



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Cinthyá Barbosa da Silva

**VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO GLICEROL
RESIDUAL DO BIODIESEL PARA PRODUÇÃO DE
BIOMASSA E LIPÍDEO UNICELULAR (SCO) POR
Mucor circinelloides UCP 050 ISOLADO DE
MANGUEZAL**

Recife
2014

Cinthya Barbosa da Silva

**VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO GLICEROL
RESIDUAL DO BIODIESEL PARA PRODUÇÃO DE
BIOMASSA E LIPÍDEO UNICELULAR (SCO) POR
Mucor circinelloides UCP 050 ISOLADO DE
MANGUEZAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Aline Elesbão do Nascimento

Co-orientador: Prof. Dr. Kaoru Okada

Recife

2014

S586v

Silva, Cinthya Barbosa da

Valorização biotecnológica do glicerol residual do biodiesel para a produção de biomassa e lipídeo unicelular (SCO) por *Mucor circinelloides* UCP 050 isolado de manguezal / Cinthya Barbosa da Silva ; orientador Aline Elesbão do Nascimento ; co-orientador Kaoru Okada, 2014.

126 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2014.

1. Biodiesel. 2. Glicerol. 3. *Mucor circinelloides*. 4. Biotecnologia.
I. Título.

CDU 574.6

**VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO GLICEROL RESIDUAL DO
BIODIESEL PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEO
UNICELULAR (SCO) POR *Mucor circinelloides* UCP 050 ISOLADO
DE MANGUEZAL**

Cinthy Barbosa da Silva

Examinadores:

Prof^ª. Dra Aline Elesbão do Nascimento

Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Orientadora

Prof^ª. Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^ª. Dra. Norma Buarque de Gusmão

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Defendida em 14 / 03 / 2014

Coordenadora: Prof^ª. Dr^ª. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

Dedico aos meus pais Ivone José da Silva e
Marcone Barbosa da Silva (in memoriam) e
a minha irmã Cibelly Barbosa de Araújo
pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela coragem, sabedoria e discernimento concedido. Aos meus familiares por toda paciência e compreensão nos momentos difíceis para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

À minha orientadora, Prof. Dra. Aline Elesbão do Nascimento e co-orientadora Prof. Dra. Kaoru Okada pelos ensinamentos transmitidos e a ajuda indispensável na construção e orientação deste trabalho.

A Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki pela oportunidade e infra-estrutura oferecida para a realização dos experimentos no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco.

Aos técnicos de laboratório, Severino Humberto de Almeida e André Felipe Santos Lima (UNICAP) pela contribuição na realização deste trabalho.

Ao querido meu amigo e incentivador Prof. M.Sc. Alúzio Jose Bezerra (UNICAP), por toda amizade, paciência, ensinamentos e força oferecidos durante esta etapa da minha vida, obrigada por tudo.

Aos meus amigos, que desde a graduação acompanharam minhas conquistas e meus momentos difíceis: Barbara Raquel, Felipe Marinho, Antônio Carlos e Victor Azevedo.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação da Universidade Católica de Pernambuco e Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco em especial, a Maria Helena Estevam, Layla Mahnke, José Henrique Freitas, Adriana Ferreira, Dafne Luana Ribeiro, Bruno Santos (UFPE), Deyvid Morais (UFPE), Marcos Luna, Manuela Lins (CETENE), Júlia Didier, Evandro Santos, Pedro Victor, Leocádio Júnior, Leonila Acioly e Grayce Kelly Barbosa pelos momentos de descontração.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	IX
CAPÍTULO 1	10
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.2 OBJETIVOS E METAS	13
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
1.3 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS	14
1.3.2 CADEIA PRODUTIVA DO BIODIESEL.....	17
1.3.3 PRODUÇÃO DE BIODIESEL	20
1.3.4 CO-PRODUTOS.....	23
1.3.5 VANTAGENS NO USO DO BIODIESEL	27
1.3.6 MERCADO DO BIODIESEL	27
1.3.7 O MERCADO DO BIODIESEL NO BRASIL	28
1.3.8 CO-PRODUTO: GLICEROL	30
1.3.9 GLICERINA RESIDUAL.....	32
1.3.10 APLICAÇÕES DA GLICERINA.....	33
1.3.11 CONVERSÃO MICROBIOLÓGICA DO GLICEROL	37
1.3.12 RESPOSTA OXIDATIVA	39
1.3.13 LIPÍDEOS PRODUZIDOS POR FUNGOS.....	46
1.3.14 REINO FUNGI	47
1.3.14.1 FUNGOS E BIOTECNOLOGIA.....	48

1.3.14.2 FILO ZYGOMYCOTA	49
1.4 REFERÊNCIAS.....	52
CAPÍTULO 2	66
ABSTRACT	67
1. INTRODUÇÃO	68
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3. EXPERIMENTAL.....	81
4. CONCLUSÕES	85
5. REFERÊNCIA	86
CAPÍTULO 3	95
CONCLUSÕES GERAIS.....	96
ANEXOS	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cadeia produtiva do Biodiesel.....	19
Figura 2. Processo geral de produção de Biodiesel	22
Figura 3. Produção de Biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais....	22
Figura 4. Matéria prima usada para a fabricação de Biodiesel.....	25
Figura 5. Estrutura química do glicerol.	30
Figura 6. Principais setores industriais que utilizam a glicerina.....	34
Figura 7. Metabolismo intermediário relacionado à síntese de lipídeos	38
Figura 8. Danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio	40
Figura 9. Mecanismo de ataque de EROs e os sistemas de defesa antioxidante. O símbolo □ refere-se aos mecanismos de produção de EROs e o símbolo △, às principais enzimas de defesas antioxidante.	41
Figura 10. Classificação dos antioxidante.	42
Figura 11. Lipoperoxidação ou peroxidação de lipídeos – LPO	44
Figura 12. Respostas celulares a diferentes graus de estresse oxidativo	45
Figura 13. Coloração do micélio de <i>Mucor circinelloides</i> com sudan black. A-C – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicose, 3 dias; D-F – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicose, 5 dias; G-I – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicerol comercial, 3 dias; J-L – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicerol comercial, 5 dias; M-O – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicerol residual, 3 dias; P-R – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicerol residual, 5 dias. X40.	71
Figura 14. Crescimento do <i>M. circinelloides</i> de acordo com o peso seco em glicose (w / v), glicerol comercial (v / v) e glicerol residual (v / v) a 2% (A), 4% (B) e 8% (C).	72
Figura 15. Atividade da enzima glutationa-S-transferase de <i>M. circinelloides</i> cultivado em diferentes concentrações de glicose (A), glicerol comercial -PA (B) e glicerol residual (C) durante 120 horas a 28 °C e 150 rpm.	76
Figura 16. A atividade da enzima superóxido dismutase de <i>M. circinelloides</i> cultivado em diferentes concentrações de glicose (A), glicerol comercial - PA (B) e glicerol residual (C) durante 120 horas a 28 °C e 150 rpm.	77

