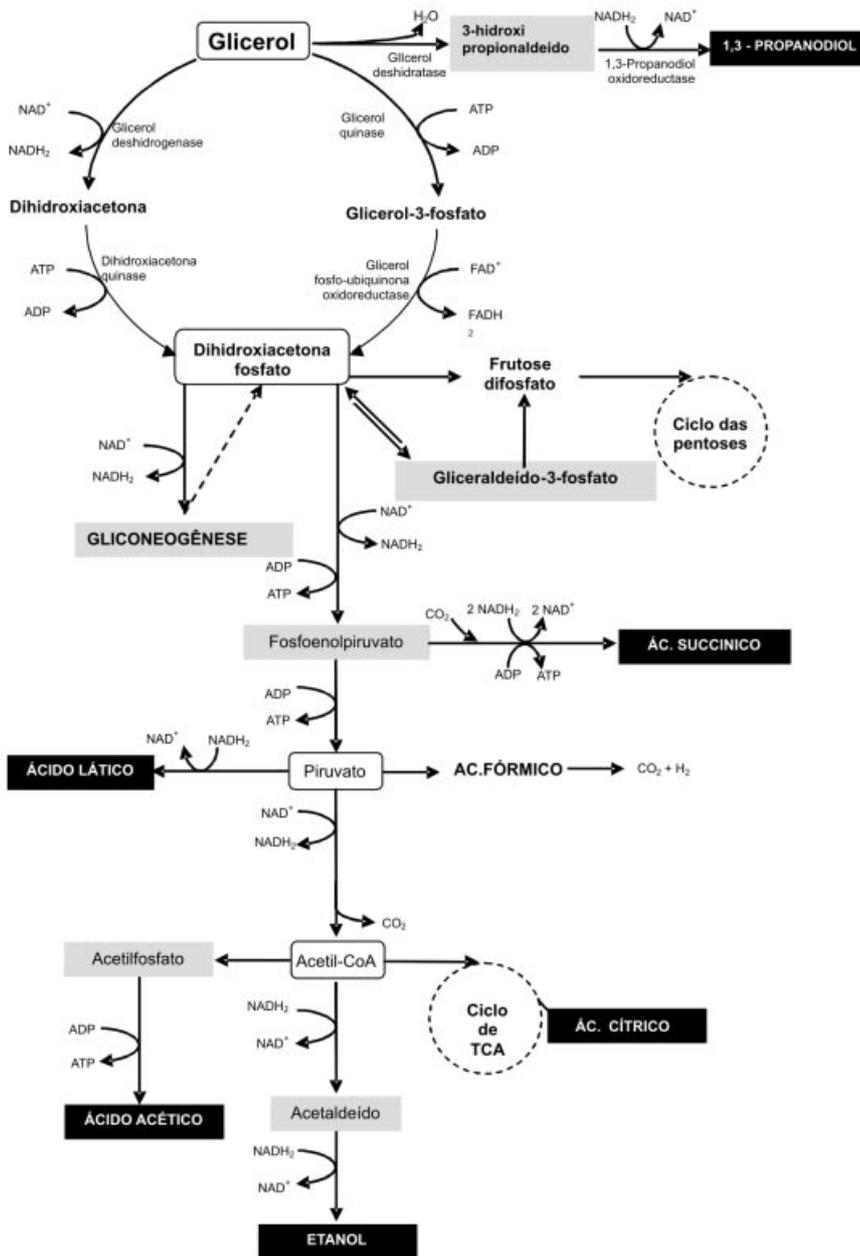


Figura 4. Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos e seus possíveis produtos. (Adaptado de: GANCEDO, GANCEDO, 1968; HAUGE, KING, CHELDELIN, 1955; XIU et al., 2007)

aplicações para este co-produto. Neste contexto, o glicerol vem sendo investigado como a futura fonte de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado.

A continuação, detalham-se os recentes processos fermentativos aplicados nos laboratórios de pesquisa científica para a obtenção de bioprodutos a partir do glicerol, independente do seu origem.

