



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JOUCIANE DE SOUSA SILVA

PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL  
UTILIZANDO GLICEROL BRUTO COMO SUBSTRATO

FORTALEZA  
2010

JOUCIANE DE SOUSA SILVA

PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO  
GLICEROL BRUTO COMO SUBSTRATO

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira  
Co-orientador: Prof. Dr. Giovanilton Ferreira da Silva

FORTALEZA  
2010

JOUCIANE DE SOUSA SILVA

PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO  
GLICEROL BRUTO COMO SUBSTRATO

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profª. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Giovanilton Ferreira da Silva (Co-orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Dra. Célia Maria Araújo Galvão  
Centro de Tecnologia Canavieira

---

Dra. Maria Estela Aparecida Giro  
Faculdade Ateneu

Dedico a meus pais, Enedina e Arimateia, que sempre me estimularam a dar este grande passo, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar, iluminar e ajudar a superar todos os obstáculos.

Aos meus pais, por serem meu apoio, pelos ensinamentos, sólida formação e construção dos meus princípios e valores, e amor durante todos esses anos.

Ao Antonio Mateus, pela dedicação, incentivo, companheirismo e, principalmente, pelo apoio em todos os momentos.

À Professora Andrea Lopes de Oliveira Ferreira, por sua orientação, apoio, incentivo e compreensão, que não se limitaram ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Giovanilton Ferreira da Silva pelo apoio, co-orientação e incentivo dada ao longo desse trabalho.

À Jocélia pelo apoio, dedicação, incentivo, pelas noites de trabalho no laboratório que se tornavam sempre divertidas, principalmente pela amizade que iniciou durante esse período.

Aos professores Fabiano André Narciso Fernandes e Edy Sousa de Brito pelas correções e sugestões.

À banca examinadora pelas correções e sugestões.

Ao Prof. Lindbergue Araujo Crisostomo pelas análises realizadas em seu laboratório, Laboratório de Solos e Água da Embrapa Agroindústria Tropical.

À Darlane pelos conselhos, apoio, puxões de orelha e amizade desde o primeiro contato nas disciplinas, enfim, por sua amizade.

À Tigressa pelas horas de estudo na sala da pós-graduação, por sempre estar disposta a ajudar sem impor hora ou condição.

Aos bolsistas de iniciação científica Regiane e Oleon pela dedicação, competência e disponibilidade para a pesquisa.

Aos amigos Camila, Cris, Katiany, Juliana, Mírian, Cleiton, Diôgo, Kamilly, Jéssyca, Marylane, Marcia e Valderez que contribuíram com sua amizade, carinho e confiança.

Aos integrantes do GPBio – Grupo de Pesquisa em Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, pelos conhecimentos compartilhados, momentos de descontração e companhia.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Engenharia Química da UFC, em especial à Maria, secretária da pós-graduação, pelo auxílio e incentivo.

À todos os amigos que encontrei neste programa, agradeço pelos momentos de aprendizado e convivência que certamente deixaram saudades.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro à pesquisa.

À todos que, direta e indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

“Com o tempo, os conceitos mudam...  
os sonhos mudam...  
os planos mudam...  
a vida muda...  
Mas não se mudam princípios e valores...  
Mudei e continuo igual...  
Assim é o ser humano: tão coerente em suas contradições”

Jacky Correia

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a utilização de glicerol oriundo da indústria do biodiesel (glicerol bruto) como substrato em ensaios fermentativos para a produção de etanol. Os ensaios foram realizados em mesa agitadora com velocidade de 200 rpm, nas temperaturas de 30 e 37 °C, respectivamente para os microrganismos *Saccharomyces sp.* 1238 e *Escherichia coli* 224 ATCC 25922. Nos experimentos realizados com a levedura *Saccharomyces sp.*, variaram-se as concentrações de glicerol adicionado ao meio fermentativo em 0,5; 1,0 e 5,0 % v/v e fixou-se o volume de inóculo em 1 % m/v. Observou-se que o microrganismo *Saccharomyces sp.* não utilizou glicerol como fonte de carbono para produção de etanol, porém em ensaios teste com glicose P.A., observou-se que este substrato foi rapidamente consumido pelo microrganismo apresentando uma produção de etanol de 5,5 g/L. Nas fermentações com a bactéria *Escherichia coli*, variou-se a concentração de glicerol adicionado ao meio fermentativo em: 1, 10, 15 e 20 g/L. Pela avaliação da influência da concentração de substrato no meio através dos resultados obtidos, pode-se concluir que a melhor condição para a produção de etanol com esse microrganismo foi a concentração inicial de 10 g/L de glicerol. O consumo de glicerol pela bactéria *Escherichia coli* foi afetado pela variação deste substrato. Observou-se que o etanol foi produzido a partir de 8 h de cultivo nas fermentações tanto com glicerol bruto quanto P.A. nas concentrações de 10, 15 e 20 g/L adicionado ao meio de cultivo. Observou-se também a formação de ácido acético nas primeiras horas da fermentação. A produção de ácido acético foi baixa, atingindo a concentração de 0,15 g/L na fermentação utilizando 10 g/L de glicerol bruto. Analisando os dois microrganismos estudados, verificou-se que apenas a bactéria *Escherichia coli* 224 ATCC 25922 mostrou-se adequada ao objetivo desta pesquisa, já que com a levedura não foi produzido etanol em quantidade significativa.

Palavras-chave: fermentação batelada, resíduo industrial, *Saccharomyces sp.* 1238, *Escherichia coli* ATCC 25922

## ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the use of glycerol from biodiesel industry (raw glycerol) as a substrate in fermentation assays for production of ethanol. The assays were performed in shaker with agitation of 200 rpm, at temperatures of 30 and 37 °C, respectively for the microorganisms *Saccharomyces sp.* 1238 and 224 *Escherichia coli* ATCC 25922. In experiments with yeast *Saccharomyces sp.*, it was varied concentrations of glycerol from fermentation medium at 0.5, 1.0 and 5.0 % v/v and the inoculum was set to 1% w/v. It was observed that the microorganism *Saccharomyces sp.* could not use glycerol as carbon source for ethanol production, but in assays using glucose, this substrate was rapidly consumed by the microorganism achieving an ethanol production of 5.5 g/L. It was varied the concentration of glycerol added to the fermentation medium: 1, 10, 15 and 20 g / L when *Escherichia coli* was used. By analyzing the influence of substrate concentration in fermentations, it can be concluded that the best condition for ethanol production, with this microorganism, was initial concentration of glycerol of 10 g/L. The consumption of glycerol by *Escherichia coli* was affected by the change of substrate concentration. It was observed that ethanol was produced after 8 h of fermentation with both raw and PA glycerol at 10, 15 and 20 g/L. It also observed the formation of acetic acid in the first hours of fermentation. The production of acetic acid was low, reaching a concentration of 0.15 g/L in fermentation using 10 g/L of raw glycerol. Analyzing the two microorganisms studied, it was found that only 224 bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922 was adequate to the aim of this research, since the yeast was not produced ethanol in significant amounts.

Keywords: batch fermentation, industrial waste, *Saccharomyces sp.* 1238, *Escherichia coli* ATCC 25922

## LISTA DE FIGURAS

2.1. Diagrama das áreas de abrangência da Biotecnologia.....	16
2.2. Fermentação em batelada.....	17
2.3. Perfil dos resultados esperados numa fermentação batelada .....	18
2.4. Fermentação anaeróbica da glicose pela levedura <i>S. cerevisiae</i> .....	19
2.5. Esquema geral da reação de transesterificação .....	21
2.6. Projeção de Fischer da molécula de glicerol.....	25
2.7. Possíveis produtos finais da fermentação do glicerol por diferentes microrganismos	27
3.1. Representação esquemática do processo fermentativo utilizando <i>Saccharomyces sp.</i> 1238 .....	35
3.2. Representação esquemática do processo fermentativo utilizando a bactéria <i>E. coli</i> ....	37
3.3. Representação esquemática da preparação das amostras para injeção em HPLC .....	38
4.1. Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo utilizando glicerol: 5% v/v : (●) glicerol, (■) biomassa .....	43
4.2. Concentração de etanol em função do tempo na fermentação utilizando 5% v/v de glicerol.....	44
4.3. Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo utilizando glicerol 1% v/v : (●) glicerol, (■) biomassa .....	45
4.4. Concentração de etanol na fermentação utilizando 1 % v/v de glicerol.....	45
4.5. Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo na fermentação utilizando glicerol 0,5%v/v. ....	46
4.6. Concentração de etanol em função do tempo na fermentação utilizando 0,5% v/v de glicerol.....	47
4.7. Concentração de glicerol (●) e etanol (◆) em função do tempo na fermentação utilizando glicerol P.A 1% v/v.....	48
4.8. Concentração de glicose e etanol em função do tempo: (▶) glicose, (●) etanol.....	49
4.09. Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo na fermentação utilizando 20 g/L de glicerol: (●) glicerol, (■) biomassa.....	50
4.10. Concentração de etanol e ácido acético em função do tempo na fermentação utilizando 20 g/L de glicerol: (◆) etanol, (▲) ácido acético.....	50
4.11. Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo na fermentação utilizando 15 g/L de glicerol: (●) glicerol, (■) biomassa.....	51
4.12. Concentração de etanol e ácido acético em função do tempo na fermentação utilizando 15 g/L de glicerol: (◆) etanol, (▲) ácido acético.....	52
4.13. Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo na fermentação utilizando 10 g/L de glicerol: (●) glicerol, (■) biomassa.....	53
4.14. Concentração de etanol e ácido acético em função do tempo na fermentação utilizando 10 g/L de glicerol: (◆) etanol, (▲) ácido acético.....	53
4.15. Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo na fermentação utilizando 5 g/L de glicerol: (●) glicerol, (■) biomassa .....	54

4.16. Concentração de etanol e ácido acético em função do tempo utilizando 5 g/L de glicerol: (◆) etanol, (▲) ácido acético.....	55
4.17. Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo utilizando 10 g/L de glicerol P.A: (●) glicerol, (■) biomassa .....	56
4.18. Concentração de etanol e ácido acético em função do tempo utilizando 10 g/L de glicerol P.A: (◆) etanol, (▲) ácido acético.....	56
A.1. Curva de calibração de fósforo.....	64
A.2. Curva de calibração de enxofre .....	65
B.1. Curva padrão de glicerol .....	66
B.2. Curva padrão de ácido acético.....	67
B.3. Curva padrão de etanol.....	68
B.4. Curva padrão de glicose .....	69

## LISTA DE TABELAS

3.1. Condições experimentais para cada elemento analisado por espectrometria de absorção atômica.....	32
3.2. Composição do meio para inóculo da levedura <i>Saccharomyces sp.</i> 1238.....	34
3.3. Composição do meio para cultivo da levedura <i>Saccharomyces sp.</i> 1238 .....	34
3.4. Composição do meio Ec Broth para inóculo.....	36
3.5. Composição do meio de cultivo para <i>E. coli</i> .....	36
4.1. Caracterização de macro e micro elementos da amostra de glicerol.....	42

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1. Biotecnologia .....	16
2.1.1. Fermentação .....	17
2.2. Biocombustíveis .....	20
2.3. Biodiesel.....	20
2.4. Etanol .....	22
2.5. Glicerol .....	24
3. METODOLOGIA .....	29
3.1. Caracterização do glicerol.....	29
3.1.1. Extração ácida a quente.....	29
3.1.2. Determinação de K e Na.....	30
3.1.3. Determinação de P e S.....	30
3.1.4. Determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn.....	31
3.2. Seleção do microrganismo .....	32
3.3. Fermentação .....	33
3.2.1. <i>Saccharomyces sp.</i> 1238.....	33
3.2.2. <i>Escherichia coli</i> 224 ATCC 25922.....	35
3.4. Crescimento celular .....	37
3.5. Determinação da concentração dos produtos da fermentação .....	38
3.5.1. Determinação do glicerol.....	39
3.5.2. Determinação do ácido acético .....	39
3.5.3. Determinação do etanol.....	40
3.5.4. Determinação da glicose.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	42
4.1. Caracterização do glicerol.....	42
4.2. Fermentação utilizando <i>Saccharomyces sp.</i> 1238.....	43
4.3. Fermentação utilizando <i>Escherichia coli</i> 224 ATCC 25922 .....	49
5. CONCLUSÕES .....	58

REFERÊNCIAS .....	59
ANEXOS.....	64
A. Curvas padrões utilizadas nas análises do glicerol.....	64
B. Curvas padrões utilizadas para as análises dos produtos das fermentações.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

O petróleo é a principal fonte de energia utilizada no mundo. Apesar de sua disponibilidade ser abundante, é um recurso natural não renovável e sua produção demora milhares de anos. O interesse no uso de combustíveis no mundo vem crescendo fortemente nos últimos anos. Este crescimento afetará a estabilidade de ecossistemas, o clima global bem como as reservas de petróleo. A crescente diferença entre a energia necessária no mundo industrializado e a inabilidade de repor tais necessidades dessa fonte limitada de combustível poderá gerar uma crise energética. Assim, é necessário pensar na reposição desse combustível. O estudo de combustíveis líquidos a partir de várias fontes tem encorajado o uso de uma agricultura baseada no etanol e biodiesel. Portanto, os combustíveis biológicos, tais como o etanol e o biodiesel, estão entre as fontes mais promissoras para a substituição de combustíveis fósseis.

Atualmente, o país tem a oportunidade de se firmar como um dos maiores produtores de biodiesel, cuja produção no Brasil já alcançou um grau de maturidade e excelência tecnológica. O biodiesel é um combustível biodegradável, de queima limpa, derivado de fontes naturais e renováveis, como as gorduras animais e as vegetais: girassol, canola, mamona, soja, algodão e outras oleaginosas. Sua produção gera aproximadamente 10% (m/m) de glicerol como principal subproduto (Yazdani e Gonzalez, 2007).

A atenção com respeito aos subprodutos da cadeia produtiva do biodiesel já constitui preocupação do Governo Federal que através do MCT - Ministério da Ciência e Tecnologia estabeleceu um programa especial à pesquisa e desenvolvimento de tecnologias objetivando obter desenvolvimento de novos produtos a partir da glicerina e de ácidos graxos. As ações referentes à linha de apoio recebem a denominação de “projeto co-produtos” e vêm sendo discutida na Rede Nacional de Biodiesel, tendo sido realizadas várias reuniões e articulações com vários pesquisadores convidados. Neste contexto, a conversão do glicerol em produtos de alto valor agregado se apresenta como uma alternativa viável para a sua valorização.