Figura 17. Comportamento da atividade da catalase de *M. circinelloides* cultivado em diferentes concentrações de glicose (A), glicerol comercial - PA (B) e glicerol residual durante 120 horas a 28 °C e 150 rpm.....78

Figura 18. Nível de peroxidação lipídica, em *Mucor circinelloides* cultivado em diferentes concentrações de glicose (A), glicerol PA (B) e de glicerol residual (C) durante 120 horas a 28 ° C e 150 rpm.78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de oleaginosas no território nacional para a produção de biodiesel	24
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do glicerol a 20°C	31
Tabela 3. Distribuição do consumo de glicerina nos diferentes setores industriais ..	32
Tabela 4. Redução do oxigênio a espécies reativas	39
Tabela 5. Biomassa e Produtividade lipídica de <i>Mucor circinelloides</i> cultivado em diferentes concentrações de glicose (w/v), glicerol comercial (v/v) e glicerol residual (v/v)	73
Tabela 6. Alterações na composição de ácidos graxos dos lipídeos totais de <i>Mucor circinelloides</i> cultivado em glicose (w/v), glicerol comercial (v/v) e glicerol residual (v/v)	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina Monofosfato
ANP	Agência Nacional de Petróleo
CAT	Catalase
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
Cu/Zn SOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DHA	Ácido Docosa-hexanóico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Adenosina dinucleotídeo
FAMEs	Ésteres Metílicos de ácidos graxos
FAEEs	Ésteres etílicos de ácidos graxos
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona-S-transferase
HC	Hidrocarboneto
IEA	International Energy Agency
INT	Instituto nacional de tecnologia
KOH	Hidróxido de potássio
MDA	Malondialdeído
NaOH	Hidróxido de sódio
NO _x	Óxidos de azoto
PNPB	Programa Nacional de uso e produção de biodiesel
PM	Partículas como a fuligem
PAF	Fator de agregação plaquetária
USP	United States pharmacopeia

RESUMO

O glicerol (também conhecido como glicerina) é um subproduto importante no processo de fabricação de biodiesel, representando cerca de 10% do subproduto formado na reação de transesterificação deste biocombustível. O custo de purificação deste subproduto é alto para que o mesmo seja inserido nas indústrias de alimentos, farmacêutica, e cosméticos. Dessa forma, vários métodos de eliminação e utilização deste glicerol residual têm sido tentados, incluindo combustão, compostagem, digestão anaeróbica, ração animal, bem como sua conversão biológica em produtos de valor agregado. Além disso, o estabelecimento de uma dinâmica de inovação tecnológica e desenvolvimento científico-tecnológico relacionadas à glicerina como uma possível matéria-prima para os processos biotecnológicos microbianos é de grande relevância. Nesse estudo foram avaliados os efeitos da glicerina residual do biodiesel sobre o crescimento, a morfologia, expressão de enzimas oxidativas; peroxidase, superóxido dismutase e glutathione-S-transferase, peroxidação de lipídeos, produção de lipídeos e perfil de ácidos graxos do fungo *Mucor circinelloides*. Os resultados revelam alterações em todos os parâmetros testados. A presença de glicerina no meio de cultura induz a um aumento de biomassa celular comparado ao crescimento em glicose e glicerol puro. O reaproveitamento do resíduo revela-se uma alternativa viável para minimizar o excesso de glicerina produzido para a produção de biomassa, lipídeos e enzimas antioxidantes, apontando o potencial industrial e biotecnológico do isolado. Além disso, da habilidade de utilização do subproduto, o fungo poderia ser utilizado como substrato para a produção de biodiesel.

Palavras-Chave: Biodiesel, Glicerol, *Mucor circinelloides*, Biotecnologia, enzimas

ABSTRACT

Glycerol (also known as glycerin) is an important by-product in the process of manufacture of biodiesel, corresponding to 10% of the by-product formed in the reaction of transesterificação of this biofuel. The purification costs of raw glycerol is high and disables its use in the industries of foods, drugs, and cosmetics. Thus, several methods of reuse of residual glycerol have been attempted, including combustion, anaerobic digestion, animal food, as well as its biological conversion in products of aggregate value. Moreover, the establishment of a dynamics of related technological innovation and scientific development to the glycerin as a possible raw material for the microbial biotechnological processes are of great importance. In this study the effects of the residual glycerin of biodiesel were evaluated on the growth, biomass production, morphology, oxidative enzymes: superoxide dismutase; glutathion-S-Transferase and catalase, lipid peroxidation, production of lipids and fatty acid of *Mucor circinelloides*. The results revealed alterations in all parameters tested. The glycerin presence in culture medium induced increase in cellular growth and biomass compared to growth in glucose and pure glycerol. The residue metabolization is a viable alternative for exceeding glycerin produced for production of biomass, lipids and antioxidant enzymes, pointing the industrial and biotechnological potential application of the isolate. Moreover, the ability of use of the by-product also can be applied as substrate for biodiesel production.