1,3-Propanodiol

O propanodiol é um composto intermediário para a síntese de compostos cíclicos e monômeros para poliésteres, poliuretanos

e polipropileno tereftalato. É conhecido que os processos químicos tradicionais de produção são altamente nocivos devido ao compostos tóxicos formados. As pesquisas mais importantes na utilização biotecnológica do glicerol bruto apontam principalmente à produção do composto intermediário 1,3-propanodiol (GONZALEZ-PAJUELO et al., 2006; XIU et al., 2007). Atualmente, estes compostos são produzidos quase exclusivamente a partir de um derivado do petróleo, o óxido de propileno, mediante processos químicos convencionais (SULLIVAN, 2003).

O campo de aplicação do composto 1,3-propanodiol é considerado amplamente

abrangente, diferentes setores comerciais, desde a produção de polímeros, tintas, resinas de poliéster, lubrificantes, anti-cogelante, até produção de cosméticos. Mediante fermentação de glicerol bruto por *Klebsiella pneumoniae* foram obtidos concentrações de até 56 g/L em escala de laboratório. No entanto, a produção de 1,3-propanodiol a escala industrial encontra-se limitado devido a que os a maioria dos microrganismos produtores, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Propionibacterium* and *Anaerobiospirillum*, são considerados patogênicos e requerem de condições estritas de anaerobiose e nutrientes específicos para seu desenvolvimento (BARBIRATO et al., 1997). Uma solução futura para o *scale-up* consistiria na utilização de ferramentas da engenharia genética para inserir genes que expressem enzimas geradoras de 1,3-propanodiol em microrganismos mais adaptados a condições industriais, como por exemplo, a bactéria *Escherichia coli* (DHARMADI, MURARKA, GONZÁLEZ, 2006).

Notoriamente, muitas espécies apresentam a capacidade de fermentar o glicerol produzindo 1,3-propanodiol, entre elas podem ser citadas *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* and *Bacillus welchii* (BARBIRATO et al., 1997; GONZALEZ-PAJUELO et al., 2006; XIU et al., 2007). Atualmente, as bactérias *Clostridium butyricum* e *Klebsiella pneumoniae* são consideradas as de maior utilização e provavelmente sejam as melhores produtoras deste composto (XIU et al., 2007). Recentemente, González-Pajuelo et al. (2005) comparando uma espécie natural de *Clostridium butyricum* VPI 3266 com outra geneticamente modificada *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5) (contendo genes para produção de 1,3-propanodiol), observaram que no tempo de 47 h de fermentação em batelada alimentada, a cepa modificada alcançou maior produtividade (0,65 mol/mol de glicerol, 1,7 g/L.h) que a cepa natural (0,69 mol/mol, 1,21 g/L.h). Em fermentação contínua de glicerol bruto e comercial (pureza: 80-90%) em uma taxa de diluição (D) de 0,05 h⁻¹ (pH 6,5; 35 °C) com a mesma cepa modificada, foram obtidos valores de rendimento e produtividade similares aos observados em batelada alimentada (0,61-0,64 mol/mol glicerol, 1,49-1,56 g/L.h). Os mesmos autores reportaram alta produtividade em 1,3-propanodiol (10,3 g/L.h) em cultivo contínuo da bactéria *Clostridium butyricum* (GONZÁLEZ-PAJUELO, ANDRADE, VASCONCELOS, 2005).

Outro aspecto considerado de importância é a imobilização de células em diferentes polímeros para sua re-utilização em fermentações consecutivas. O encapsulamento de células de *Klebsiella pneumoniae* em celulose-sulfato de sódio e polímero de metil dialil amônia desenvolvido por Zhao, Chen e Yao (2006), permitiu executar fermentações em batelada repetida, batelada alimentada e processo contínuo para a obtenção de 1,3-propanodiol sob concentrações de glicerol tão elevadas quanto 120 g/L. A quantidade de produto obtido foi de 63,1 g/L (5,7 g/L.h), 51,86 g/L (1,08 g/L.h) e 13,6 g/L (4,5 g/L.h) para fermentação em batelada simples, batelada alimentada e fermentação contínua, respectivamente. Apesar dos valores de produtividade na fermentação por batelada alimentada serem menores que na batelada simples, os resultados sugerem a potencialidade da

reutilização de células imobilizadas, principalmente por fornecer um ambiente estável para a célula frente a altas concentrações de substrato. A co-fermentação de glicerol e glicose foi avaliada por Xiu et al. (2007) para a produção de 1,3-propanodiol por *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. Na relação glicose-glicerol igual a 0,2 e sob condições de microaeração foram alcançados valores de produtividade igual a 1,95 g/L.h.