Glicerol é um resíduo largamente produzido na indústria de biocombustível. O crescimento da indústria do biodiesel gerou um enorme suprimento de glicerol que resultou numa queda drástica de 10 vezes o preço da molécula. Sendo este um subproduto indesejável,

formado durante a reação de transesterificação, tem se tornado um grande problema para as indústrias produtoras de biodiesel, dado ao grande volume produzido (Jhonson et al., 2007).

Uma questão que tem que ser resolvida para que o biodiesel não caia em descrédito e mantenha seu caráter competitivo tanto ambientalmente quanto tecnologicamente é o que fazer com o glicerol gerado. A solução é o glicerol ser economicamente viável e, com um desenvolvimento tecnológico, possa ser integrado a usina de biodiesel. Assim, o glicerol passa a ser não um subproduto, mas uma fonte de novos produtos.

Várias estratégias baseadas nas transformações químicas e biológicas estão sendo propostas para converter o glicerol residual em produtos de maior valor. A conversão biológica tem gerado bastante interesse nos últimos anos na produção de bioprodutos, entre eles, o 1,3-propanodiol, etanol, 2,3-butanodiol, ácido acético e ácido láctico. Uma possível solução para o glicerol seria, dentre as várias possíveis, a utilização como fonte de carbono para produzir etanol, com isso uma usina de biodiesel tornar-se-ia biorrefinaria (Yazdani e Gonzalez, 2008).

Acredita-se que o século XXI seja o último a assistir a queima indiscriminada de combustíveis fósseis, de forma que este será reconhecido como o “Século das Tecnologias Limpas”. Entretanto, para que este projeto de biotecnologia seja tecnologicamente consistente e economicamente viável há necessidade de desenvolver pesquisa nesta área. Daí a relevância desta dissertação aplicar o glicerol como fonte alternativa para produção de etanol.

O uso do glicerol como matéria-prima para o crescimento microbiano por via fermentativa vem sendo pesquisado em vários processos fisiológicos tanto em microrganismos procarióticos quanto eucarióticos para diferentes tipos de bioprodutos.

Neste contexto, esta dissertação teve por objetivo estudar a utilização de glicerol bruto como substrato de processos fermentativos para produção de etanol, insumo utilizado em larga escala na indústria energética.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biotecnologia

A biotecnologia integra a aplicação de princípios científicos e de engenharia para o processamento de materiais por agentes biológicos, utilizando-se de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e social (Gavrilescu e Chisti, 2005). Ela abrange diferentes áreas do conhecimento, como pode ser observado na Figura 2.1. Nela incluem-se a ciência básica (Biologia Molecular, Microbiologia, Biologia Celular, Genética, entre outras), a ciência aplicada (Técnicas Imunológicas, Químicas e Bioquímicas) e outras tecnologias (Informática, Robótica e Controle de Processos).

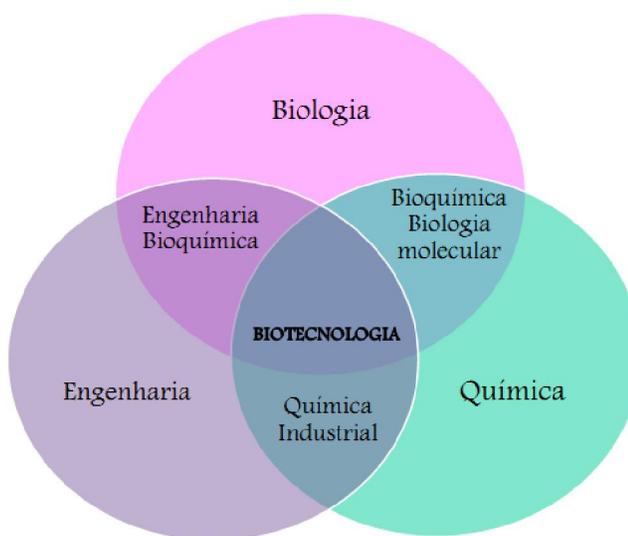


Figura 2.1 – Diagrama das áreas de abrangência da Biotecnologia

A biotecnologia pode fornecer tanto benefícios econômicos quanto ambientais. Tais benefícios abrangem a redução da dependência de combustíveis não renováveis, redução do potencial de poluição de processos industriais, capacidade de degradar os poluentes acumulados, maior rendimento econômico em processos produtivos e geração sustentável de produtos (Gavrilescu e Chisti, 2005).

Há uma grande variedade de microrganismos que são usados em processos industriais, como, por exemplo, na produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, alcoóis,

pigmentos, lipídios e glicolipídios (Adrio e Demain, 2003). Alguns produtos são fabricados em escala comercial enquanto outros são utilizados em processos biotecnológicos, como matéria-prima ou para melhoramento de processos.

Na biotecnologia, um processo muito estudado é a fermentação. Este é um processo químico mediado por microrganismos vivos, cujo produto pode ser um excreta, a própria célula, ou mesmo, um componente celular. Esse método pode gerar produtos em quantidades substanciais (Liese *et al.*, 2000).

### 2.1.1. Fermentação

A fermentação é um processo que se caracteriza pela inoculação e incubação de microrganismos em condições adequadas. Na fermentação batelada ou descontínua, apresentada na Figura 2.2, nada é adicionado, o processo pode ser anaeróbico e não é necessariamente requerido o controle de pH.

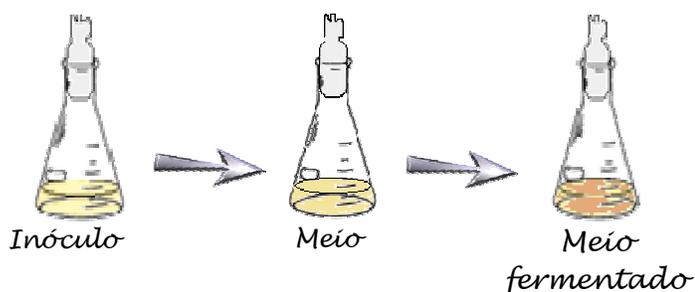


Figura 2.2 – Fermentação em batelada.

Neste tipo de fermentação, obtém-se resultados semelhantes aos perfis de consumo de substrato, produção de biomassa e produto apresentados na Figura 2.3. Pela análise dessa figura, pode-se verificar que a fermentação pode ser chamada de primeira ordem, visto que, à medida que o substrato é consumido os produtos são formados. A fermentação em batelada é uma das mais usadas para produzir álcool, sendo considerada mais eficiente devido ao seu fácil controle físico-químico, infeccioso e asséptico.

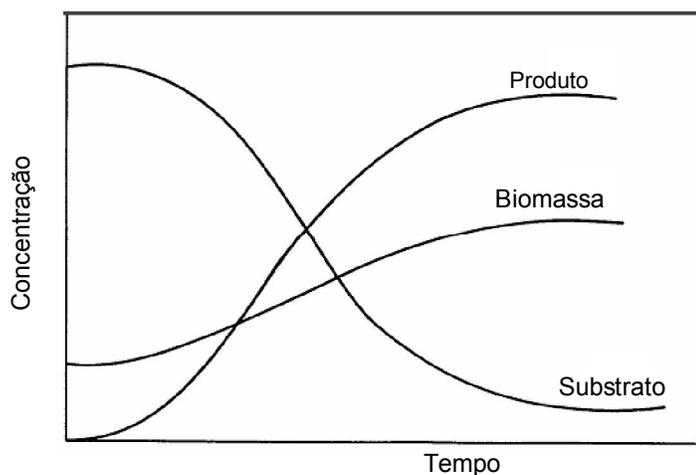


Figura 2.3 – Perfil dos resultados esperados numa fermentação batelada.

A fermentação alcoólica gera energia na forma de ATP ou outros compostos de transferência de energia para a biossíntese do material celular e produção do etanol. Estas reações acontecem com diminuição na energia livre, a qual junto a subsequente hidrólise do ATP durante as reações de biossíntese, transporte e manutenção, resulta na produção de calor. A equação simplificada da fermentação anaeróbica da glicose pela *S. cerevisiae*, pode ser descrito da seguinte forma:



O detalhamento desta reação está apresentado na Figura 2.4.



## 2.2. Biocombustíveis

Os combustíveis fósseis, são os grandes vilões ambientais e representam três quartos da produção energética mundial. Eles são responsáveis pela poluição local, pela maior parte da emissão de gases estufa, mudança climática e aquecimento global (Yu *et al.*, 2003, Demirbas *et al.*, 2004). O grande volume utilizado deste tipo de combustível acrescido das projeções de aumento do consumo global tende a limitar a sua oferta. Esse fato impulsionou várias instituições internacionais e nacionais a buscar alternativas energéticas aos combustíveis fósseis, sendo os biocombustíveis os mais promissores a essa substituição (Oliveira *et al.*, 2005).

O biocombustível é uma realidade no mercado internacional de energia. O Brasil, como um dos maiores produtores de biodiesel e etanol para fins energéticos, objetiva manter-se na ponta das pesquisas e principalmente no desenvolvimento de inovações para o setor de biocombustíveis (Duarte, 2009). Também, como o biocombustível pode reduzir em até 80% a emissão de carbono que a gasolina, o etanol vem demonstrando ser melhor alternativa ao petróleo (Govindaswamy *et al.*, 2007).

Visando o meio ambiente temos que considerar que a utilização do biodiesel no transporte rodoviário pesado oferece grandes vantagens, principalmente em grandes centros urbanos, já que a emissão de poluentes é menor que a do óleo diesel (Chang *et al.*, 1996).

No Brasil é crescente a busca de conhecimentos na área energética. Atualmente, o Ministério da Ciência e Tecnologia em conjunto com instituições públicas e particulares está voltado a pesquisas de processos químicos associados ao álcool e aos gases de síntese para desenvolvimento de alcoolquímicas e biorrefinarias.

## 2.3. Biodiesel

A obtenção de biodiesel é realizada a partir da reação de transesterificação de óleo vegetal ou animal com álcool, na presença de catalisador, tanto em meio ácido quanto em meio básico. A reação de síntese do biodiesel pode ser realizada em diferentes razões molares óleo:álcool, mas sempre com excesso de álcool de modo a deslocar o equilíbrio em direção a reação de produção de biodiesel e não saponificação, a presença de hidróxido de sódio ou de

potássio catalisa a reação de transesterificação ou age como um reagente na reação de saponificação. As reações em meio básico apresentam melhor rendimento e menor tempo de reação do que em meio ácido (Freedman *et al.*, 1986).

A Figura 2.5 mostra uma esquematização geral da reação de transesterificação para produção de biodiesel a partir de triglicerídeos e álcool, na presença de um catalisador. Transesterificação é um termo geral usado para descrever uma importante classe de reação orgânica, na qual um éster é transformado em outro através da troca do radical alcóxido. Quando o éster original reage com um álcool, o processo de transesterificação é chamado de alcóólise (Silva *et al.*, 2011).

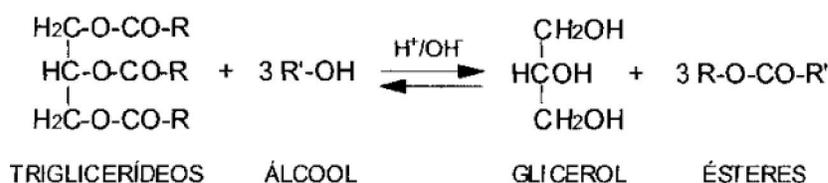


Figura 2.5 – Esquema geral da reação de transesterificação (Silva *et al.*, 2011).

Existe uma grande variedade de óleos vegetais a serem utilizados para esta reação. No Brasil, os óleos vegetais mais comuns e que são matérias primas abundantes são o óleo de soja, amendoim, algodão, milho, babaçu e palma. Destacando-se a soja, que dispõe de uma oferta muito grande do óleo, quase 90% da produção nacional de óleo provem dessa leguminosa. (Ferrari *et al.*, 2005).

O biodiesel possui características vantajosas sobre os combustíveis derivados do petróleo, tais como, ser livre de enxofre e aromáticos, ter alto índice de cetano, possuir teor médio de oxigênio em torno de 11%, viscosidade e ponto de fulgor maiores que o diesel convencional (Neto *et al.*, 2000). Além de emitir oito vezes menos os gases monóxido e dióxido de carbono, enxofre e material particulado (Chang *et al.*, 1996).

Se o processo de recuperação e aproveitamento dos subprodutos (glicerina e catalisador) for otimizado, a produção de biodiesel pode ser obtida a um custo competitivo com o preço comercial do óleo diesel. No entanto, o biodiesel não é um combustível perfeito, possui características a serem ajustadas como a emissão de óxidos de nitrogênio que aumentam se comparado ao diesel mineral. Isto pode ser resolvido pelas indústrias ajustando a regulação dos motores e pelo uso de aditivos e outros compostos químicos que reduzem a

temperatura de combustão ou mesmo implantar sistemas de pós-tratamento da exaustão como coletores e redutores catalíticos seletivos (Rocha e Freitas, 2009; Duarte, 2009).

Importantes inovações na produção do biodiesel podem ser observadas nos últimos anos. Algumas que não foram testadas na prática, como a transesterificação supercrítica e em condições enzimáticas, desenvolvimento de catalisadores heterogêneos, entre outras. Sendo os maiores avanços na área de controle de qualidade com melhoria do processo de fabricação nos primeiros estágios e desenvolvimentos de novos métodos analíticos que visam garantir um bom desempenho deste no mercado mundial (Duarte, 2009).

No entanto, ainda existe a necessidade de aperfeiçoar o processo em relação à busca por matérias primas alternativas não utilizadas para alimentação, pois como a tendência mundial é aumentar cada vez mais a produção de bicombustíveis, há uma crescente necessidade de matéria prima. Algumas das alternativas que estão sendo testadas são: óleo de frituras reciclado, resíduos de gordura animal, filtrado de caixas de gordura e óleos microbianos e sementes não alimentícias, como o pinhão manso, mamona entre outras (Ma e Hanna, 1999). Os processos tecnológicos também precisam ser otimizados, como os novos catalisadores recicláveis, tais como enzimas e catalisadores inorgânicos heterogêneos. Também a transesterificação em condições supercríticas sem uso de catalisadores, novos métodos de purificação do biodiesel, dentre eles lavagem a seco e com tecnologia de membranas ou uso de adsorventes, assim como, a destilação do produto final (Duarte, 2009).