Keywords: Biodiesel, glycerol, *Mucor circinelloides*, biotechnology, enzymes.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Durante muitas décadas, o petróleo foi o grande propulsor da economia internacional. Contudo, impactos oriundos de seu uso em diferentes áreas, necessárias ao desenvolvimento e manutenção da sociedade humana, são visíveis e a partir daí a preocupação com essa fonte de energia não renovável e altamente poluidora cresceu ao longo dos últimos anos. A emissão de poluentes na atmosfera e o efeito estufa tornaram-se foco de pesquisas, revelando a necessidade pela busca por combustíveis alternativos, com menor potencial poluidor, e que podem apresentar inúmeros benefícios, como: sustentabilidade, redução dos gases do efeito estufa, desenvolvimento regional, social e agrícola (OLIVEIRA. et al., 2006; DEMIRBAS, 2007; UBRABIO, 2010).

Dentre as possibilidades de menor impacto surgem os biocombustíveis, com potencial de contribuição ao meio ambiente, reduzindo qualitativa e quantitativamente os níveis de poluição ambiental, além de representarem uma fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do petróleo. Neste contexto, destaca-se o biodiesel, combustível alternativo de queima limpa, produzido de recursos domésticos, renováveis. A facilidade de seu uso está associada a sua biodegradabilidade, além de não ser tóxico e essencialmente livre de compostos sulfurados e aromáticos, sendo considerado um combustível ecológico (ANP, 2005; MOTA, 2009; UBRABIO, 2010, APOLINÁRIO et al., 2012).

A crescente demanda de biodiesel tem ocasionado uma elevação na produção de co-produtos, como exemplo a glicerina, que pode ser utilizada em diferentes áreas industriais. Contudo, com a crescente demanda de aproximadamente 2,6 milhões de toneladas do biocombustível por ano, cerca de 300 mil toneladas é glicerina produzida (MOTA, 2009; SILVA, 2009; UBRABIO, 2010).

Considerando que a quantidade de glicerina residual produzida não é totalmente absorvida pelo mercado convencional da glicerina no mundo, seu excedente vem saturando o mercado, sendo sua oferta maior que a procura, levando assim a queda do preço desse subproduto e a estocada do mesmo sem

nenhum destino certo (SILVA, 2009). Aplicações biotecnológicas têm sido relatadas para a glicerina, permitindo sua valorização e obtenção de vários metabólitos com valor agregado, por exemplo, 1,3-propanodiol, etanol, ácidos orgânicos, biossurfactantes, carotenóides e butanol, produtos esses decorrentes da utilização do resíduo como substrato microbiano. Assim, a fermentação do glicerol permite, adicionalmente, a síntese de compostos com vasta gama de funcionalidades e de relevância comercial (FRANCO, 2012).

Paralelamente, numerosos estudos têm revelado a possibilidade de aumentar a produção de lipídeos no mercado mundial através do uso de microorganismos oleaginosos com a utilização de diferentes substratos, tais como glicerol industrial, lamas de esgoto, lamas de soro de leite, arroz e melado de cana de açúcar (ANGERBAUER, 2009).

Os microorganismos oleaginosos são definidos como aqueles que apresentam um conteúdo lipídico acima de 20%. Existem diversas variedades, tais como microalgas, bacilos, fungos e leveduras. Os teores de lipídios variam entre 16 a 77% para microalgas, valores superiores a 40% para bactérias, entre 50 a 70% para leveduras e entre 50 a 85% para fungos filamentosos. A busca por microorganismos com altos teores de lipídios, em particular de ácidos graxos saturados, torna-se um caminho promissor para a diminuição dos custos de produção do biodiesel, onde os fungos filamentosos surgem como uma favorável matéria-prima para uma indústria sustentável de biodiesel, por apresentarem maior versatilidade de crescimento (PENG e CHEN, 2008; PAPANIKOLAU e AGGELIS, 2009; MENG, X et al.; 2009)

O fungo filamentoso *Mucor circinelloides* pertencente ao Filo *Zygomycota*, Classe *Zygomycetes*, Ordem *Mucorales*, sendo considerado um microorganismo modelo por apresentar elevado potencial produtor de lipídeo, além de exibir potencial industrial e ambiental (XIA, 2011).

Desta feita, a presente proposta tem como meta a avaliação das potencialidades da bio-valorização do glicerol residual oriundo da produção de biodiesel, utilizando o isolado *Mucor circinelloides* para a produção de biomassa, ácidos graxos, e enzimas oxidativas, além de examinar os efeitos do resíduo sobre a bioquímica e estrutura celular.

1.2 Objetivos e Metas

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de conversão biológica da glicerina residual do biodiesel por *Mucor circinelloides* para a produção de metabólitos de interesse industrial e biotecnológico.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da glicerina residual no crescimento e na produção de biomassa;
- Determinar os efeitos da glicerina residual sobre a morfologia e acumulação de lipídeos do isolado;
- Avaliar o efeito do resíduo sobre a quantidade e acumulação de lipídeos produzidos;
- Caracterizar o perfil de ácidos graxos do isolado em função do cultivo em glicerina residual;
- Determinar o potencial do aproveitamento da glicerina pelo isolado na expressão de enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathion-S-transferase e peroxidação de lipídeos;
- Determinar o potencial de reaproveitamento da glicerina como fonte de carbono pelo isolado na produção de óleos de interesse industrial e biotecnológico.