Os primeiros estudos tecnológicos para o aumento de escala foram desenvolvidos por Cheng et al. (2007), utilizando reator em processo por batelada alimentada de 5000 L de volume total. Sob condições de baixo potencial de oxidação, alcançado mediante fluxo de nitrogênio gás (0,15 vvm), foram fermentados 4000 L de meio contendo 40 g/L de glicerol a pH 6,8 ; 90 rpm e 37°C. A concentração máxima de produto foi de 58,8 g/L, mas com uma produtividade ainda baixa de 0,92 g/L.h. Estes resultados iniciais demonstram a factibilidade da produção de 1,3-propanodiol a escala piloto, mas novas tentativas deverão ser conduzidas para a sua otimização visando a projeção industrial.

Etanol

Etanol, butanol, e outros compostos são coproduzidos durante a fermentação de glicerol (DABROCK, BAHL, GOTTSCHALK, 1992). Ito et al. (2005) demonstraram a possibilidade de produzir etanol e hidrogênio por *Enterobacter aerogenes* HU-101 utilizando efluentes da indústria de biodiesel contendo até 41% (p/p) de glicerol. Convenientemente diluído (7,3 g/L), o efluente foi fermentado em forma descontínua em frascos anaeróbicos e em forma contínua utilizando reator de coluna empacotada. Na fermentação descontínua, os rendimentos em hidrogênio e etanol foram de 0,89 mol/mol de glicerol e 1 mol/mol glicerol, respectivamente. Rendimentos acima de 10 g/L foram obtidos em processo contínuo empregando cerâmica porosa como suporte de microrganismos. Neste processo, comparando meios contendo efluente de biodiesel e glicerol comercial, os mesmos autores observaram que produção de hidrogênio foi maior naquele meio com glicerol parcialmente purificado (60 mmol/L.h) que utilizando efluente (30 mmol/L h). Aparentemente, as impurezas que acompanham o efluente aumentaram a fragilidade dos flocos de microrganismos, facilitando o *wash-out* das células do reator na mesma taxa de diluição.

Em outros trabalhos, etanol e ácido fórmico foram os principais produtos da fermentação de glicerol pela bactéria *Klebsiella planticola*, em concentrações equimolar acima de 2 g/L (JARVIS, MOORE, THIELE, 1997). Estes resultados estimulam a procura de novos microrganismos para a fermentação de glicerol visando a produção de etanol e hidrogênio.

Ácidos orgânicos

Também, existem numerosos trabalhos direcionados para a produção de ácido cítrico e ácido succínico por fermentação de glicerol. Estes compostos são de ampla aplicação na

indústria de alimentos e constituem importantes intermediários para a indústria de polímeros e produção de compostos químicos como o 1,2-butanodiol e 2,4-butanodiol. Papanikolaou et al. (2002) obtiveram considerável quantidade de ácido cítrico, de ordem de 35 g/L, mediante fermentação de glicerol por *Yarrowia lipolytica*. Por sua parte, Rymowicz et al. (2006) publicaram estudos de assimilação de glicerol desenvolvidos com três cepas mutantes de *Yarrowia lipolytica*, obtendo concentrações de até 124,5 g/L de ácido cítrico. A produção de ácido succínico e ácido acético a partir de glicerol por *Anaerobiospirillum succiniciproducens* resultou em concentrações 6,5 vezes superiores a aquelas obtidas utilizando glicose como única fonte de carbono (LEE et al., 2001).

A síntese de ácido propiônico por células de *Propionibacteria acidipropionici* e *Propionibacteria freudenreichii* ssp. *sbermanii* imobilizadas em alginato de cálcio foi reportado por Bories et al. (2004). Sob condições de alta concentração de glicerol obtiveram-se concentrações de ácido propiônico de até 42 g/L.