Estudos feitos pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) mostram que há cerca de 20 compostos de hidrocarbonetos tóxicos e cancerígenos presentes no diesel e sete deles são metais que estão ausentes no biodiesel (Rocha e Freitas, 2009). A presença de vários compostos perigosos diminui quando se adiciona mais biodiesel a mistura diesel/biodiesel. Há também estudos e discussões em congressos e simpósios internacionais quanto a utilização da rota de produção metílica e etílica. A necessidade de aperfeiçoar o balanço dos gases de efeito estufa norteia a busca de uma solução apropriada, esta seria utilizar etanol ao invés de metanol (Rocha e Freitas, 2009).

#### **2.4. Etanol**

Etanol é o mais comum dos álcoois e caracteriza-se por ser um composto orgânico, obtido através da fermentação de substâncias amiláceas ou açucaradas, como a

sacarose existente no caldo-de-cana, e também mediante processos sintéticos. É um líquido incolor, volátil, inflamável, solúvel em água, com cheiro e sabor característicos. Álcoois têm sido utilizados como combustível há muitos anos. Misturas de etanol combustível são utilizadas com sucesso em todos os tipos de veículos e motores que necessitem de gasolina (Balat, 2005).

O etanol pode ser produzido a partir de diversas fontes de biomassa e diferentes tecnologias de conversão. Os vegetais mais utilizados para a produção de etanol são a cana-de-açúcar (Brasil), a beterraba (Europa) e o milho (Estados Unidos), contudo, não há dúvida de que quando o tema é combustível, a forma mais economicamente efetiva de produção é utilizando cana-de-açúcar. Isto o torna um combustível alternativo importante por ser oriundo de recursos renováveis, contribuindo para a redução dos impactos ambientais negativos gerados pela utilização dos combustíveis fósseis (Hansen *et al.*, 2005; Cardona e Sánchez, 2007).

Do ponto de vista tecnológico o Brasil é o país mais avançado na produção e no uso do etanol como combustível, seguido pelos EUA e, em menor escala, pela Argentina, Quênia, Malawi e outros. A produção mundial de álcool aproxima-se dos 40 bilhões de litros, dos quais pressupõe-se que até 25 bilhões de litros sejam utilizados para fins energéticos. O Brasil responde por 15 bilhões de litros deste total. O álcool é utilizado em mistura com gasolina no Brasil, EUA, UE, México, Índia, Argentina, Colômbia e, mais recentemente, no Japão (A experiência do Brasil com o álcool combustível, Disponível em: <http://www.biodieselbr.com>).

O etanol brasileiro já passou por altos e baixos desde sua criação no ProÁlcool até os tempos atuais, dos veículos *flex* ou bicomcombustível (GM, Ford, VW, Chrysler, Toyota, Honda, Renault, entre outras), que podem funcionar tanto com 100% de gasolina até 100% de álcool. A chegada dos veículos *flex* consolidou a liderança da indústria sucroalcooleira no agronegócio nacional, despertando o interesse de grupos de investidores multinacionais, impulsionando a geração de emprego e renda no país. Além disso, toda a gasolina vendida no Brasil contém no mínimo 20% (v/v) de etanol anidro. Nos EUA, mais de 10% de toda gasolina vendida em 2002 continha etanol (United States Environmental Protection Agency, 2002). Esse novo padrão tecnológico estabelece ao consumidor, que passa a decidir sobre qual combustível deve abastecer seu carro, com base em considerações econômicas, ambientais e de desempenho do veículo (A experiência do Brasil com o álcool combustível, Disponível em: <http://www.biodieselbr.com>). Ao optar pelo uso de etanol nos automóveis *flex*, o

consumidor brasileiro já ajudou a evitar a emissão de mais de 195 milhões de toneladas de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) desde 2003, quando os carros *flex* foram lançados no país. (Gazzoni, 2009).

Além disso, é importante ressaltar que em fermentações alcoólicas o desempenho do processo depende da tolerância das cepas de leveduras a elevados teores alcoólicos produzidos, e também ao efeito de íons metálicos sobre o crescimento de células de levedura (Wang *et al.*, 2006). Os íons potássio, magnésio, cálcio e zinco influenciam a taxa de conversão do açúcar e o acúmulo de biomassa (Chandrasena e Walker, 1997). Os meios complexos frequentemente são deficientes de íons metálicos (Jones e Greenfield, 1984), sendo importante verificar a influência desses íons sobre os microrganismos utilizados na fermentação.

Bioetanol possui vantagens em relação à gasolina, tais como: uma maior octanagem, menor inflamabilidade e maior calor de vaporização que a gasolina (Balat, 2007). Desvantagens do uso do etanol, como corrosividade, menor pressão de vapor (difícil arranque a frio), miscibilidade com água e toxicidade para os ecossistemas anteriormente citadas (MacLean *et al.*, 2003), foram totalmente superadas ao longo das décadas de pesquisa do programa Pró-Álcool realizadas no Brasil (Reel, 2006).

## 2.5. Glicerol

O glicerol, glicerina ou 1,2,3-propanotriol, constitui o maior resíduo gerado no processo de produção de biodiesel. Em cada 10 kg de biodiesel produzido gera-se cerca de 1 kg de glicerol (Sabourin-Provost *et al.*, 2009). A molécula de glicerol, em projeção de Fischer, está apresentada na Figura 2.6, a qual está presente em diferentes espécies, incluindo protistas unicelulares e mamíferos (Brisson *et al.*, 2001).

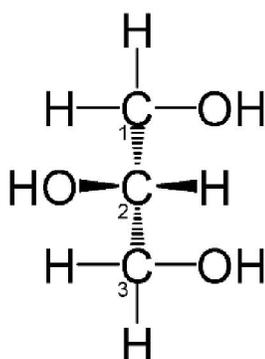


Figura 2.6 – Projeção de Fischer da molécula de glicerol.

Difícilmente encontraremos o glicerol como molécula livre nos organismos, geralmente se encontra como um triglicerídeo combinado a ácidos graxos. Grandes quantidades de glicerol podem ser encontradas também em óleos ou azeites como o de côco, dendê, soja, algodão e oliva, bem como em gorduras de animais como a banha de porco e sebo (Morrison, 1994).

O glicerol é o principal subproduto obtido durante a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais (Colin *et al.*, 2001). Na produção de biodiesel, o glicerol gerado representa 10% (v/v) do éster (Mu *et al.*, 2006).

O glicerol está presente em muitos processos industriais como em cosméticos e tintas, indústria automotiva, alimentícia, farmacêutica, papel e celulose, couro e têxteis. Também é utilizado como matéria prima para a produção de vários produtos químicos. O glicerol está sendo considerado como uma boa matéria prima para fermentações industriais (Wang *et al.*, 2001). Novas aplicações do glicerol vêm sendo descobertas, como seu uso como substrato para fermentações bacterianas, com a finalidade de se obter produtos de alto valor agregado como alcoóis, polímeros biodegradáveis, raminolípídeos, biosurfactantes, dentre outros (IOP, 2009).

Alguns dos microorganismos capazes de crescer anaerobicamente tendo o glicerol como a única fonte de carbono e energia são *Citrobacter freundii* (Daniel *et al.*, 1995), *Klebsiella pneumoniae* (Biebl *et al.*, 1998), *Clostridium pasteurianum* (Biebl, 2001), *Clostridium butyricum* (Himmi *et al.*, 1999; Colin *et al.*, 2001), *Enterobacter agglomerans* (Barbirato e Bories, 1997), *Enterobacter aerogenes* (Ito *et al.*, 2005) e *Lactobacillus reuteri* (Talarico *et al.*, 1990). No entanto, o glicerol também pode ser consumido por leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Candida* produzindo compostos como etanol e butanol (Flores *et al.*, 2000).

A *Escherichia coli* é capaz de fermentar glicerol anaerobicamente (Gonzalez *et al.*, 2008), porém apresenta uma taxa de crescimento específica baixa em glicerol, além da fermentação do glicerol ser dependente de suplementação do meio com triptona e outros nutrientes (Murarka *et al.*, 2008).

A *E. coli* é um dos microrganismos mais utilizados na engenharia metabólica e em aplicações industriais, é uma bactéria bem conhecida geneticamente e de “fácil” modificação e produz uma grande variedade de produtos de fermentação anaeróbica (Maeda *et al.*, 2007). A Figura 2.7 apresenta alguns possíveis produtos que podem ser formados pela fermentação do glicerol.

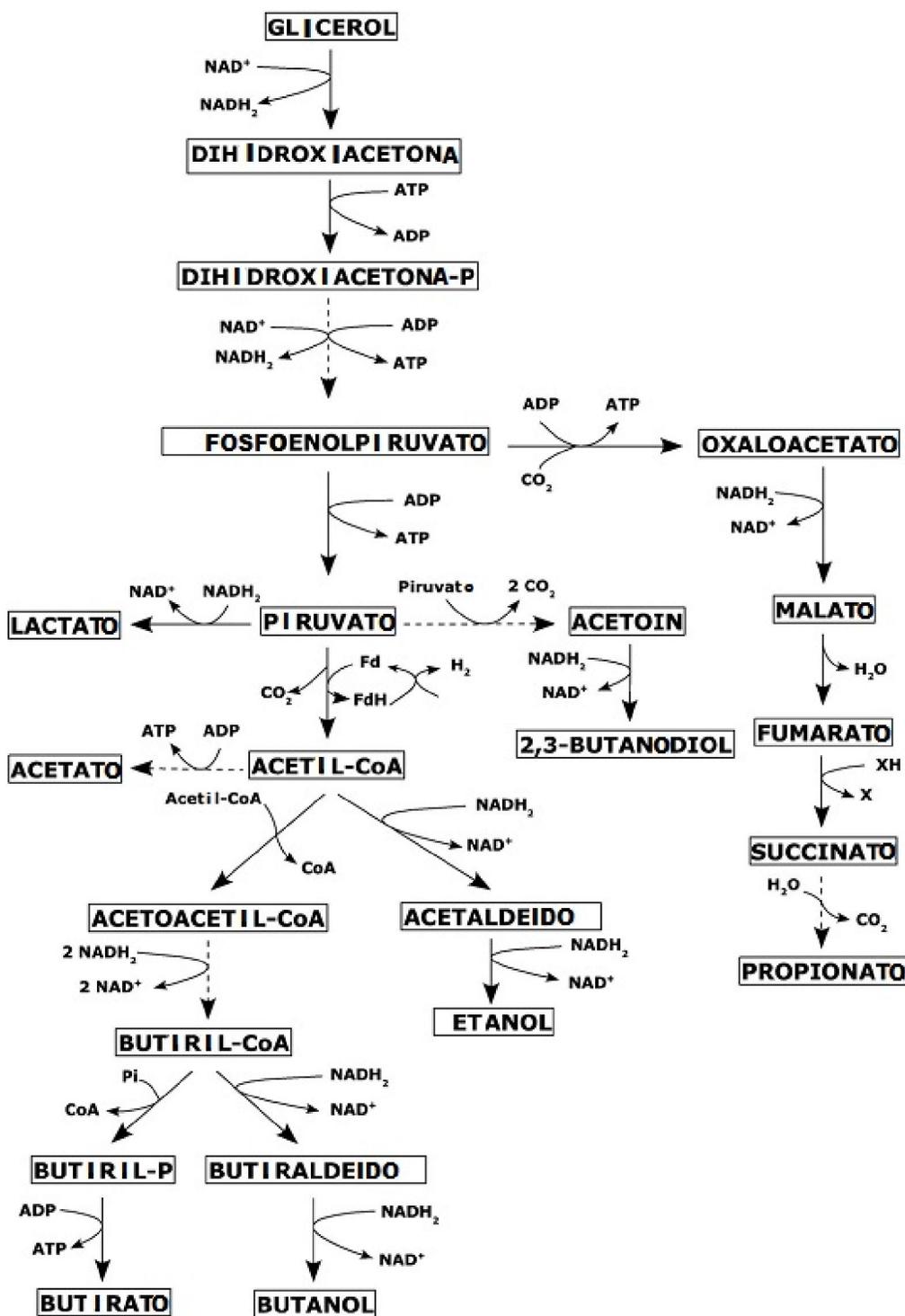


Figura 2.7 – Possíveis produtos finais da fermentação do glicerol por diferentes microrganismos (Silva *et al.*, 2009).

O glicerol pode atravessar a membrana citoplasmática através da difusão passiva, isto pode acontecer com pequenas moléculas sem carga. Todavia, em baixas concentrações de substrato, as células que limitam a absorção passiva possuem desvantagem de crescimento (Silva *et al.*, 2008). A captação do glicerol em vários microrganismos é freqüentemente citada como um transporte mediado por difusão através da membrana interna, esse transporte é o que ocorre, por exemplo, com a *Escherichia coli* (Voegelé *et al.*, 1993).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o fluxo de glicerol através da membrana do plasma é controlado por difusão passiva, uma proteína de canal ou um mecanismo de captação ativa (Wang *et al.*, 2001). As leveduras do gênero *Saccharomyces* são muito utilizadas em processos fermentativos, que objetivam produzir etanol, pelo fato desse microrganismo apresentar alta capacidade de conversão de açúcares em etanol, alta tolerância ao produto formado, osmotolerância, tolerância a variações de temperatura e atividade celular em ambiente ácido.

Na levedura *S. cerevisiae*, o glicerol é degradado através de dihidroxiacetona ou de glicerol-3-fosfato (Wang *et al.*, 2001). Neste último, o glicerol é convertido a glicerol-3-fosfato através da glicerol quinase (EC 2.7.1.30), o qual pode ser usado como um precursor para a biossíntese de lipídios ou na conversão em dihidroxiacetona fosfato e pode então ser transformado em gliceraldeído-3-fosfato pela triosefosfato isomerase (EC 5.3.1.1) na glicólise, ou pode servir como substrato para a síntese de outros metabólitos (Wang *et al.*, 2001).

Já a *Escherichia coli* pode fermentar o glicerol se o pH for devidamente controlado e interligado à disponibilidade de CO<sub>2</sub>, que é produzido em condições ácidas pela oxidação de formato pela enzima formato-hidrogênio-liase. Segundo os autores, a *E. coli* é um bom biocatalisador para a conversão do glicerol em etanol e hidrogênio (Dharmadi *et al.*, 2006).

A fermentação do glicerol por *Enterobacteriaceae* resulta na acumulação de dois principais produtos, 1,3-propanodiol e acetato, enquanto que os produtos secundários, lactato, formato, succinato e etanol, são produzidos em quantidades variáveis, dependendo das condições de cultivo (Barbirato *et al.*, 1998).