1.3 Revisão de Literatura

1.3.1 Biocombustíveis

Ao longo da história, verifica-se que várias formas de energia têm provido as necessidades humanas. À medida que a população cresce aumenta o consumo de energia associado às novas tecnologias usadas pela humanidade. Quando se trata da matriz energética nacional e mundial, o petróleo é, sem dúvida, a principal matéria prima existente. Na década de 70 houve a crise do petróleo, afetando completamente a economia mundial. Com isso, os países importadores de petróleo começaram a explorar suas reservas e a investir em tecnologias de exploração na tentativa de evitar muitos impactos ambientais causados pelo produto (DELATORRE et al., 2011).

As preocupações ambientais levaram à assinatura do Protocolo de Quioto, que estabeleceu normas ou medidas, que buscam a redução das emissões de CO₂ (dióxido de carbono) e a consequente diminuição do efeito estufa. Mas, para que ocorresse essa diminuição era necessário um produto que fosse promissor e mais barato em relação ao do petróleo (VULTOS, 2012).

Além disso, as mudanças climáticas causadas pelo aquecimento da atmosfera e o esgotamento das reservas de petróleo, aliado a um desenvolvimento socioeconômico mais intenso, sobretudo nos países em desenvolvimento, têm incentivado a utilização de matérias primas renováveis, que possam substituir, ao menos, os combustíveis de origem fóssil como petróleo, carvão e gás natural (MOTA et al., 2009).

Com base no exposto, houve a necessidade de conceber e desenvolver fontes renováveis de energia para a gradual substituição dos combustíveis derivados do petróleo, pois além destes serem fontes esgotáveis apresentam um significativo impacto negativo na qualidade do meio ambiente e geração de resíduos tóxicos. Desta maneira, deu-se início à pesquisas visando a busca de combustíveis renováveis e alternativos, que apresentassem principalmente um caráter competitivo

com o petróleo para em seguida serem impulsionados de forma comercial e industrial (DELATORRE et al., 2011; APOLINÁRIO et al., 2012).

Assim, surgem os biocombustíveis, conceitualmente combustíveis líquidos ou gasosos, produzidos a partir de biomassa, e com possibilidades de aumentarem a segurança energética e o desempenho das políticas de desenvolvimento nos campos agrícola, social e energético, oriundos de matérias-primas renováveis (DABDOUB et al., 2009; MENDES et al., 2012; BRAGA et al., 2012).

Assim, o Biodiesel surge como uma alternativa aos combustíveis fósseis, sendo uma denominação genérica para combustíveis e aditivos derivados de fontes renováveis. Em comparação com diesel, o biodiesel apresenta particularidades relevantes do ponto de vista ambiental, sendo um composto biodegradável, renovável, com baixa toxicidade; baixa emissão de CO₂; emissão de hidrocarbonetos inferior ao diesel; menor índice de enxofre e constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e glicerol (DELATORRE et al., 2011; VIEIRA; 2011).

Por definição, o biodiesel é um substituto natural do diesel de petróleo, que pode ser produzido a partir de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais. Sob o aspecto químico, o biodiesel é um produto composto de ácidos graxos de cadeia longa, ligadas a um álcool, sendo definido como éster monoalquílico de ácidos graxos derivados de lipídeos de ocorrência natural (DELATORRE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

Tal combustível é utilizado para substituição do óleo diesel, em percentuais adicionados no óleo diesel ou integral, nos motores à combustão de transportes rodoviários e aquaviários e nos motores utilizados para a geração de energia elétrica (MENDES et al., 2012; BRAGA et al., 2012).

Desde a década de 70, com o lançamento do Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL), o Brasil acumulou uma experiência longa e diversificada no âmbito da produção de biocombustíveis, sendo considerado o país com maior experiência mundial na exploração comercial de biomassa como fonte energética. Diante disso, a utilização de óleo vegetal ao invés de óleo diesel foi colocada em questão, pois estes óleos poluem menos (DELATORRE et al., 2011; BRAGA et al., 2012).

Na seqüência, a elaboração do Programa Nacional de Uso e Produção de Biodiesel (PNPB/2005) foi uma iniciativa inovadora para fomentar a produção e uso desse combustível no país. Não se trata apenas de uma fonte alternativa de energia, mas também como uma oportunidade para a geração de emprego e renda no campo. O biodiesel pode ser usado puro ou misturado ao diesel em diversas proporções. Entre os anos de 2005 e 2010, foram investidos cerca de R\$ 4 bilhões na indústria do biodiesel e criados 1,3 milhões de empregos. Desta forma, para realizar a adoção de 20% da mistura do biodiesel até 2020, seriam criados 532 mil empregos diretos e 6 milhões de ocupações indiretas. Os benefícios gerados pelo PNPB são bastante amplos e muitas vezes avaliados sob uma ótica excessivamente estreita, não abrangendo todo o seu alcance mercadológico, social, ambiental e tecnológico, conforme previsto nas diretrizes do programa (ANP, 2005; UBRABIO, 2010).

O Brasil tem um grande destaque mundial relacionado ao panorama do biodiesel por sua grande variedade em grãos, de onde é extraído o óleo vegetal, e uma extensa criação de bovinos, que fornecem gordura animal ou sebo. A Transesterificação é um dos processos mais comuns para converter triglicerídeos em biodiesel através da modificação de um éster carboxílico e um álcool na presença ou não de um catalisador produzindo ésteres monoalquílicos de ácidos graxos e glicerol (DABDOUB et al., 2009).

Além disso, a criação do Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel (PROBIODIESEL) permitirá a substituição gradativa do diesel oriundo do petróleo pelo biodiesel. (GONÇALVES et.al., 2012), acelerando a produção e a comercialização do combustível (BILGEN et al., 2006).