Polihidroxicanoatos

A preocupação pela redução dos contaminantes ambientais vem acelerando novas pesquisas para a produção de polímeros biodegradáveis. Espécies de *Pseudomonas* produzem naturalmente polihidroxicanoatos (PHA), poliésteres lineares de compatível com uma ampla faixa de potenciais aplicações devido a suas propriedades físicas e biodegradabilidade (ASHBY, SOLAIMAN, FOGLIA, 2005).

Muitos microrganismos acumulam PHA sob condições de estresse, principalmente quando submetidos à falta de nitrogênio, fósforo ou oxigênio, e utilizam esse polímero quando a fonte externa de carbono é limitada. Historicamente, os ácidos graxos foram utilizados extensivamente para a síntese de PHA (ASHBY, SOLAIMAN, FOGLIA, 2005). Glicerol proveniente da produção de biodiesel apresenta-se como uma opção de substrato econômico para a produção deste tipo de biopolímeros. Borman e Roth (1999) utilizaram *Methylobacterium rhodesianum* para produzir polihidroxibutirato (PHB) na concentração de 10,5 g/L em fermentação por batelada com meio contendo 5 g/L de glicerol e caseína peptona. Koller et al. (2005) obtiveram polihidroxicanoatos numa concentração máxima de 16,2 g/L, mediante fermentação em batelada alimentada de soro de queijo e glicerol bruto por uma cepa selvagem de levedura. Para estressar as células, o cultivo foi conduzido sob tensão de oxigênio (taxa de 10 mL/min) e sem outra fonte de fósforo além daquela fornecida pelos 2,5 g/L de extrato de levedura. Um ponto interessante nesta pesquisa foi a capacidade da cepa selvagem de produzir simultaneamente 3-hidroxicinvalerato (8-10 % do total de PHA) sem necessidade dos precursores ácido propiônico ou ácido valérico.

Ashby, Solaiman e Foglia (2005) utilizaram duas cepas, *Pseudomonas oleovorans* B-14682 e *Pseudomonas corrugata* 388 para a produção de PHA. Partindo de concentrações máximas de 50 g/L glicerol, as cepas *P. oleovorans* e *P. corrugata* produziram 0,97 g/L de Poli 3-hidroxibutirato (P3HB) e 0,67 g/L de ácido hidroxidodecenóico, respectivamente. De igual forma, foi observada a capacidade de produção de blend de P3HB and PHA em diferentes proporções por cultura mista dos microrganismos estudados.

Ácido graxo poliinsaturado ômega-3

De conhecidas propriedades terapêuticas contra numerosas enfermidades cardiovasculares, câncer e Alzheimer, os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (AGPI ω -3) são geralmente obtidos a partir de fontes naturais como óleos vegetais ou de peixes.

Recentemente foram desenvolvidos trabalhos para a produção de AGPI ω -3 a partir da microalga heterotrófica *Schizochytrium limacinum* que possui capacidade produzir altos níveis de ácido docosahexaenóico (DHA). Pyle e Wen (2007) observaram que após 5 dias de crescimento em frascos Erlenmeyer (pH 8, 20 °C, 170 rpm), aproximadamente 18 g/L de células da microalga se formavam em meios independentes contendo glicose, glicerol puro e glicerol bruto na concentração de 90 g/L. Foram analisados alguns parâmetros cinéticos como a velocidade específica de crescimento μ , 0,685/h; rendimento em biomassa, 0,284 g/g glicerol bruto; rendimento de DHA, 171,27 mg/g glicerol bruto e rendimento volumétrico de 3,08 g/L. Também, foi estudado o efeito de diferentes concentrações de glicerol bruto contendo sabão sobre o crescimento da microalga. Concentrações superiores a 40 g/L deste glicerol, influenciaram negativamente no crescimento da microalga, sendo que na concentração de 90 g/L observou-se a morte das células após 2 dias de cultivo. Estes resultados podem ser considerados ótimos, desde que não se necessitaria de uma etapa de pré-tratamento do glicerol para a separação do sabão, etapa geralmente longa e de custo elevado. O trabalho demonstra que um leque de oportunidades pode ser aberto com pesquisas utilizando exclusivamente algas heterotróficas e glicerol como fonte de carbono.