### 3. METODOLOGIA

Antes de serem iniciados os cultivos com glicerol bruto, proveniente da indústria do biodiesel, foi necessário caracterizar adequadamente este material visando à identificação de possíveis minerais, capazes de causar inibição/ativação no crescimento microbiano. Essa caracterização foi realizada gentilmente pela Embrapa Agroindústria Tropical no Laboratório de Solos e Água.

#### 3.1. Caracterização do glicerol

Para a caracterização das amostras de glicerol produzido por reação de transesterificação de óleo de soja, cedido pela empresa EEB – Empresa Brasileira de Bioenergia, realizou-se uma extração ácida e estas foram caracterizadas quanto à presença de macro (sódio, potássio, enxofre, fósforo, cálcio e magnésio) e micro (cobre, ferro, manganês e zinco) elementos. Todas as análises foram realizadas em triplicata seguindo metodologia da Embrapa.

##### 3.1.1. Extração ácida a quente

As amostras de glicerol foram pesadas, cerca de 1,0 g, que foram colocados em tubos de digestão e a estes foram adicionados 8 mL da mistura ácida, composta por 600 mL de HNO<sub>3</sub> p.a. e 200 mL de HClO<sub>4</sub> p.a. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 3 a 4 horas e, a seguir, estes foram para o bloco digestor, aquecendo-o lentamente até 120°C. Este processo foi mantido nesta temperatura até cessar o desprendimento de vapores castanhos. Em seguida, a temperatura foi elevada a 200 °C e mantida até cessar o desprendimento de vapores brancos, aproximadamente 3 a 4 horas. Quando as amostras estavam a temperatura ambiente, após o término da digestão, foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, e então completou-se o volume com água deionizada.

O digerido foi utilizado para dosagens de fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn).

### 3.1.2. Determinação de potássio (K) e sódio (Na)

Para a determinação de Na e K foi utilizado um Fotômetro de chama Digimed modelo DM-61. Diluiu-se na razão 1:10 a amostra tratada com a mistura ácida descrita em 3.1.1. A calibração do fotômetro foi realizada com a preparação da curva com os padrões 0, 10 e 20 mg/L de K e Na. Após a calibração, realizaram-se as leituras das amostras, fazendo-se diluições quando necessário. As curvas de calibração foram preparadas por diluição de soluções padrão estoque de concentração 1000 ppm. Utilizou-se o programa *Origin* versão 6.0 (OriginLab) para verificar a significância das curvas padrão.

### 3.1.3. Determinação de fósforo (P) e enxofre (S)

Para a determinação de P e S foi utilizado um Espectrofotômetro FEMTO modelo 600 Plus. Este foi calibrado por meio de curvas de calibração para cada elemento, A representação gráfica dessa curva está apresentada no Anexo A1. As amostras foram preparadas em erlenmeyers de 25 ou 50 mL, as quais foram transferidas 5 mL. A estas foram adicionados 10 mL da solução diluída de molibdato de amônio e uma pitada de ácido ascórbico sendo agitado em seguida. Após 30 minutos iniciou-se as leituras de absorbância no comprimento de onda de 660 nm.

Fez-se uma correlação linear no programa *Origin* versão 6.0 (OriginLab) e verificou-se pelo  $R^2$  que os pontos estavam bem ajustados, possuindo boa correlação, que pode ser observada pela Equação 3.1.

$$C \left( \frac{mg}{kg} \right) = 0,040185 + 10,60464 \times A \quad (3.1)$$

$$R^2 = 0,9998$$

Onde  $C$  é a concentração do elemento e  $A$  é a absorvância medida experimentalmente.

A curva de calibração do enxofre está representada no Anexo A.2. As amostras foram preparadas em tubos de ensaio de 40 mL, transferiu-se 10 mL de amostras para análise. Em seguida, foi adicionado 1 mL de uma solução de HCl 6,0 N contendo 20 mg/L de S. A estas foi adicionado 500 mg de cloreto de bário. Após um minuto, agitou-se o tubo de ensaio em vórtice por 30 segundos até dissolução do cloreto de bário. A amostra permaneceu em repouso por 5 minutos, e a seguir realizou-se as leituras da absorvância a 420 nm de comprimento de onda no tempo máximo de 8 minutos.

Fez-se uma correlação linear, através do programa *Origin 6.0* (OriginLab), e verificou-se através do  $R^2$  que os pontos estavam bem ajustados, obtendo-se a equação linear representada pela equação 3.2.

$$C \left( \frac{mg}{kg} \right) = -1,54286 + 85,46394 \times A \quad (3.2)$$

$$R^2 = 0,996$$

Onde:  $C$  é a concentração do elemento e  $A$  é a absorvância medida experimentalmente.

#### 3.1.4. Determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn

A determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn foi realizada em Espectrômetro de Absorção Atômica Perkin Elmer, modelo AAnalyst 300, através do método de atomização por chama ( $C_2H_2$ /ar), nas condições experimentais utilizadas para cada elemento apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Condições experimentais para cada elemento analisado por espectrometria de absorção atômica.

<b>Elementos</b>	<b>Fenda do monocromador (mA)</b>	<b>Comprimento de onda (<math>\lambda</math>) (nm)</b>	<b>Concentrações dos padrões (mg/L)</b>
Cálcio	0,7	422,7	0 e 5
Magnésio	0,7	485,2	0 e 0,5
Cobre	0,5	324,7	0 e 0,5
Ferro	0,2	248,3	0 e 5
Manganês	0,5	279,5	0 a 0,5
Zinco	0,7	213,9	0 e 5

Lâmpadas de cátodo oco de cada elemento a ser analisado foram utilizadas como fontes de radiação. As curvas de calibração foram preparadas a partir de soluções padrão de concentração 1000 ppm para cada elemento, antes de cada procedimento de análise. Foi utilizado o programa *Microcal Origin* versão 6.0 para verificar a significância das curvas padrão.

### 3.2. Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram:

*Saccharomyces sp.*1238 cedida da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos – UFPE;

*Escherichia coli* 224 ATCC 25922 comprada da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos – UFPE.

Realizou-se uma pesquisa bibliográfica dos microrganismos capazes de utilizar glicerol como fonte de carbono para produção de etanol. A partir dessa revisão, resolveu-se testar a levedura cedida pela Universidade Federal de Pernambuco. A bactéria *E. coli* foi selecionada por ser um microrganismo que não oferece graves riscos de manipulação devido o mesmo ser nível de biossegurança 1, ou seja, o risco individual e para a comunidade é baixo. Este nível de segurança aplica-se a agentes biológicos bem caracterizados, que têm

probabilidade nula ou baixa de provocar infecções no homem ou em animais sadios e de risco potencial mínimo para o profissional do laboratório e para o ambiente.

### 3.3. Fermentação

Fermentações em batelada em mesa rotatória Tecnal modelo 420 foram realizadas em condições adequadas para cada tipo de microrganismo estudado (ver seções 3.3.1 e 3.3.2). Para o acompanhamento dos cultivos utilizando glicerol como substrato, amostras foram retiradas em tempos pré-definidos e os reagentes e produtos foram analisados. Os produtos obtidos na fermentação foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

#### 3.3.1. *Saccharomyces sp.* 1238

A levedura *Saccharomyces sp.* 1238 foi mantida em tubos inclinados e camada alta e placas de petri com Ágar Dextrose Sabouraud (AS) sob refrigeração e repicadas a cada 60 dias, e 24 h antecedentes as fermentações.

O meio utilizado para inóculo está apresentado na Tabela 3.2. O pH foi ajustado em 5,0 e, a seguir, o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. O inóculo foi preparado inserindo-se 3 alças do slant contendo o microrganismo em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio. A seguir, incubou-se a 30 °C e 150 rpm, durante 24 horas, em agitador rotatório.

**Tabela 3.2** - Composição do meio para inóculo da levedura *Saccharomyces sp.* 1238.

Reagentes	Concentração g/L
Glicose	30
Extrato de levedura	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,65

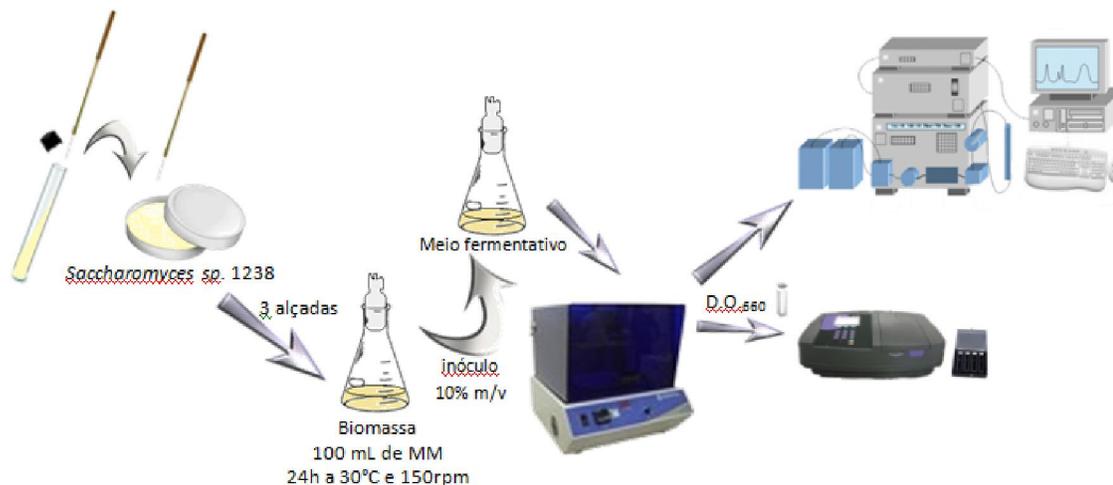
Após as 24 horas em mesa rotatória, o inóculo foi centrifugado a 6000 rpm para retirada das células. A seguir 1,2 g de biomassa de *Saccharomyces sp.* 1238, obtida a partir da centrifugação, foram adicionadas ao meio fermentativo, cuja composição está apresentada na Tabela 3.3. O pH do meio foi previamente ajustado para 5,0 e autoclavado a 121°C por 15 minutos para esterilização.

**Tabela 3.3** - Composição do meio para cultivo da levedura *Saccharomyces sp.* 1238.

Reagentes	Concentração g/L
Extrato de levedura	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,65
Glicerol	1% v/v

Nas fermentações realizadas com *Saccharomyces sp.* 1238, variou-se a concentração de glicerol adicionado ao meio fermentativo de 0,5 %, a 5 % v/v e fixou-se a concentração de inóculo em 1 % m/v. Após as 8 horas de fermentação, as quais eram retiradas amostras de tempos em tempos, o Erlenmeyer permaneceu em mesa rotatória sob as mesmas condições para retirada de amostra após 24 horas do início do ensaio, na qual se analisou a produção de etanol e o consumo de glicerol.

Todas as fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, a 30 °C e 150 rpm, durante 24 horas. A Figura 3.1 mostra uma representação esquemática de todo o processo.



**Figura 3.1** - Representação esquemática do processo fermentativo utilizando *Saccharomyces sp. 1238*.

### 3.3.2. *Escherichia coli* 224 (ATCC 25922)

A bactéria *Escherichia coli* foi mantida em tubos, inclinados e camada alta, e placas de petri com Ágar Nutriente (AN) sob refrigeração e repicadas a cada 60 dias e 24 h antecedentes aos experimentos.

O meio utilizado para inóculo foi o Ec Broth, cuja composição está apresentada na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4** – Composição do meio Ec Broth para inóculo.

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração g/L</b>
Triptona	20,0
Lactose	5,0
Mistura de sais biliares	1,5
NaCl	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5

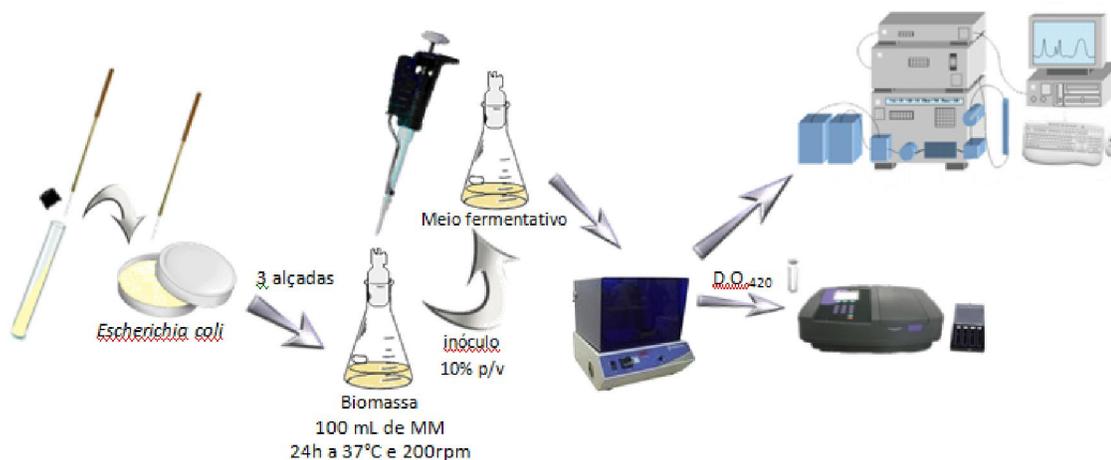
O inóculo foi preparado inserindo-se 3 alças do slant contendo o microrganismo em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio. Incubou-se em agitador rotatório a 37 °C e 200 rpm durante 24 horas. Após esse período, retirou-se uma alíquota de 1 mL do inóculo e se adicionou ao meio fermentativo, cuja composição está apresentada na Tabela 3.5. O pH do meio foi previamente ajustado para 7,2 e, em seguida, autoclavado a 110°C por 10 min (Smith e Neidhardt, 1983).

**Tabela 3.5** – Composição do meio de cultivo para *E. coli*.

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração g/L</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,994
MgSO <sub>4</sub>	0,1204
CaCl <sub>2</sub>	0,00998
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,962
NH <sub>4</sub> Cl	1,016
NaCl	0,526
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	$8,647 \times 10^{-4}$
Triptona	2
Glicerol	10,131

As fermentações foram conduzidas em agitador rotatório utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, a 37 °C e 200 rpm (Dharmadi *et al.*, 2006)

durante 48 horas (Gonzalez *et al.*, 2008). Uma representação esquemática de todo o processo está apresentada na Figura 3.2.



**Figura 3.2** – Representação esquemática do processo fermentativo utilizando a bactéria *E. coli*.

### 3.4. Crescimento celular

A determinação do crescimento celular foi realizada através de método indireto, o qual utiliza determinação da turbidez equivalente a densidade celular. A densidade ótica foi medida por espectrofotometria (Spectronic instruments/ Spectronic 20 Genesys) a 660 nm e 420 nm para *Saccharomyces sp.* 1238 e *Escherichia coli* 224 ATCC 25922, respectivamente.