Atualmente, o Brasil é um país em evidência na utilização de biomassa para produção alternativa de combustíveis, com a aplicação do bagaço de cana-de-açúcar, de resíduos florestais e dejetos de animais. Além disso, varias espécies de oleaginosas, tais como mamona, dendê, girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso e soja vêm tomando o mercado brasileiro para a produção de biodiesel. Por outro lado, outras matérias primas foram descobertas com grande potencial para a produção de biodiesel no que consiste de óleos e gorduras residuais, resultantes de processamento doméstico, comercial e industrial (DELATORRE et al., 2011).

No Brasil, mesmo com todas as vantagens que o biodiesel possui seu custo de produção ainda é alto, pois o valor elevado do óleo virgem torna o biodiesel pouco competitivo com o diesel fóssil. Isso se deve à dificuldade de implementação do preço do óleo diesel mineral, que apresenta um valor muito baixo em relação aos outros derivados do petróleo. Desta forma, uma alternativa viável seria a fabricação de biodiesel a partir de óleos usados e gorduras animais. Sendo assim, a principal motivação de programas de produção de bioenergia são os aspectos ambientais e os econômicos visando minimizar a importação do petróleo e melhorar o desenvolvimento sustentável e o uso de recursos renováveis (MOTA et al., 2009; DELATORRE et al., 2011; BRAGA et al., 2012).

A peculiaridade de ser renovável torna o biodiesel uma fonte importantíssima de energia de longo prazo. Países como Argentina, Estados Unidos, Malásia, Alemanha, França e Itália já produzem biodiesel comercialmente, estimulando cada vez mais seu desenvolvimento em escala industrial. Por exemplo, a União Européia produz anualmente mais de 1,35 milhões de toneladas de biodiesel. Isso corresponde a 90% da produção mundial do combustível. O governo assegura um incentivo fiscal aos produtores, além de promover leis específicas para o produto, com o objetivo da melhoria das condições ambientais através da utilização de fontes de energia limpa (LÔBO et al., 2009). No mercado internacional, o biodiesel produzido tem sido usado em veículos de passeio, transporte de estrada, transporte público e geração de eletricidade (RIVALDI et al., 2008)

1.3.2 Cadeia Produtiva do Biodiesel

O Biodiesel consiste, no resultado da esterificação de óleos e da posterior transesterificação dos ésteres, tendo esta reação sido descoberta por E. Duffy e J. Patrik no ano de 1853, ou seja, foi descoberto anteriormente à invenção do motor diesel por parte de Rudolf Diesel (VULTOS, 2012).

O primeiro registro do motor a diesel que teve resultados satisfatórios data de 10 de agosto de 1893, em Augsburg, Alemanha, por Rudolf Christian Karl Diesel (1853-1913), através do óleo de amendoim, que consistia em um tipo de

biocombustível obtido pelo processo de transesterificação. (POUSA, et al.,2007; VULTOS; 2012; MURUGESAN et al., 2009).

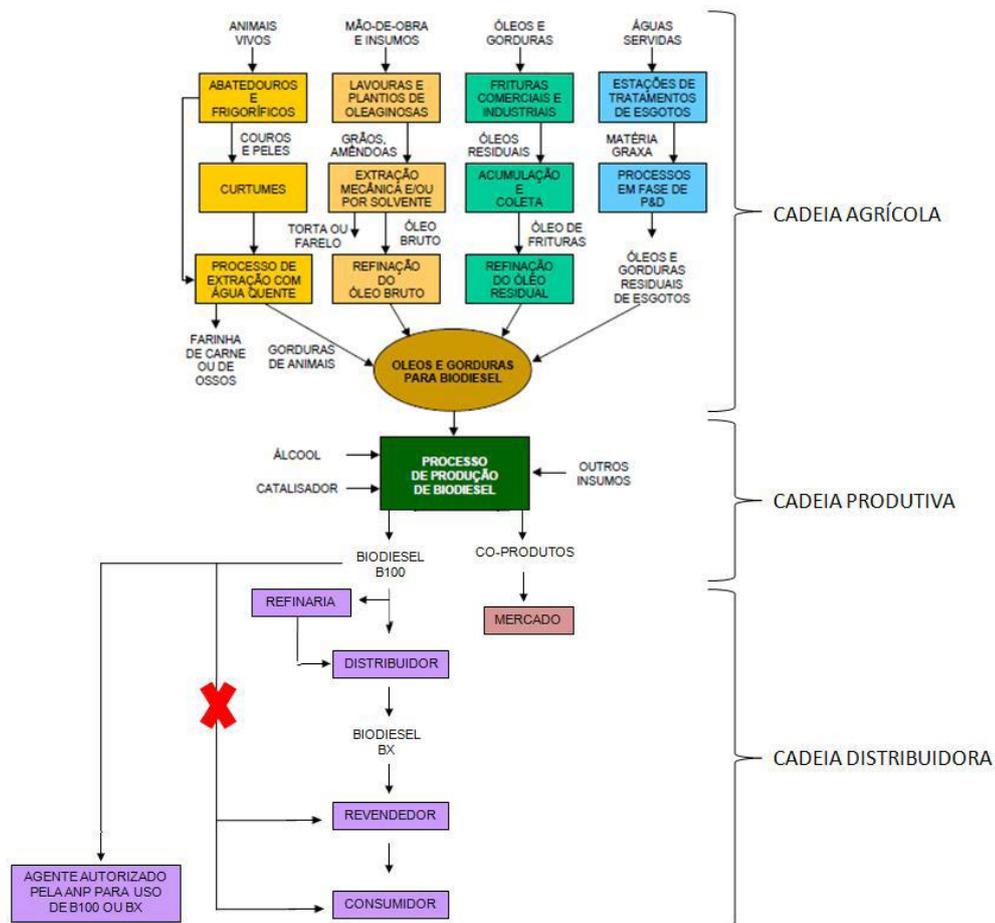
Com o falecimento de Rudolf Diesel, o motor a diesel passou a ser capitalizado pela indústria do petróleo, que através de vários processos originou um tipo de óleo mais grosso e sujo, que tinha um valor mais baixo que todos os outros combustíveis, sendo denominado de “óleo diesel”, o que com o passar dos anos, resultou na extinção do interesse pelos óleos vegetais, como principal fonte de combustível. Na década de 40, do século XX, o processo de transesterificação acabaria por chamar a atenção de pesquisadores norte-americanos, que tentavam encontrar uma forma mais hábil de produzir glicerina, que permitisse continuar a sustentar a alimentação de bombas, fundamentais para o teatro de guerra (VULTOS, 2012).