Avanços tecnológicos no aproveitamento do glicerol no Brasil

Recentemente, no XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM 2007) foram apresentados numerosos trabalhos na busca de soluções biotecnológicas para a utilização de glicerol originado da produção de biodiesel. Por exemplo, Meinicke, Vendruscolo e Ninow (2007) compararam diferentes meios contendo concentrações variáveis de glicerol e glicose como fonte de carbono para a produção de corantes naturais pelo fungo filamentososo *Monascus ruber*. A máxima produção de pigmentos vermelhos em frascos Erlenmeyer foi de 5,2 UDO_{480nm} (1 unidade UDO (Abs) corresponde a 15 mg/L de pigmento) e produtividade de (0,0596 UDO_{480nm}/h) utili-

zando fonte de carbono mista (5 g/L de glicose e 15 g/L de glicerol). Os autores observaram que variações no valor de pH podem regular a proporção do tipo de pigmento encontrado no meio. Valores de pH inferiores a 5,5 encontram-se associados à formação de pigmentos amarelos, sendo que os valores superiores favorecem a produção de pigmentos vermelhos.

Também, o glicerol resultante da transesterificação de óleo de mamona demonstrou ser uma fonte de carbono apropriada para produção de biosurfactante ramnolípido (uma ou duas moléculas de ramnose e ácido graxo de cadeia longa) por *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁹. A concentração da fonte de nitrogênio (NaCO₃) representou ser um fator preponderante na produção do biosurfactante, comprovado pela redução da tensão superficial da água maior a 45,7 % e índice emulsificação às 24 h superior a 56,1 % para os diferentes hidrocarbonetos testados (querosene, hexadecano e isso-octano). Prieto et al 2007 obtiveram resultados similares na produção de ramnolípido, comprovando a maior influência do NaNO₃ na produção de biosurfactante pela mesma espécie de microrganismo, seguido por NH₄NO₃, uréia e NH₄SO₄.

Recentemente, em trabalhos de pesquisa visando a seleção de leveduras aptas para a assimilação e crescimento em glicerol comercial, verificamos que algumas espécies, incluindo *Kluyveromyces marxianus* e *Candida batistae*, apresentaram elevada capacidade de crescimento neste substrato. Dentre as leveduras estudadas, *Hansenula anomala* e *Candida tropicalis* mostraram capacidade de produzir etanol em concentrações de 3,5 e 6,1 g/L, respectivamente⁶¹. Estes resultados, ainda preliminares, são promissores para produção de etanol a partir de glicerol por esses microrganismos.

Por outro lado, Volpato et al (2007) isolaram de ambientes amazônicos diferentes cepas de *Bacillus* com capacidade de produzir lipases utilizando glicerol como fonte de carbono. A máxima atividade lipolítica em glicerol (24,3 U/L) foi obtida com o isolado BL74.

Destaca-se também a possibilidade da fermentação de glicerol de biodiesel por *Streptomyces clavuligerus* para a produção de ácido clavulânico, potente inibidor de betalactamases, que junto com a penicilina e cefalosporina são utilizados contra infecções bacterianas. O trabalho desenvolvido por Gutierrez e Costa Araújo (2007) comparou a suplementação contínua de meios de cultura contendo concentrações variáveis de fonte de aminoácidos e glicerol para a produção de ácido clavulânico. Após 120 h de fermentação, a máxima concentração de ácido clavulânico obtido foi de 60 mg/L.

Na busca de novas cepas fermentadoras de glicerol, Silva e Contiero (2007) isolaram a bactéria GLC29 produtora de 10,8 g/L de 1,3-propanodiol a partir de 20 g/L de glicerol. Este estudo soma-se às numerosas pesquisas desenvolvidas em outros países para a produção deste glicol com impor-

tantes aplicações industriais (GONZALEZ-PAJUELO et al., 2006; XIU et al., 2007).

Estes e outros estudos demonstraram a potencialidade da utilização do glicerol, proveniente da produção de biodiesel, como fonte de carbono para a produção de compostos químicos de interesse comercial. Embora, em etapas iniciais, novas linhas de pesquisas estão sendo definidas para obter compostos de maior valor agregado, que incluam principalmente moléculas bioativas, como proteínas e ribonucleotídeos, para a indústria alimentícia e farmacêutica.