A concentração de biomassa, em g/L, foi obtida pela curva de calibração descrita a seguir. Os microrganismos foram cultivados em caldos nutritivos sob agitação de 200 rpm a 30 e 37 °C para *Saccharomyces sp.* e *Escherichia coli*, respectivamente, durante 24 horas. Em seguida, separou-se a biomassa por centrifugação por 15 minutos a 6000 rpm, em mini centrífuga (HT) para a levedura e 10000g em centrífuga de maior potência para a bactéria, seguindo-se de três lavagens com água. A submissão à secagem em estufa a 60 °C até peso constante. Suspensões-padrão foram preparadas através de diluições seriadas e medida a absorvância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda adequados.

### 3.5. Determinação da concentração dos produtos da fermentação

A análise dos produtos foram realizadas retirando-se amostras de 1 mL dos Erlenmeyers a cada uma hora, e então, foram transferidas para eppendorfes de 1,5 mL e centrifugadas em mini centrifuga (HT) durante 15 minutos a 6000 rpm para separação das células. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  para garantir total ausência de particulasa na amostra a ser injetada no HPLC. Esse processo está ilustrado na Figura 3.3.



**Figura 3.3** – Representação esquemática da preparação das amostras para injeção em HPLC.

As análises foram realizadas em HPLC (Waters) acoplado a um detector de índice de refração (IR) modelo 2414, duas bombas (Waters) modelo 1525 e pré-coluna supelcogel 9  $\mu\text{m}$ , 5 cm  $\times$  4,6 mm (Supelco) com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm  $\times$  7,8 mm (Supelco), a 30  $^{\circ}\text{C}$ , volume de injeção das amostras de 10  $\mu\text{L}$ , utilizando ácido fosfórico 0,1 M como fase móvel a uma vazão de 0,5 mL/min.

### 3.5.1. Determinação do glicerol

A quantificação do glicerol foi realizada em HPLC, através de detector índice de refração (IR), nas seguintes condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1 M a uma vazão de 0,5 mL/min, durante 30 min, com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm (Supelco), a 30 °C, com volume de injeção das amostras de 10 µL e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm. A determinação do glicerol foi realizada baseando-se em uma curva padrão de glicerol, cujo gráfico que representa a curva de padrão está na Figura B.1 (Anexo).

A correlação linear obtida encontra-se ilustrada na Eq. 3.3 e verificou-se através do coeficiente de determinação  $R^2$  que os pontos estavam bem ajustados a equação da reta, graficamente representada pela Figura B.1.

$$C \left( \frac{g}{L} \right) = 0,10767 + 9,15 \cdot 10^{-6} \times A \quad (3.3)$$

$$R^2 = 0,9996$$

Onde  $C$  é a concentração de glicerol em g/L e  $A$  é a área do pico obtido por HPLC.

### 3.5.2. Determinação do Ácido Acético

As análises para determinação do ácido acético foram realizadas nas seguintes condições cromatográficas: solução fase móvel ácido fosfórico 0,1 M a uma vazão de 0,5 mL/min, durante 30 min, com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm (Supelco), a 30 °C, com volume de injeção das amostras de 10 µL e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm.

A determinação do ácido acético foi realizada baseando-se em uma curva padrão de ácido acético, cuja representação gráfica está na figura B.2 em anexo.

A correlação linear obtida, elaborada no programa *Microcal Origin* versão 6.0, está representada pela Eq. 3.4.

$$C \left( \frac{g}{L} \right) = 0,00674 + 9,40 \cdot 10^{-7} \times A \quad (3.4)$$

$$R^2 = 0,99781$$

Onde  $C$  é a concentração de ácido acético em g/L e  $A$  é a área do pico obtido por HPLC. Evidenciando a confiabilidade dos dados e equação da reta. O coeficiente de determinação  $R^2$  da curva sugere que os pontos estavam bem ajustados.

### 3.3.3. Determinação do Etanol

As análises para determinação do etanol foram realizadas em HPLC, nas seguintes condições experimentais: solução de fase móvel ácido fosfórico 0,1 M a uma vazão de 0,5 mL/min, durante 30 min, com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm (Supelco), a 30 °C, e volume de injeção das amostras de 10 µL e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm.

A determinação do etanol foi realizada baseando-se em uma curva padrão de etanol cujo gráfico está representado pela Figura B.3 em anexo. Fazendo-se uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 6.0, verificou-se através do  $R^2$  que os pontos estavam bem ajustados, obtendo-se equação linear representada pela Equação 3.5.

$$C \left( \frac{g}{L} \right) = -0,88984 + 2,24 \cdot 10^{-7} \times A \quad (3.5)$$

$$R^2 = 0,99918$$

Onde  $C$  é a concentração de etanol em g/L e  $A$  a área do pico obtido pela análise em HPLC.

### 3.3.4. Determinação da glicose

As análises foram realizadas em HPLC, através de detector índice de refração (IR), nas seguintes condições experimentais: solução de fase móvel ácido fosfórico 0,1 M a uma vazão de 0,5 mL/min, durante 30 min, com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm (Supelco), a 30 °C, com volume de injeção das amostras de 10 µL e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm.

A glicose foi determinada com base em uma curva padrão de glicose, cuja representação gráfica está na Figura B.4 em anexo..

Verificou-se por meio da correlação linear, elaborada no programa Microcal Origin versão 6.0, é do coeficiente de determinação  $R^2$  que os pontos estavam bem ajustados, representada pela Equação 3.6.

$$C \left( \frac{g}{L} \right) = -1,254 + 7,916 \cdot 10^{-6} \times A \quad (3.6)$$
$$R^2 = 0,9975$$

Onde  $C$  é a concentração de glicose em g/L e  $A$  a área do pico obtido por HPLC.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Caracterização do glicerol

Realizou-se uma caracterização físico-química do glicerol vindo da indústria do biodiesel (glicerol bruto) que foi utilizado como fonte de carbono para as fermentações, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** – Caracterização de macro e micro elementos da amostra de glicerol.

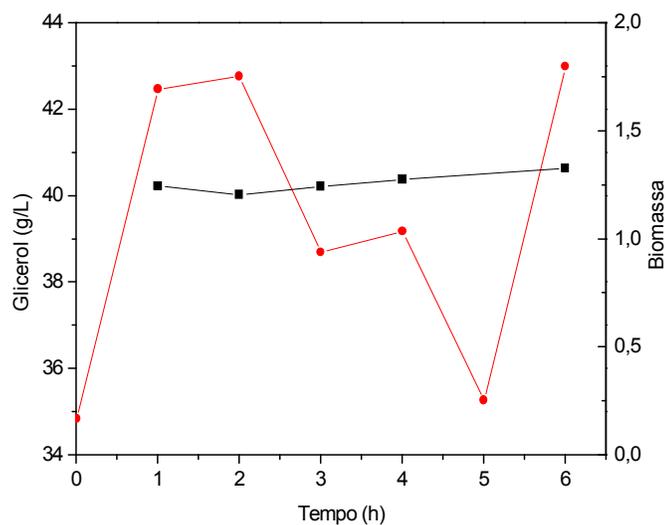
<b>Elementos</b>	<b>Concentração (mg/kg)</b>
Cálcio	4,2
Cobre	ND
Enxofre	160
Ferro	6,6
Fósforo	193,3
Magnésio	1,2
Manganês	ND
Potássio	2312,5
Sódio	4987,5
Zinco	ND

ND: não detectado.

A caracterização do glicerol bruto, principal fonte de carbono utilizada neste estudo, forneceu informações importantes sobre os nutrientes presentes, auxiliando, assim, no preparo do meio de cultivo para os microrganismos e na identificação de um possível inibidor de crescimento. Esse glicerol bruto, após sua caracterização foi utilizado como fonte de carbono no cultivo para produção de etanol nas diferentes condições operacionais aqui testadas. Esse glicerol bruto não passou por qualquer etapa de purificação para ser utilizado nas fermentações. O objetivo era tentar eliminar etapas de *up-stream* e minimizar os custos de operação numa eventual ampliação de escala.

#### 4.2. Fermentação utilizando *Saccharomyces sp.* 1238

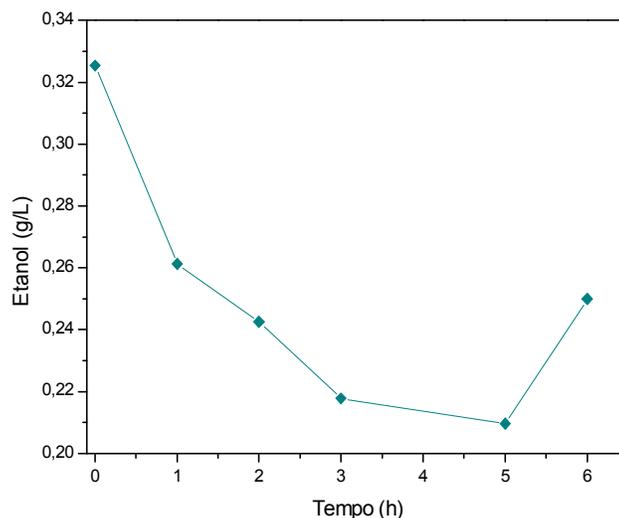
A Figura 4.1 mostra os resultados da concentração de glicerol bruto utilizado como fonte de carbono em uma concentração de 5 % v/v e biomassa formada durante o processo fermentativo.



**Figura 4.1** – Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo na fermentação utilizando glicerol 5 % v/v: (●) glicerol, (■) biomassa.

Pode-se observar um baixo consumo do glicerol e baixa produção de biomassa. Este fato pode ser devido a inibição pelo substrato, pois a quantidade de glicerol adicionada ao meio foi alta causando o não crescimento da biomassa, e o consumo de glicerol sendo impedido.

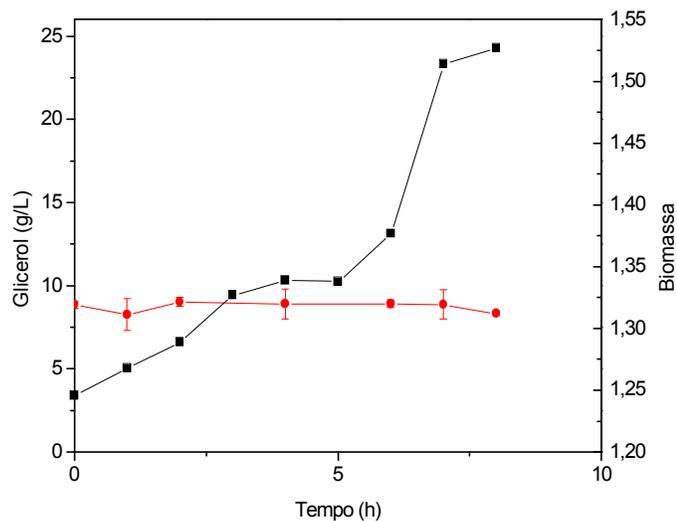
A Figura 4.2 mostra o resultado obtido para a produção de etanol da fermentação com 5 % v/v de glicerol bruto como fonte de carbono.



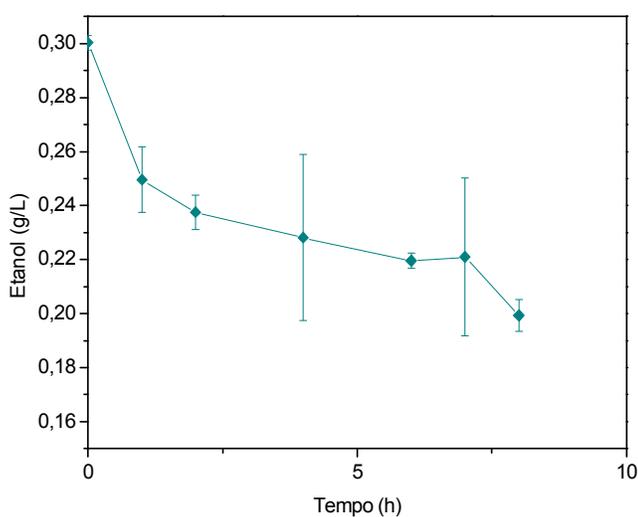
**Figura 4.2** – Concentração de etanol em função do tempo na fermentação utilizando 5 % v/v de glicerol.

Pela análise do gráfico pode-se verificar que não houve produção de etanol. Os resultados apresentados nas Figuras 4.1 e 4.1 sugerem que no início do processo há uma pequena quantidade de etanol que ao longo do processo fermentativo desaparece, isto pode ser explicado pelo fato de já no inóculo ser produzido uma pequena quantidade desse composto, que junto com o inóculo é adicionado ao meio fermentativo.

Para verificar se a falta de produção de etanol ocorreu devido ao excesso de glicerol no meio de cultivo, ou seja, se estava ocorrendo uma inibição pelo substrato, novas fermentações foram realizadas utilizando concentrações de glicerol de 1 % e 0,5 % v/v, as Figuras 4.3 e 4.4 mostram os resultados obtidos na fermentação com glicerol a 1% v/v .



**Figura 4.3** – Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo o utilizando glicerol 1 %: (●) glicerol, (■) biomassa.