O óleo vegetal transesterificado foi utilizado pela primeira vez, antes da Segunda Guerra Mundial, para abastecer os veículos da África do Sul. Já no Brasil, o pioneiro pelo uso de biocombustíveis foi o Conde Francisco de Matarazzo, que na década de 60, com as Indústrias “Matarazzo” deu início à tentativa de produção de óleo a partir de grãos de café. Ao utilizar o álcool proveniente da cana-de-açúcar para lavar o café, foi obtida uma reação com conseqüente liberação de glicerina, resultando em éster etílico, mais conhecido nos dias de hoje como Biodiesel (VULTOS, 2012).

Na década de 20 no Brasil, o Instituto Nacional de Tecnologia (INT) estudava e testava combustíveis alternativos e renováveis a partir da palma, algodão e amendoim. Em 1970, a Universidade Federal do Ceará-UFCE desenvolveu pesquisas sobre fontes alternativas de energia, que culminaram com a revelação de um novo combustível: o biodiesel. Já na década de 80 tem-se o registro da primeira patente mundial do biodiesel obtida pelo Professor Exedito Parente da UFCE– Patente “PI-8007959” (SANTOS, 2011).

A figura 1 apresenta a cadeia produtiva do biodiesel, englobando as peculiaridades das cadeias agrícola, produtiva e distribuidora do combustível.

Figura 1. Cadeia produtiva do Biodiesel



Fonte: (ANP, 2008)

O nome biodiesel foi introduzido nos Estados Unidos, em 1992, pela National Soy Diesel Development Board que foi a pioneira na comercialização de biodiesel nos EUA. Esse biocombustível pode ser produzido por meio de três processos diferentes: o craqueamento, a esterificação e a transesterificação (VIEIRA, 2011).

Em 2004 foi lançado o Programa Brasileiro de Produção e Uso do Biodiesel – PNPB, onde foram se sucedendo edições de Leis, atos normativos e regulamentos que em um todo formam o arcabouço legal que norteia as iniciativas do biodiesel no país. Em janeiro de 2005 foi publicada a Lei nº 11.097, dispondo sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Com essa publicação a Agência Nacional do Petróleo assumiu a atribuição de regular e fiscalizar as atividades relativas ao biodiesel (SANTOS, 2011).

Entre os anos 2008 e 2009 foi determinada a obrigatoriedade da mistura de 2% de biodiesel no diesel comercial. Em junho de 2008 foi autorizado o aumento para 3% (De acordo com a resolução nº 2 do Conselho Nacional de Política Energética - CNPE). Já em julho de 2009 entrou em vigor a adição de 4% de biodiesel. E em 2010, a resolução CNPE, nº 6/2009, permitiu a adição de 5% de biodiesel no diesel, publicado no Diário Oficial de 18 de fevereiro de 2009 (SANTOS, 2011).

1.3.3 Produção de Biodiesel

No processo reacional, as ligações das moléculas dos lipídios vegetais são quebradas liberando três ácidos graxos livres que por sua vez reagem com o álcool formando ésteres de ácido graxo. A mistura separa-se em duas fases, a glicerina na parte inferior e o biodiesel, na superior (DELATORRE et al., 2011; VALDEZ et al., 2012; MARTINS, 2012).

A reação é um equilíbrio, e a transformação ocorre essencialmente pela mistura dos reagentes. Porém, a presença de um catalisador acelera consideravelmente o processo reacional. Os catalisadores primordialmente utilizados são bases ou ácidos fortes. Com o intuito de aumentar o rendimento de ésteres, o álcool é adicionado em excesso (DELATORRE et al., 2011; VALDEZ et al., 2012, MARTINS, 2012). No processo industrial, após a separação das fases o excesso de álcool é recuperado tanto do Biodiesel quanto da glicerina.

As fases seguem para posteriores etapas de purificação. O glicerol é removido dos alquil ésteres por decantação ou centrifugação devido à baixa solubilidade do glicerol em ésteres. Alcoóis podem agir como co-solventes aumentando a solubilidade do glicerol no Biodiesel, o que torna a separação mais lenta. Contudo, o excesso de álcool normalmente não é retirado até que as fases estejam separadas para evitar a reversão da reação de transesterificação (DELATORRE et al., 2011; VALDEZ et al., 2012; MARTINS, 2012).

Diferentes tipos de catalisadores podem ser usados. Dentre os mais estudados estão hidróxidos e alcóxidos de metais alcalinos, ácidos de Bronsted, bases orgânicas, enzimas hidrolíticas e polímeros contendo guanidina imobilizada. No entanto, nos processos produtivos industriais a transesterificação por catálise