A utilização de biorefinarias para conversão de glicerol bruto apresenta-se como uma estratégia promissora para evitar futuros problemas de acumulação deste subproduto, ao tempo de aumentar a rentabilidade da produção de biodiesel.

Aspectos econômicos

O excesso de glicerol proveniente da produção de biodiesel associado à baixa demanda mundial (0,5 bilhões ton/ano) e baixo custo, projetam um desequilíbrio econômico nas indústrias oleoquímicas e de refino de glicerol, ao tempo de pôr em risco a sustentabilidade econômica de usinas de biodiesel no mundo (HGCA, 2007). No Brasil, a maioria das plantas industriais de biodiesel não valoriza efetivamente o glicerol. A projeção do volume de glicerol no país para o ano 2013 é de 488 milhões e as perspectivas, nesse sentido, não são auspiciosas, devido a que poucas apresentam planos futuros para sua conversão em produtos de maior valor agregado.

O uso intensivo deste co-produto é essencial para a sustentabilidade econômica da indústria de biodiesel no país. A queda brusca do preço do glicerol no cenário internacional nos últimos 5 anos tem obrigado à paralisação da produção da glicerina sintética a partir de propileno. O excesso de volume de glicerol, o alto preço do propileno e as vantagens de produzir compostos derivados da indústria petroquímica de maior valor, conspiraram para o severo declínio das indústrias de glicerina sintética (HGCA, 2007). Nos Estados Unidos, o valor do glicerol diminuiu de 1048 R\$/t em 2004 para aproximadamente 125 R\$/t no ano 2006 (YAZDANI, GONZALEZ, 2007). No Brasil, atualmente o preço FOB (Free on Board) do glicerol bruto varia de 200 a 400 R\$/t, sendo o valor do glicerol loiro (parcialmente tratado para remoção de impurezas) de 600 a 800 R\$/t. Estima-se que na próxima década, sempre que se mantenha a tendência favorável para o biodiesel, o preço do glicerol co-produzido poderia diminuir ainda mais.

Considerando a situação e a projeção para os próximos anos, a utilização do glicerol como substrato para fermentação poderia torna-se vantajoso em relação ao preço de outros resíduos tradicionalmente utilizados como fonte de carbono para a obtenção de bioprodutos. Por exemplo, o preço do melão de cana de açúcar no mercado internacional varia entre os 120 e 170

R\$/t, outro exemplo corresponde ao valor do bagaço de cana que oscila entre 9,5 e 24 R\$/t. Neste último caso, o bagaço deve ser submetido a tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos para disponibilizar a glicose, o que elevaria o preço final do substrato. A produção industrial de biomoléculas por fermentação de glicerol economizaria custos de processos tradicionais que requerem etapas de elevado consumo energético para extração e acondicionamento do substrato (sacarose de cana de açúcar ou glicose de amido de milho).

O grande desafio no Brasil será incentivar as pesquisas biotecnológicas que, timidamente, vem sendo desenvolvidas no país. Além disso, facilitar a imediata transferência tecnológica dessas descobertas na própria usina de biodiesel, permitindo reduzir custos de transporte para converter o biodiesel em um biocombustível de alta rentabilidade econômica.

CONCLUSÃO

Desde que alguns governos estipularam normativas que obriga a adição de biodiesel ao combustível de petróleo, grande quantidade de glicerol vem sendo gerada, tornando-se necessária a busca de alternativas para sua utilização. Numerosas pesquisas estão sendo desenvolvidas nesse sentido, no entanto, os esforços ainda constituem uma solução em longo prazo para a acumulação de glicerol. A biotecnologia apresenta alternativas para a obtenção de produtos de alto valor agregado como bio-pesticidas, pigmentos, aromas, polímeros, antibióticos e proteínas recombinantes. No entanto, é preciso estudar com maior detalhe aspectos de engenharia bioquímica como agitação, aeração, cinética de crescimento e obtenção de produtos, e transferência de massa e energia. Estes parâmetros são considerados essenciais para entender os mecanismos de utilização de microrganismos assim como para a otimização de processos, objetivando a futura ampliação de escala. Estratégias mais detalhadas para a utilização biotecnológica do glicerol são esperadas em poucos anos, de forma a reduzir os impactos ambientais e tornar o biodiesel um produto altamente competitivo no mercado mundial de biocombustíveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES e o CNPq para o desenvolvimento de projetos de pesquisas.