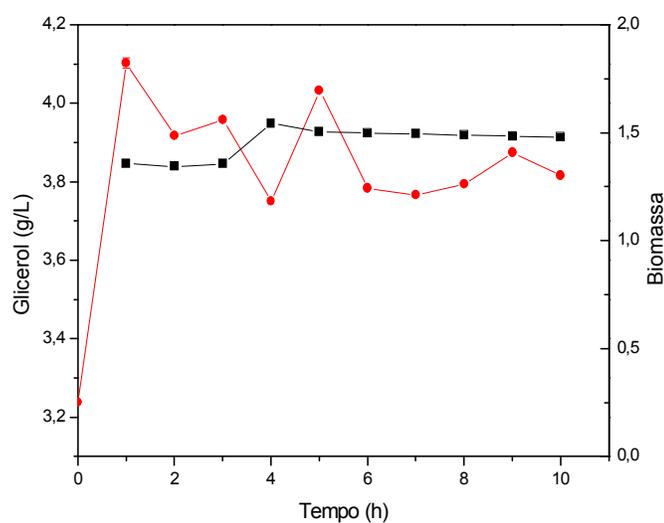


**Figura 4.4** – Concentração de etanol na fermentação utilizando 1 % de glicerol.

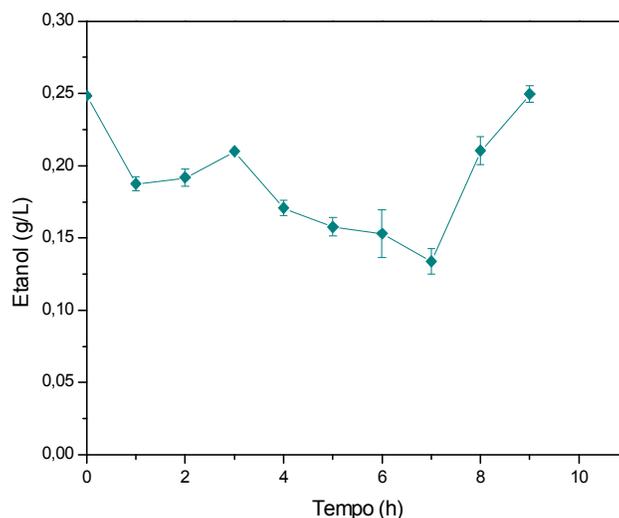
Pela análise da Figura 4.3, pode-se verificar que o baixo consumo de glicerol continuou, pois no início do processo fermentativo havia, aproximadamente, 9 g/L de glicerol e após 24 h ainda restavam, aproximadamente, 7 g/L de glicerol no meio de cultivo, ou seja, um consumo de apenas 22% do substrato foi consumido em 24 horas de cultivo.

Na Figura 4.4 pode-se observar que não houve produção de etanol, visto que, há uma quantidade de etanol inicial, provavelmente proveniente do inóculo, que reduz ao longo do processo, sabe-se que o etanol se torna uma fonte de carbono de mais fácil acesso ao microrganismo se comparado ao glicerol, sendo este consumido para ser utilizado no crescimento do mesmo.

As Figuras 4.5 e 4.6 mostram os resultados obtidos na fermentação com 0,5 % v/v de glicerol.



**Figura 4.5** – Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo na fermentação utilizando glicerol 0,5 %.

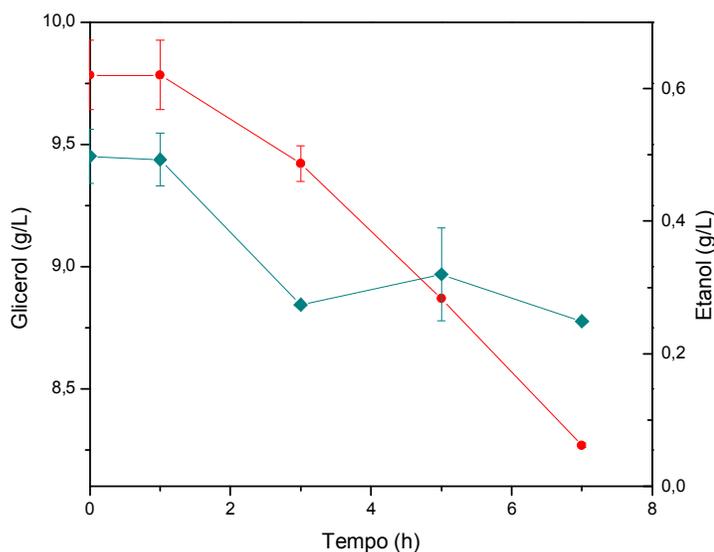


**Figura 4.6** – Concentração de etanol em função do tempo na fermentação utilizando 0,5 % de glicerol.

Pela análise da Figura 4.5 verifica-se que não houve, novamente, um consumo significativo de glicerol, mesmo com a redução da concentração do mesmo adicionado ao meio de cultivo. Pela Figura 4.6 verifica-se a baixa produção de etanol com, cerca de 0,25 g/L de etanol em 10 h de fermentação.

Realizou-se uma fermentação com glicerol padrão analítica (P.A), para verificar a produção da levedura com substrato puro na melhor condição encontrada. Assim, seria possível saber se o glicerol utilizado nas fermentações, oriundo da reação de produção do biodiesel estava afetando negativamente o sistema fermentativo. Pois este insumo como se sabe, contém diversas impurezas e poderia estar inibindo o crescimento do microrganismo. O microrganismo poderia não ter acesso à fonte de carbono disponível no meio fermentativo.

Na Figura 4.7 observa-se o gráfico de consumo de glicerol e de produção de etanol na fermentação utilizando 0,5% v/v de fonte de carbono..



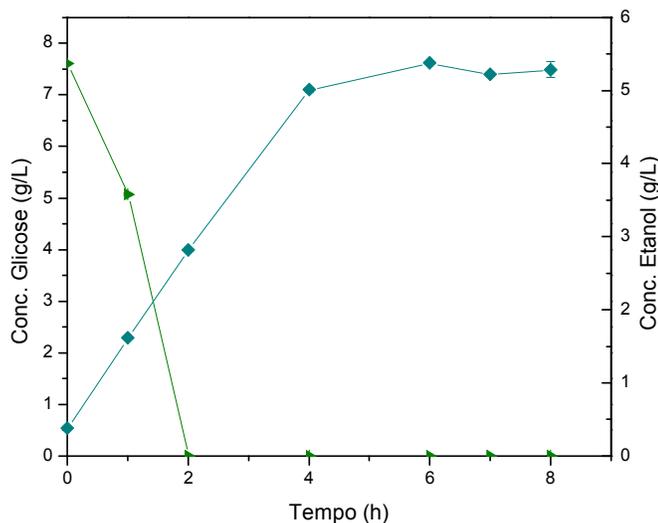
**Figura 4.7** – Concentração de glicerol (●) e etanol (◆) em função do tempo na fermentação utilizando glicerol P.A. 1 % v/v.

No início da fermentação haviam, aproximadamente, 9,75 g/L de glicerol no meio fermentativo, após 7h de fermentação cerca de 1,8 g/l de glicerol havia sido consumido.

O resultado para produção de etanol a partir de glicerol P.A. possui o mesmo perfil das fermentações anteriores, resultando cerca de 0,3 g/L em 7h de fermentação. Esses resultados de fermentações utilizando glicerol bruto e P.A. como fonte de carbono sugerem que a levedura *Saccharomyces sp.* 1238 não se mostrou apta a consumir o glicerol para produzir etanol.

Com o objetivo de verificar a viabilidade da levedura, foi realizada uma fermentação utilizando glicose como fonte de carbono ao invés de glicerol. Assim, seria verificado se com glicose a mesma produziria etanol, pois, sabe-se que as leveduras do gênero *Saccharomyces* são boas produtoras de álcool a partir de glicose.

Utilizou-se nesta fermentação 10 g/L de glicose e 1 % (v/v) de inóculo. Na Figura 4.8 pode-se observar a curva de consumo de glicose e produção de etanol.



**Figura 4.8** – Concentração de glicose e etanol em função do tempo: (►) glicose, (●) etanol.

Como pode ser observado através do gráfico da Figura 4.8, a levedura em estudo mostrou-se capaz de produzir etanol utilizando glicose como fonte de carbono. Rapidamente a glicose foi consumida e a produção de etanol alcançou cerca de, 5,5 g/L.

Assim, pôde-se esclarecer que não é o glicerol bruto que interferiu na produção de etanol para este microrganismo, ou seja, o microrganismo estava viável. Apesar de leveduras do gênero *Saccharomyces* serem capazes de produzir etanol utilizando glicerol como fonte de carbono, foi verificado por meio de várias fermentações que a mesma não foi capaz de produzir etanol em quantidade expressiva com glicerol como fonte de carbono, com esta cepa, embora isso seja possível quando se utiliza glicose. Portanto, esse microrganismo foi desprezado e se iniciou o estudo de produção de etanol com a utilização de *Escherichia coli* 224 ATCC 25922.

#### 4.3. Fermentação utilizando *Escherichia coli*. 224 ATCC 25922

Nas fermentações com *Escherichia coli* a concentração de glicerol adicionado ao meio de cultivo foi variada de 1, a 20 g/L. As fermentações foram realizadas conforme descrito no item 3.3.2.

As Figuras 4.09 e 4.10 mostram os resultados do processo fermentativo para produção de etanol pela *Escherichia coli* 224 ATCC 25922, com adição de 20 g/L de glicerol ao meio de cultivo.

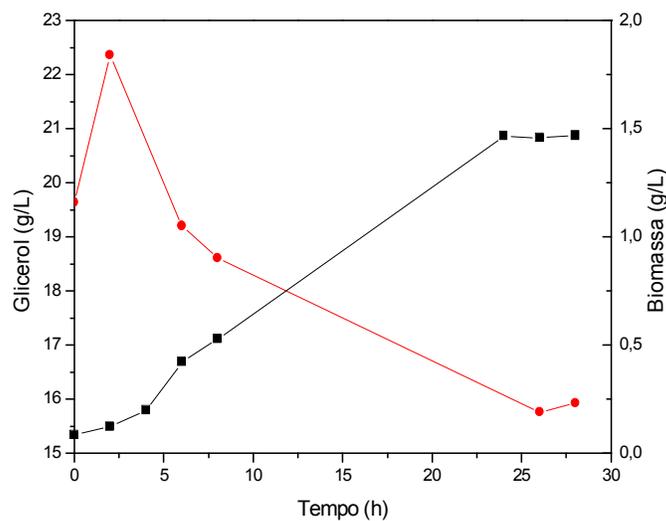


Figura 4.09 - Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo na fermentação utilizando 20 g/L de glicerol: (●) glicerol, (■) biomassa.

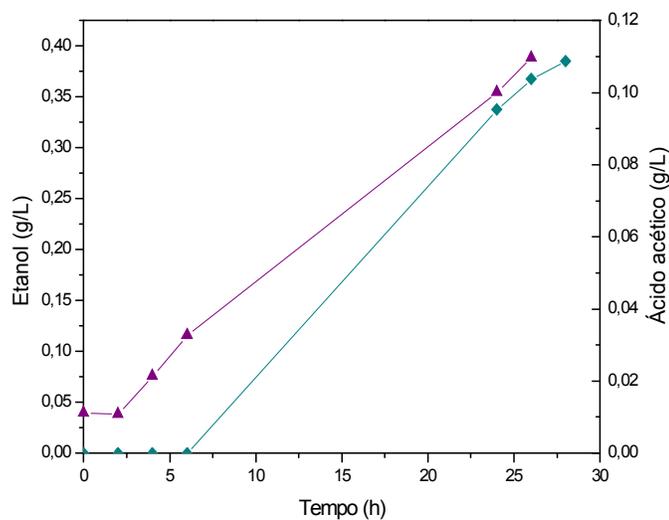
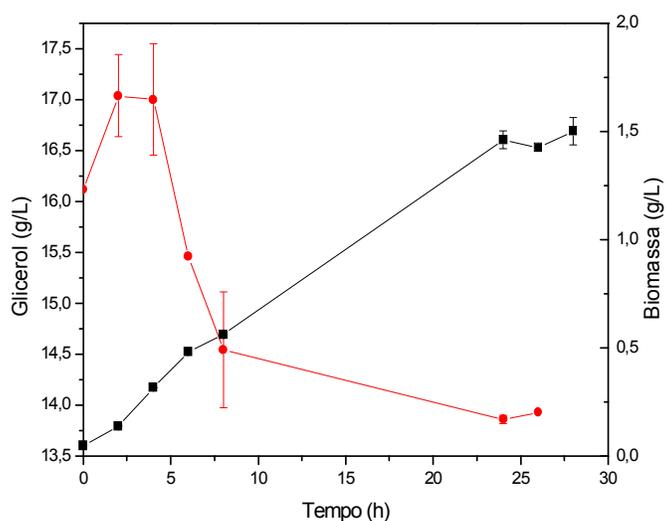


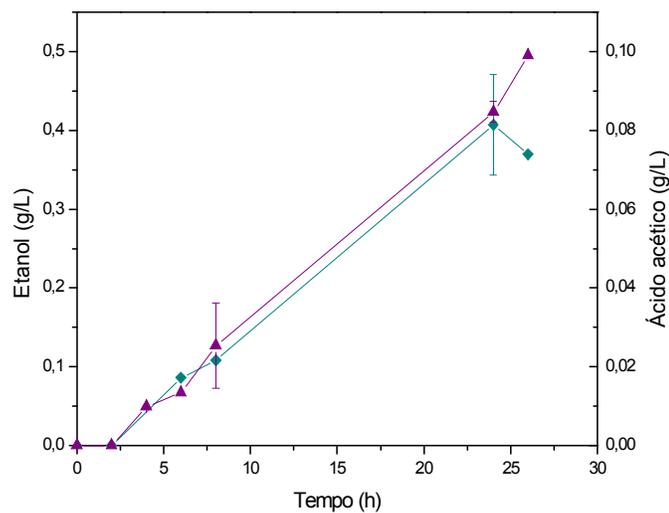
Figura 4.10 – Concentração de etanol e ácido acético em função do tempo na fermentação utilizando 20 g/L de glicerol: (◆) etanol, (▲) ácido acético.

Nessa fermentação com glicerol a 20 g/L verificamos um baixo consumo de glicerol, aproximadamente 5,0 g/L e produção de biomassa de cerca de 1,0 g/L, indicando um excesso de substrato disponível, produzindo, aproximadamente, 0,35 g/L de etanol e 0,10 g/L de ácido acético em 24 horas de fermentação. Devido ao baixo consumo e a baixa produção de etanol foram realizados novos ensaios com mais baixas concentrações do substrato.

As Figuras 4.11 e 4.12 mostramos resultados de concentração de glicerol e biomassa, etanol e ácido acético, respectivamente, do processo fermentativo com adição de 15 g/L de glicerol ao meio de cultivo.



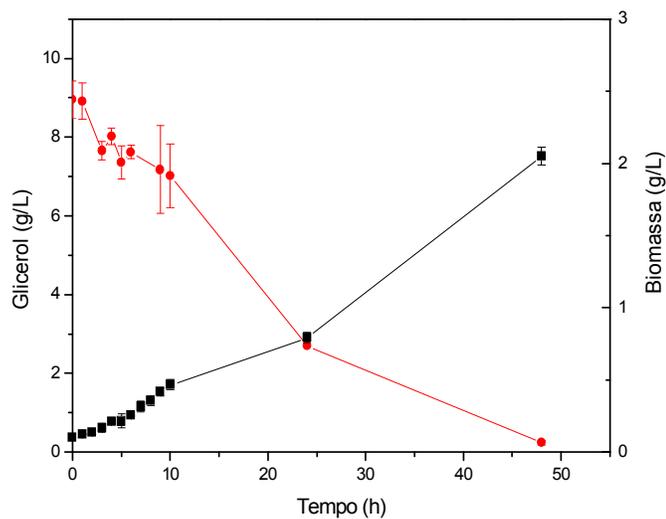
**Figura 4.11** – Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo na fermentação utilizando 15 g/L de glicerol: (●) glicerol, (■) biomassa.