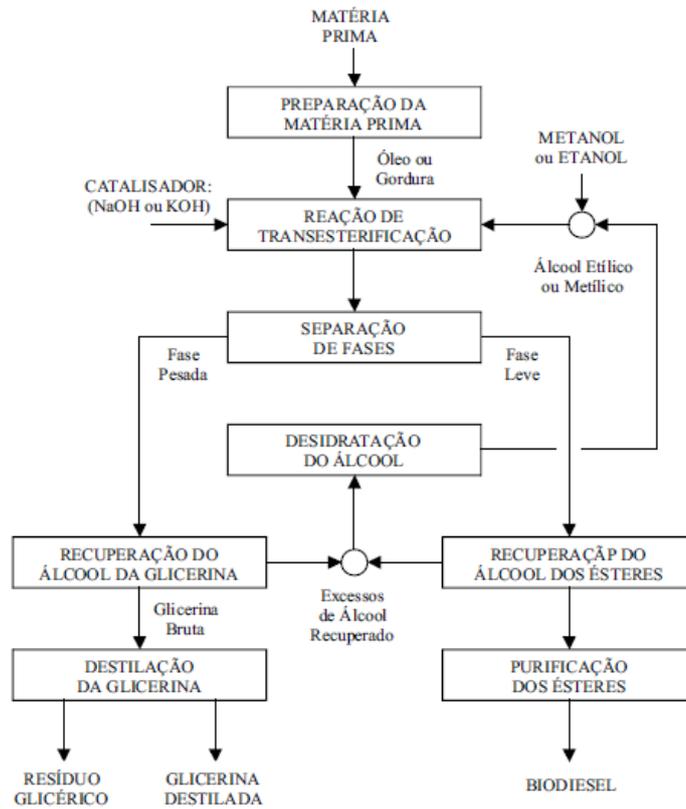
alcalina é a utilizada. Embora a reação ocorra na ausência de catalisadores, o seu uso se deve a razões econômicas. O processo sem a adição de catalisador ocorre muito lentamente, então é necessária grande quantidade de energia para aquecimento. A vantagem seria a obtenção de ésteres puros e glicerina livre de sabão (RINALDI et al., 2007; DELATORRE et al., 2011; VALDEZ et al., 2012; MARTINS, 2012).

A transesterificação com catalisadores ácidos, apesar de resultar em um alto rendimento de ésteres, necessita de temperaturas acima dos 100°C e mais de 3 horas para completa conversão da matéria-prima. O processo por catálise alcalina é mais rápido e esses compostos são menos corrosivos que os ácidos. Entretanto, mesmo que o processo ocorra em meio anidro, água será produzida no sistema pela reação do hidróxido com o álcool. Por sua vez, a água presente leva à hidrólise de alguns ésteres produzidos com consequente formação de sabão devido à presença de base forte no meio. Pode ocorrer saponificação dos ésteres (Biodiesel) ou dos próprios triacilgliceróis através de hidrólise básica. A reação de saponificação decorrente diminui consideravelmente o rendimento de ésteres e dificulta a recuperação do glicerol devido à formação de emulsão. Contudo, a catálise em meio alcalino é mais rápida, simples e mais eficiente, e é a escolha para a produção industrial de Biodiesel (DELATORRE et al., 2011; VALDEZ et al., 2012; MARTINS, 2012). Os hidróxidos de metais alcalinos, em especial Hidróxido de Potássio (KOH) e Hidróxido de Sódio (NaOH) são os mais utilizados devido ao baixo preço e fácil disponibilidade.

Para reduzir o sabão gerado, recomenda-se conduzir a reação de transesterificação utilizando matérias-primas (triacilgliceróis) com baixo conteúdo em ácidos graxos livres e água, e ao mesmo tempo reduzir a quantidade de catalisador no processo. O uso de alcoóxidos também leva à produção de glicerol com maior grau de pureza, pois nesse caso não há a formação de água ou sabão (DELATORRE et al., 2011; VALDEZ et al., 2012; MARTINS, 2012). Os alcoóis utilizados na reação de transesterificação para produção de Biodiesel são primordialmente metanol ou etanol, e respectivamente serão obtidos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs) ou ésteres etílicos de ácido graxos (FAEEs) (DELATORRE et al., 2011; VALDEZ et al., 2012; MARTINS, 2012).

De maneira geral, o processo de reações para a produção do Biodiesel, desde a matéria-prima, está esquematizado na Figura 2.

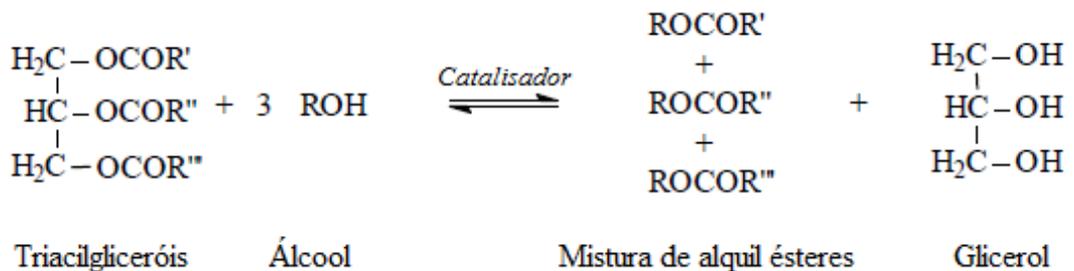
Figura 2. Processo geral de produção de Biodiesel



(Fonte: SÁ PARENTE, 2003)

A reação de produção de biodiesel por transesterificação está apresentada na figura 3.

Figura 3. Produção de Biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais.



Fonte : (SCHUCHARDT et al., 1998; SILVA, 2010).

Desta forma, a composição mais comum do Biodiesel é de FAMES, principalmente devido ao fato que o metanol é mais barato que o etanol na maioria dos países, o que não é o caso do Brasil, onde os ésteres etílicos são usados como combustível. A transesterificação metílica apresenta maior rendimento que a etílica uma vez que o metanol é mais reativo que o etanol. Além disso, os ésteres metílicos são mais facilmente separados da glicerina por serem menos miscíveis nesta que os ésteres metílicos (DELATORRE et al., 2011; VALDEZ et al., 2012, MARTINS, 2012).