REFERÊNCIA

- AHN, W.S.; PARK, S.J.; LEE, S.Y.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 3624
- ANSELL, R.; GRANATH, K.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; ADLER, L.; *EMBO J.* **1997**,16, 2179

- ANP – AGENCIA NACIONAL DE PETROLEO - http://www.anp.gov.br/doc/audiencia_publica/Minuta_Audiencia_Publica_03_2006.pdf, acessada em Julho 2007.
- ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2106
- BARBIRATO, F.; ASTRUC, S.; SOUCAILLE, P.; CAMARASA, C.; SALMON, J.M.; BORRIES, A.; *Microbiology* **1997**, 143, 2423
- BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ, K.; *Renew. Sust. Energ.Rev.* DOI:10.1016/j.rser.2006.07.016
- BORMANN, E.J.; ROTH, M.; *Biotechnol Lett.* **1999**, 21,1059
- BIODIESELBR- 2007. <http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/glicerina-biodiesel-inunda-mercado-pais-derruba-precos-02-05-07.htm>, acessada em Julho 2007
- CHENG, K-K.; ZHANG, J-A.; LIU, D-H.; SUN, Y.; LIU, H-J.; YANG, M-D.; XU, J-M.; *Process. Biochem.* **2007**, 42, 740
- DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G.; *Appl. Environ. Microb.* **1992**, 58, 1233
- DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J.; *Appl Catal A-Gen.* **2005**, 281, 225.
- DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZÁLEZ, R.; *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, 94, 821
- DIECKELMANN, G.; HEINZ, H.J. Em *The Basics of Industrial Oleochemistry*. Publisher P. Pomp, **1988**, 123
- DILLIS, S.S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, M.R.; SAIER, M.H.; *Microbiol. Rev.* **1980**, 44, 385.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, I.; *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, 92, 405
- GANCEDO, C.; GANCEDO, J.M.; SOLS, A.; *Eur. J. Biochem.* **1968**, 6,165
- GANCEDO, C.; SERRANO, R. Em *The yeast III - Energy-yielding metabolism.*; Rose, A.H.; Harrison, J.S., eds; Academic Press, New York, **1989**, 205-259
- GRAUSLUND, M.; LOPES, J.M.; RONNOW, B.; *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4391
- GRAUSLUND, M.; RONNOW, B.; *Can. J. Microbiol.* **2000**, 46, 1096
- GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; SOUCAILLE, P.; VASCONCELOS, I.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 96
- GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J.C.; VASCONCELOS, I.; *J. Ind. Microbiol. Biot.* **2005**, 32, 391
- GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; ANDRADE, J.C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P.; *Metab. Eng.* **2005**, 7, 329
- GUTIERREZ, L.C.; ARAÚJO, M.L.; *Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Curitiba, Brasil, 2007
- HAUGE, J.G.; KING, T.E.; CHELDELIN, V.H.; *J. Biol. Chem.* **1955**, 214, 11
- HGCA - HOME-GROWN CEREALS AUTHORITY - 2007 http://hgca.com/document.aspx?load&media_id=365&publicationId=2363, acessada em julho 2007
- HOLST, B.; LUNDE, C.; LAGES, F.; OLIVEIRA, R.; LUCAS, C.; KIELLAND-BRANDT, M.; *Mol. Microbiol.* **2000**, 37,108
- ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M.; *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 100, 260
- JARVIS, G.N.; MOORE, E.R.B.; THIELE, J.H.; *J. Appl. Microbiol.* **1997**, 83, 166
- KIM, J-W.; PARK, T.J.; RYU, D.D.Y.; KIM, J-Y. *Biotechnol. Progr.* **2001**, 16, 657-660
- KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.;
- MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, P.; VARILA, P.; *Biomacromolecules* **2005**, 6, 561
- LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C.; *Microbiology* **1999**, 45, 2577