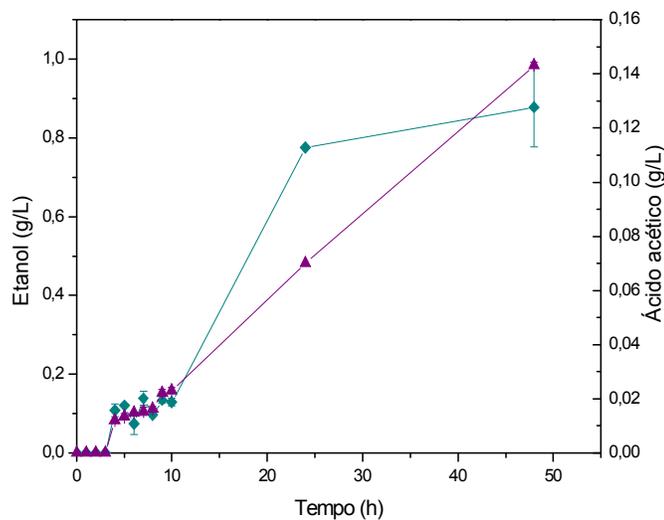
**Figura 4.12** – Concentração de etanol e ácido acético em função do tempo na fermentação utilizando 15 g/L de glicerol: (◆) etanol, (▲) ácido acético.

Evidenciou-se um baixo consumo de glicerol. Em 24 horas de fermentação ainda tínhamos cerca de 14 g/L de glicerol no meio. A produção de etanol e de ácido acético também foi baixa, com produção máxima de 0,40 g/L e 0,10 g/L respectivamente. Os resultados sugerem que a concentração de glicerol no meio ainda está alta, já que percebe-se a fase lag indicando que não ocorreu processo inibitório..

As Figuras 4.13 e 4.14 mostram os resultados do processo fermentativo com adição de 10 g/L de glicerol ao meio de cultivo.



**Figura 4.13** - Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo na fermentação utilizando 10 g/L de glicerol: (●) glicerol, (■) biomassa.

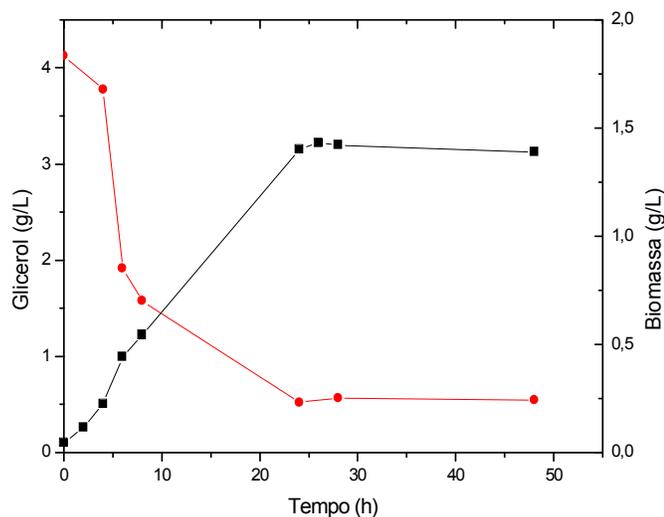


**Figura 4.14** – Concentração de etanol e ácido acético em função do tempo na fermentação utilizando 10 g/L de glicerol: (◆) etanol, (▲) ácido acético.

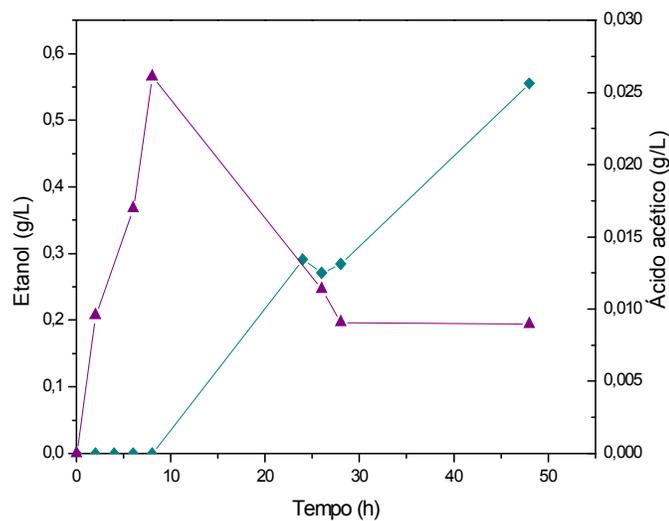
Analisando a Figura 4.13 verificamos que o glicerol foi quase totalmente consumido em 48 horas de fermentação e a biomassa teve crescimento bastante significativo. Também é perceptível uma melhora na produção de etanol, os quais tiveram uma produção

máxima em torno de 0,9 g/L e ácido acético apresentou um aumento de 0,05 g/L, produzindo 0,15 g/L, Figura 4.14. Observa-se uma boa produção tanto de etanol quanto ácido acético comparado com as fermentações anteriores, mas um pouco abaixo da produção do trabalho de Murarka (2008) que foi de 1,8 g/L com 48 h de utilizando *Escherichia coli* MG1655.

As Figuras 4.15 e 4.16 mostram os resultados do processo fermentativo com adição de 5 g/L de glicerol ao meio de cultivo. Como pode ser observado pelos gráficos, 5 g/L de glicerol foi quase totalmente consumido e a produção de biomassa se manteve constante. Obteve-se uma baixa produção de etanol com máxima de, aproximadamente, 0,55 g/L e 0,025 de ácido acético.

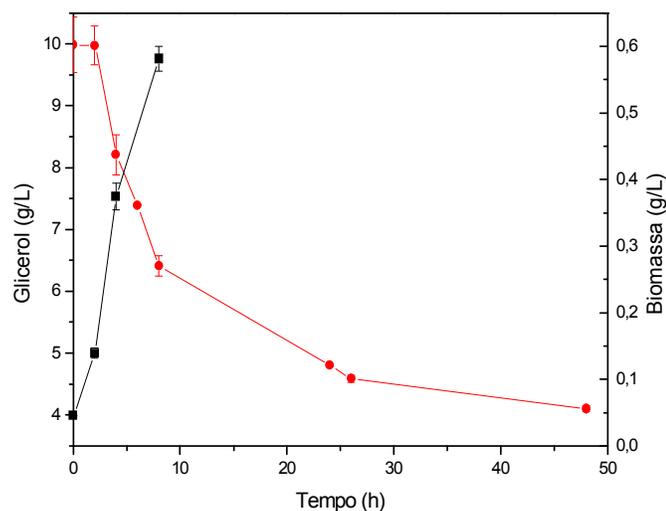


**Figura 4.15** – Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo utilizando 5 g/L de glicerol: (●) glicerol, (■) biomassa.

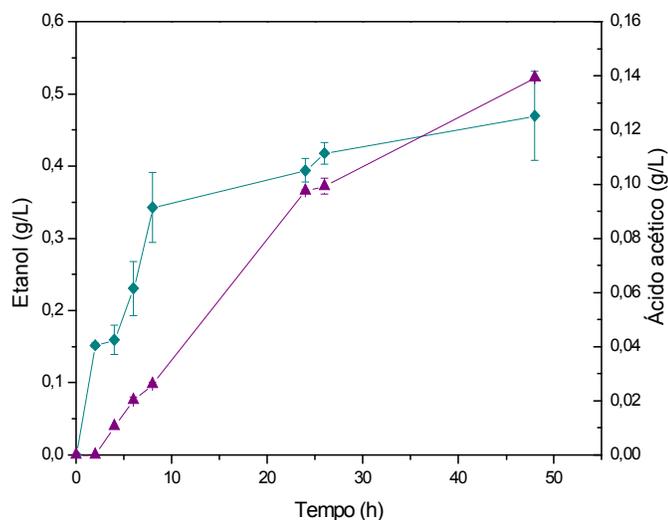


**Figura 4.16** – Concentração de etanol e ácido acético em função do tempo utilizando 5 g/L de glicerol: (◆) etanol, (▲) ácido acético.

As Figuras 4.17 e 4.18 mostram os resultados do processo fermentativo com adição ao meio de cultivo de 10 g/L de glicerol P.A. Assim, esta concentração foi escolhida para o ensaio com glicerol P.A., visando avaliar o comportamento da produção de etanol e ácido acético com um glicerol mais puro, devido o glicerol bruto apresentar diversos contaminantes vindo do processo de fabricação biodiesel, como apresentado na Tabela 4.1, a presença destes contaminantes poderia afetar o crescimento celular e a conversão nos produtos.



**Figura 4.17** – Concentração de glicerol e biomassa em função do tempo utilizando 10 g/L de glicerol P.A: (●) glicerol, (■) biomassa.



**Figura 4.18** – Concentração de etanol e ácido acético em função do tempo utilizando 10 g/L de glicerol P.A: (◆) etanol, (▲) ácido acético.

Pela análise das Figuras 4.17 e 4.18, pode-se verificar que ocorreu um bom consumo de glicerol, 6 g/L e uma produção máxima de etanol de aproximadamente 0,5 g/L. A produção de ácido acético se manteve constante com máxima produção de 0,14 g/L. Os

resultados desta fermentação não foram os pretendidos, visto que, como o glicerol era P.A. esperava-se produções maiores, já que a presença de contaminantes no meio de cultivo poderia reprimir o microrganismo. Este resultado foi interessante, pois foi visto que com o glicerol oriundo do biodiesel (glicerol bruto), nas mesmas condições operacionais, obteve-se uma melhor produção de etanol, o que mostra que não será necessário a implantação de etapas de up-stream para purificar o resíduo da indústria de biodiesel (glicerol bruto) para aproveitá-lo na produção de etanol. Este trabalho se mostrou promissor ao tentar tornar viável a produção de biodiesel em uma biorrefinaria, aproveitando cada subproduto dela formado.

## 5. CONCLUSÕES

Para esse trabalho foram testados dois tipos de microrganismos, uma levedura e uma bactéria, para verificar se eles seriam capazes de utilizar glicerol como substrato de processos fermentativos para produção de etanol.

A levedura *Saccharomyces sp.* 1238 não foi capaz de produzir quantidades viáveis de etanol utilizando glicerol como principal fonte de carbono. Já em experimentos utilizando glicose como fonte principal de carbono, a mesma obteve boa produção, esclarecendo, assim, que este microrganismo apresenta rota metabólica direcionada a assimilar mais facilmente glicose e não glicerol para realizar a conversão de glicerol a etanol.

Utilizando a bactéria *Escherichia coli* 224 ATCC 25922, foi observado que o consumo de glicerol mostrou um perfil semelhante para as diferentes concentrações do substrato estudadas, ressaltando porém, um aumento significativo na produção de etanol quando se utilizou glicerol na concentração de 10 g/L.

Com relação a produção de etanol utilizando *E. coli* observou-se que este foi produzido a partir de 8 h de cultivo nas fermentações com 10 g/L de glicerol bruto e nas fermentações com glicerol P.A. com 15 g/L e 20 g/L adicionados ao meio de cultivo.

A produção de ácido acético nos ensaios utilizando *E. coli*, apesar de iniciar nas primeiras horas da fermentação, foi baixa, com uma máxima de 0,15 g/L na fermentação utilizando 10 g/L de glicerol bruto.

Com glicerol na concentração inicial de 10 g/L, obteve-se a máxima produção de etanol, aproximadamente 0,9 g/L e 0,15 g/L de ácido acético em 24 h de fermentação, sendo maior do que o obtido pela fermentação quando foi utilizada com 10 g/L de glicerol P.A.

Dos microrganismos testados apenas a bactéria *Escherichia coli* 224 ATCC 25922 mostrou-se adequada ao objetivo desta pesquisa que foi tentar aproveitar o resíduo da indústria do biodiesel para produzir material de valor agregado e tornar a produção de biodiesel viável tanto econômica quanto ecologicamente .

## REFERÊNCIAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal Biotechnology. *International Microbiology*. v. 6, p. 191 – 199, 2003.

BALAT, M. Current alternative engine fuels. *Energy Sources*, v. 27, p. 569–77, 2005.

BALAT, M. Global bio-fuel processing and production trends. *Energy Explor Exploit*, v. 25, p. 195–218, 2007.

BARBIRATO F, BORIES A. Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions. *Res Microbiol.*, v. 148, p. 475–84, 1997.

BARBIRATO, F.; HIMMI, E. H.; CONTE, T.; BORIES, A. 1,3-Propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Ind. Crops. Prod.*, v. 7, p. 281–9, 1998.

BIEBL, H.; ZENG, A. P.; MENZEL, K.; DECKWER, W. D. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 50, p. 24–9, 1998.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* — batch and continuous culture studies. *J Ind Microbiol. Biotech.* v. 27, p. 18–26, 2001.

BRISSON, D.; VOHL, M. C; ST-PIERRE, J.; HUDSON, T. J.; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic process? *In: BioEssays* v.23, p.534-542, 2001.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Biores. Technol.*, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

CHANDRASENA, G.; WALKER, G. M. Use of response surface to investigate metal ion interaction in yeast fermentations. *J Am Soc Brew Chem*, v. 55, p. 24–29, 1997.

CHANG, Y. Z. D.; GERPEN, V. H. J.; LEE, I.; JOHNSON, A.L.; HAMMOND, G. E.; MARLEY, J. S. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 73, p. 1549, 1996.

COLIN, T.; BORIES, A.; LAVIGNE, C.; MOULIN, G. Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Curr Microbio.*, v. 43, p. 238–43, 2001.

DANIEL, R.; STUERTZ, K.; GOTTSCHALK, G. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. *J Bacteriol.*, v. 177, p. 4392–401, 1995.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.* v. 94, p. 821–829, 2006

DEMAIN, A. L.; SOLOMON, A.N., *Scientific. American.* p. 245, v. 67, 1981.

DEMIRBAS, F.; BOZBAS, K.; BALAT, M. Carbon dioxide emission trends and environmental problems in Turkey. *Energy Explor Exploit*, v. 22, p. 355–65, 2004.

DUARTE, A. Brasil é o quarto. *Rev. Biodiesel Br*, n. 13, p. 21, 2009.