- LAGES, F.; LUCAS, C.; *Biochem. Biophys. Acta* **1997**, 1322, 8
- LUYTEN, K.; ALBERTYN, J.; SKIBBE, W.F.; PRIOR, B.A.; RAMOS, J.; THEVELEIN, J.M.; HOHMANN, S.; *EMBO J.* **1995**, 14,1360
- MEINICKE, R.M.; VENDRUSCOLO, F.; NINOW, J.L. *Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Curitiba, Brasil, 2007
- MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P.; Em *Microbial physiology*, Moat, A.G.; Foster, J.W.; Spector, M.P., eds; Wiley-Liss, New York, **2002**, 363
- MME – MINISTERIO DE MINAS E ENERGIA http://www.mme.gov.br/site/menu/select_main_menu_item.do?channelId=9771, acessada em Julho 2007.
- NEVES, L.; LAGES, F.; LUCAS, C. *FEBS Letters*, **2004**, 565, 160–162
- OISTI – OFFICE OF SCIENTIFIC & TECHNICAL INFORMATION - 2007 <http://www.osti.gov/bridge/servlets/purl/837189-Yhbgdr/native/837189.pdf>, acessada em Junho 2007
- OLIVEIRA, L.B.; MUYLAERT, M.S.; ROSA, L. P.; BARATA, M.; ROVERE, E. *Renew. Sust. Energ.Rev.* DOI:10.1016/j.rser.2006.10.013
- OOI, T.L.; YONG, K.C.; HAZIMAH, A.H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z.; *J. Oleo Sci.* **2004**, 53,
- PEREIRA, P.; VARILA, P.; *Biomacromolecules* **2005**, 6, 561
- PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, J.; AGGELIS, G.; MARC, I.; *J. Appl. Microb.* **2002**, 92, 737
- PARK, C.S.; CHANG, C.C.; KIM, J-Y.; OGRYDZIAK, D.M.; RYU, D.D.Y.; *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 6876
- PRIETO, L.M.; MICHELON, M.; SCHNEIDER, C.; SANTOS, E.; BURKERT, J.; KALIL, S.; BURKET, C.A.; *Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Curitiba, Brasil, 2007
- PYLE, D.; WEN, Z. Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid from Biodiesel—Waste Glycerol by Microalgal Fermentation. 2007 ASABE Annual International Meeting . <http://asae.frymulti.com/abstract.asp?aid=22865&t=1>
- RIVALDI, J.D.; FONSECA, R.; SARROUH, B.F.; JORGE, N.; SILVA, S.S.; *Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Curitiba, Brasil, 2007
- LEE, P.C.; LEE, W.G.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N.; *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 72, 41
- RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A.; ZAROWSKA, B.; JUSZCZYK, P.; *Chem. Papers* **2006**, 60, 391.
- SILVA, G.P.; CONTIERO, J.; *Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Curitiba, Brasil, 2007
- SOUSA, J.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.; *Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Curitiba, Brasil, 2007
- SPRAGUE, G.F.; CRONAN, J.E.; *J. Bacteriol.* **1977**, 129, 1335
- SULLIVAN, C.J. Em: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, vol. 22. VCH, Weinheim, Germany., 2003 163–171
- THOMPSON, J.C.; HE, B.; *Appl. Eng. Agric.* **2006**, 22, 261.
- VOLPATO, G.; CARON, D.; MACHADO, D.; RODRIGUES, R.; HECK, J.X.; AYUB, M.A.; *Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Curitiba, Brasil, 2007
- WALKER, G.M. Em *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, London – England, **1998**, 233
- WANG, Z-X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A.; *Biotechnol. Adv.* **2001**, 19, 201
- YANG, X.J.; KOW, L.M.; FUNABASHI, T.; MOBBS, C.V.; *Diabetes* **1999**, 48, 1763
- XIU, Z-L.; CHEN, X.; SUN, Y-Q.; ZHANG, D-J.; *Biotech. Eng. J.* **2007**, 33, 42
- YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R.; *Curr. Opin. Biotech.* **2007**, 18, 213
- YONG, K.C.; OOI, T.L.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z.; HAZIMAH, A.H.; *J. Oil Palm Res.* 2001,13,39
- ZHAO, Y-N.; CHEN, G.; YAO, S-J. *Biochem. Eng. J.* **2006**, 32, 93.