DUARTE, A. Eliminando o NOx. *Rev. Biodiesel Br*, n. 13, p. 40-41, Out/Nov 2009.

DUARTE, A. Tecnologia do futuro. *Rev. Biodiesel Br*, n. 13, p. 12-14, Out/Nov 2009.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia, *Química Nova*, n. 28, v. 1, p. 19, 2005.

FLICKINGEE, M. C.; DREW, S. W. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation.* p. 2845, 1999.

FLORES, C. L; RODRÍGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, v.24, p. 507-529, 2000.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 63, p. 1375, 1986.

GAZZONI, D.L. *Etanol e emissões evitadas*. disponível em: <http://dlgazzoni.sites.uol.com.br/pagina33.htm>. Acessada em 2008

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* v. 23, p. 471-499, 2005.

GERPEN, J. V.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. *Biodiesel Analytical Methods*. 2004.

GONZALEZ, R.; MURARKA, A.; DHARMADI, Y.; YAZDANI, S.S. A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* v. 10, p. 234–245, 2008.

GOVINDASWAMY, S.; VANE, L. M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresource Technol.*, v. 98, p. 677–85, 2007.

HANSEN, A. C.; ZHANG, Q.; LYNE, P. W. L. Ethanol–diesel fuel blends-a review. *Bioresource Technol.*, v. 96, p. 277–85, 2005.

HIMMI, E. H.; BORIES, A.; BARBIRATO, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresour Technol.*, v. 67, p. 123–8, 1999.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J Biosci Bioeng* 2005;100:260–5.

Industrial Oil Products Program: IOP 3.1 – New Uses of Glycerol. Disponível em: <http://www.aocs.org/archives/am2006/session.cfm?session=IOP+3.1%3A+New+Uses+of+Glycerol>. Acesso em 26 de novembro de 2009.

JHONSON, D. T.; TACONI, K. A. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production, *Environ. Prog.*, v. 26, p. 338–348, 2007.

JONES, R. P.; GREENFIELD, P. F. A review of yeast ionic nutrition: growth and fermentation requirements. *Process Biochem*, v. 19, p. 48–66, 1984.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. Industrial biotransformations. A collection of processes. Weinheim: Wiley-VCH; 2000.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.* 1999;70:1–15.  
MACLEAN, H. L.; LAVE, L. B. Evaluating automobile fuel/propulsion system technologies. *Prog Ener Combust Sci*, v. 29, p. 1–69, 2003.

MAEDA, T.; SANCHEZ-TORRES, V.; WOOD, T.K. Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 77, p. 879–890, 2007.

MCCOY, M. *An unlikely impact*. Chem. Eng. News. v. 83, p. 24-26, 2005.

MCCOY, M. *Glycerin Surplus*. Chem. Eng. News. v. 84, 2006.

MORRISON, L. R. Glycerol. In: Encyclopedia of Chemical Technology. New York: Wiley, p. 921-932, 1994.

MURARKA, A.; DHARMADI, Y.; YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Fermentative utilization of glycerol in *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *App. Ejnviron. Mcrobiol.*, v. 74, p. 1124-1135, 2008.

MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D. J.; WANG, W.; XIU, Z. L. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.*, v. 28, p. 1755–9, 2006.

NETO, P. R. C.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, n. 23, v. 4, p. 531, 2000.

OLIVERIA, M. E. D.; VAUGHAN, B. E.; RYKIEL, J. R. E. J. Ethanol as fuel: energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint. *BioScience*, v. 55, p. 593–602, 2005.

PHAFF, H. J., Scientific. American. p. 245, v. 77, 1981.

Reel, M. Brazil's road to energy independence. The Washington Post 19 (2006)  
<http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2006/08/19/AR2006081900842.html>

ROCHA, M.; FREITAS, R. C. Metr opoles mais limpas. *Rev. Biodiesel Br*, n. 13, p. 30-39, Out/Nov 2009.

SABOURIN-PROVOST, G.; HALLENBECK, P. C. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation, *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 3513–3517, 2009.

G.F. Silva et al. / Application of response surface methodology for optimization of biodiesel production by transesterification of soybean oil with ethanol. *Fuel Processing Technology* 92 (2011) 407–413

SILVA G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology, *Biotechnol Adv.* 2008.

TALARICO, T. L.; AXELSSON, L. T.; NOVOTNY, J.; FIUZAT, M.; DOBROGOSZ, W. J. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. *Appl. Env. Microbiol.*, v. 56, p. 943–8, 1990.

WANG, Z. X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol Adv.*, v. 19, p. 201–23, 2001.

WANG; F. Q.; GAO, C.J.; YANG, C.Y.; XU, P. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnol Lett*, v. 29, p. 233–236, 2007.

YAZDANI. S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic Fermentation of Glycerol: A Path to Economic Viability for the Biofuels Industry. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 18, p. 213-219, 2007.

YAZDANI. S. S.; GONZALEZ, R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic Engineering*, v. 10, p. 340–351, 2008.

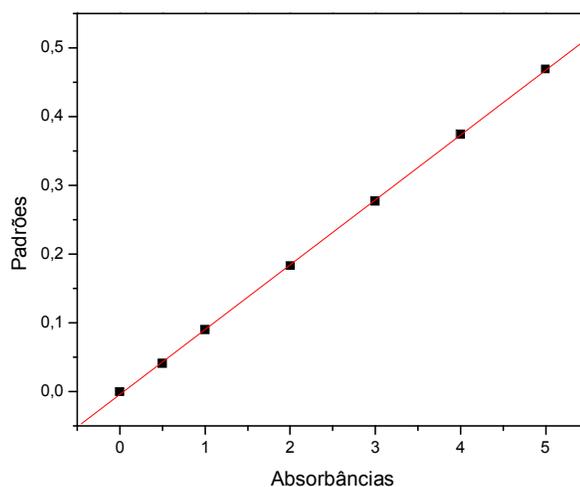
YU, J.; CORRIPIO, A. B.; HARRISON, O. P.; COPELAND, R. J. Analysis of the sorbent energy transfer system (SETS) for power generation and CO<sub>2</sub> capture. *Adv Environ*, v. 7, p. 335–45, 2003.

## ANEXOS

### A. Curvas Padrões utilizadas para as análises do glicerol

#### A.1. Curva padrão de fósforo

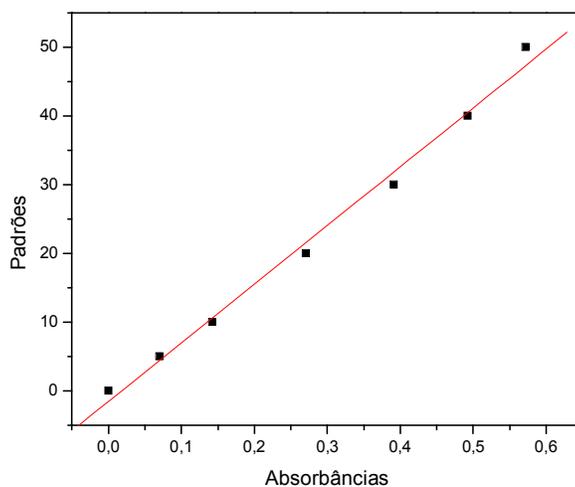
A curva de calibração foi preparada por diluição da solução padrão estoque de fósforo na concentração 1000 ppm. Dessa solução foram preparadas no mínimo sete padrões de solução com concentrações a partir de 0 até 5 mg/L. Destas foram transferidas 5 mL para erlenmeyers de 25 ou 50 mL e adicionados 10 mL da solução diluída de molibdato de amônio e uma pitada de ácido ascórbico sendo agitado em seguida. Após 30 minutos iniciou-se as leituras de absorbancia no comprimento de onda de 660 nm em espectrofotometro FEMTO modelo 600 Plus.



**Figura A.1** - Curva de calibração de Fósforo.

## A.2. Curva padrão de enxofre

A curva de calibração foi preparada por diluição da solução padrão estoque de enxofre na concentração 1000 ppm. Dessa solução foram preparadas no mínimo sete padrões de solução com concentrações a partir de 0 até 50 mg/L. Destas foram transferidas 10 mL para tubos de ensaio de 40 mL e a seguir adicionado 1 mL de uma solução de HCl 6,0 N contendo 20 mg/l de enxofre. Acrescentou-se cerca de 500mg de cloreto de bário. Após um minuto de repouso a amostra foi agitada em agitador de tubos por 30 segundos para completa dissolução do  $BaCl_2$ . A amostra permaneceu em repouso por 5 minutos, e a seguir realizou-se as leituras de absorbancia, em tempo máximo de 8 minutos, no comprimento de onda de 420 nm em espectrofotometro FEMTO modelo 600 Plus.

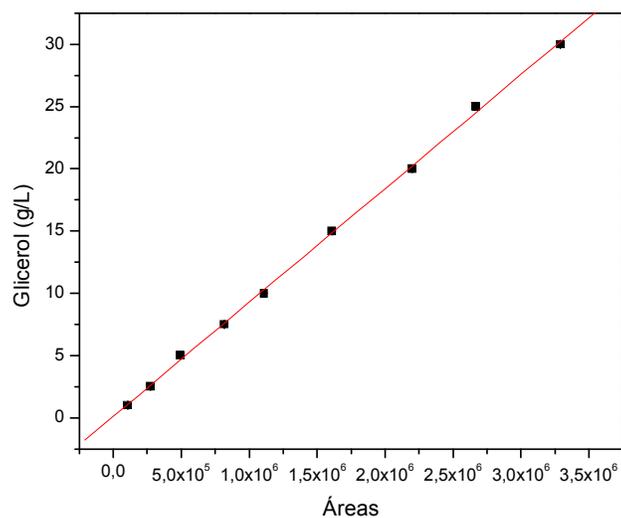


**Figura A.2** - Curva de calibração de enxofre.

## B. Curvas padrões utilizadas para as análises dos produtos das fermentações

### B.1. Curva padrão de glicerol

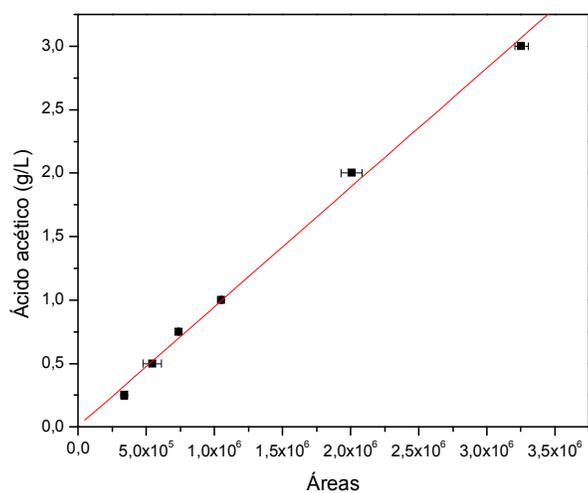
A curva padrão do glicerol foi preparada a partir de solução padrão de glicerol nas seguintes concentrações: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30 g/L. As concentrações estavam em duplicata, possibilitando o cálculo da média e do desvio padrão, para uma maior confiabilidade dos dados. As soluções-padrão foram preparadas por diluição de uma “solução mãe” de concentração 30 g/L e solubilizadas em água deionizada.



**Figura B.1** – Curva padrão de glicerol

## B.2. Curva padrão de ácido acético

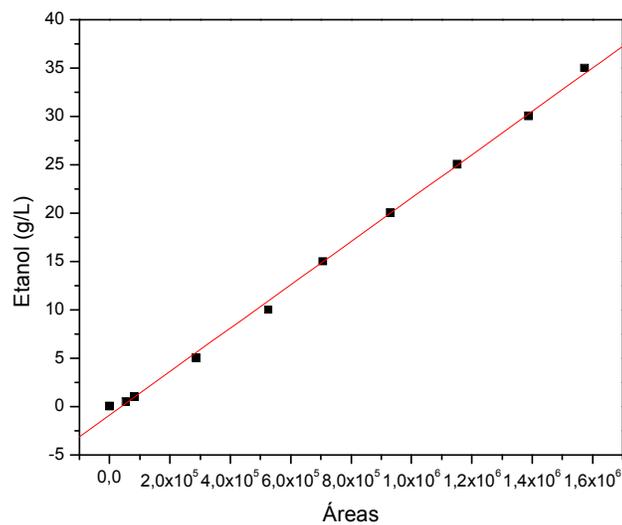
A curva de padrão do ácido acético foi preparada a partir da solução padrão de ácido acético nas seguintes concentrações: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0 g/L. As concentrações estavam em duplicata, possibilitando o cálculo da média e do desvio padrão. Estas foram preparadas por diluição de uma “solução mãe” de concentração 3 g/L. e solubilizadas em água deionizada.



**Figura B.2** – Curva padrão de ácido acético.

### B.3. Curva padrão de etanol

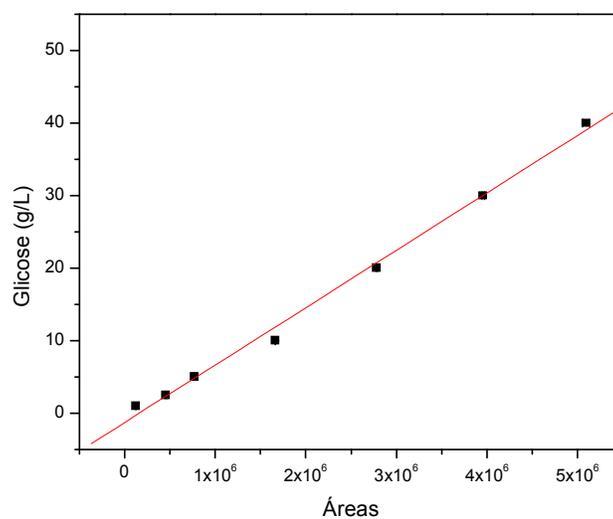
A curva de calibração do etanol foi preparada a partir da solução padrão de concentração 35 g/L, foram realizadas diluições nas seguintes concentrações: 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 g/L, preparadas em água deionizada. As concentrações estavam em duplicata, possibilitando o cálculo da média e do desvio padrão.



**Figura B.3** – Curva padrão de etanol.

#### B.4. Curva padrão de glicose

A curva de calibração de glicose foi preparada a partir da solução padrão de concentração 40 g/L, da qual foi realizada diluições nas seguintes concentrações: 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20; 30; 40 g/L. As concentrações estavam em duplicata, possibilitando o cálculo da média e do desvio padrão. As soluções padrões foram solubilizadas em água deionizada.



**Figura B.4** – Curva padrão de glicose.