1.3.4 Co-produtos

A transesterificação consiste de uma série de reações consecutivas e reversíveis. Após esta reação são formadas duas fases líquidas: a superior, composta principalmente pelos ésteres monoalquílicos (Biodiesel) e a fase mais densa, cuja maior proporção é de glicerol. Além dos ésteres e do glicerol, também podem ser formados ao final do processo, tri, di e monoacilgliceróis, que não sofreram reações, por causa do excesso de catalisador (álcool). Já o sabão é formado quando há presença de muitos ácidos graxos livres na matéria-prima. Esses últimos reagem com o metal do catalisador alcalino usado formando sabão e água. O glicerol é o principal co-produto da reação de transesterificação de triglicilgliceróis para a produção de Biodiesel, sendo que 10% do peso de Biodiesel produzido correspondem a glicerol (OOI et al., 2004; FERRARI et al., 2005; GERPEN, 2005; RIVALDI et al., 2007; GOMES et al., 2010; KNOTHE, 2010; HASHEMINEJAD et al., 2011).

O resíduo bruto é um líquido viscoso, pardo e escuro, que apresenta quantidades variáveis de sabão, devido à presença de água ou ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, álcool e catalisador usados durante o processo, o que lhe confere baixo custo (OOI et al., 2004; KNOTHE et al., 2005; RIVALDI et al., 2007; HASHEMINEJAD et al., 2011). O aspecto do glicerol bruto está relacionado ao conteúdo de sabão presente, o que garante a aparência de viscoso e escuro (OOI et al., 2004).

A glicerina bruta, mesmo contendo impurezas, constitui-se um subproduto que pode ser comercializado. No entanto, o mercado é muito mais favorável à comercialização da glicerina purificada. Essa purificação pode ser feita por

destilação a vácuo, resultando em um produto límpido e transparente, denominado comercialmente de glicerina destilada. O produto da calda da destilação, ajustável na faixa de 10 - 15% da massa da glicerina bruta, é denominado “glicerina residual”, que encontra possíveis aplicações importantes (ARRUDA et al., 2007).

No Brasil, matérias-primas vegetais derivadas de óleos vegetais tais como soja, mamona, canola, palma, girassol e amendoim, entre outros, e as de origem animal, obtidas de sebo bovino, suíno e de aves, além de óleos utilizados em fritura (cocção) são utilizados para a produção do biodiesel. Cada região no país possui diversas espécies oleaginosas, permitindo a realização de pesquisas relacionadas ao seu potencial para produção de biodiesel. Na tabela 1 estão apresentadas as diferentes oleaginosas do Brasil com potencial aplicação na produção de biodiesel (ZHANG et al., 2003; LI, 2006; PUTTI et al., 2012).

Tabela 1. Distribuição de oleaginosas no território nacional para a produção de biodiesel

Região	Óleos Vegetais disponíveis
Norte	dendê, babaçu e soja
Nordeste	babaçu, soja, mamona, dendê, algodão e coco
Centro-Oeste	soja, mamona, algodão, girassol, dendê e gordura animal
Sudeste	soja, mamona, algodão, girassol
Sul	soja, milho, canola, girassol e algodão

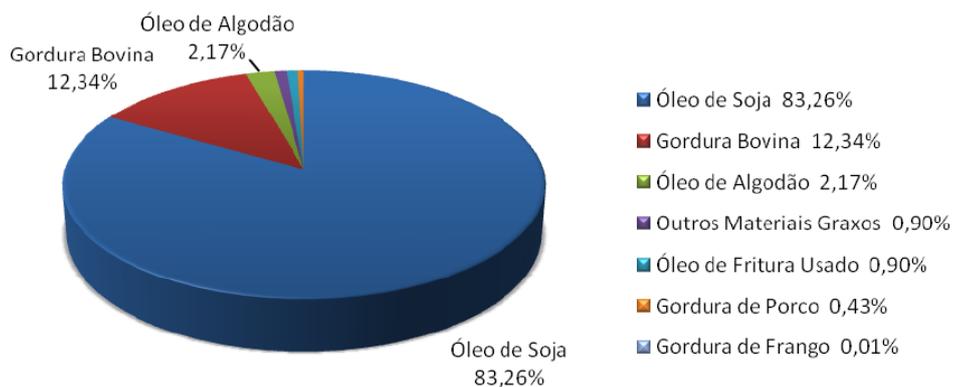
Fonte: DELATORRE; 2011

Assim, o Brasil ganha destaque por ser um país com um potencial produtor e explorador de biomassa para diversos fins como o alimentício, o químico e o energético, minimizando a emissão de gases poluentes nos centros urbanos (YAZDANI, GONZALEZ, 2007; DELATORRE et al., 2011). Além disso, para viabilizar a produção do biodiesel, o governo tem reduzido as alíquotas de tributos (Cide, IPI, Pis/Pasep, Cofins), e disponibilizado crédito com menor custo financeiro para que os produtores utilizem diversas matérias primas para produção do biodiesel, visando

criar melhores condições para a efetivação da reação química (DELATORRE et al., 2011).

Além disso, com a finalidade de valorizar as potencialidades regionais e de desenvolver a agricultura familiar em locais onde o subdesenvolvimento é crítico, e gerar alternativas de empregos em áreas pouco atrativas para as demais atividades econômicas, a diversificação das matérias primas utilizadas para a produção do biodiesel ganha relativa importância. A figura 4 apresenta os tipos de matérias primas utilizadas no Brasil (MARTINS, 2012).

Figura 4. Matéria prima usada para a fabricação de Biodiesel.



Fonte: MARTINS; 2012

Com a melhoria de crédito para os produtores em 2010, o Brasil se tornou o segundo maior produtor de biodiesel do mundo perdendo apenas para a Alemanha. Já em 2011 passou a ser o maior consumidor do combustível entre todos os países. Por consequência do aumento no consumo do biodiesel, em algumas capitais do Brasil já é utilizado até mesmo o B20 (MARTINS, 2012).

Apesar de todas as vantagens e do grande avanço do biodiesel no Brasil, muitas indústrias adquirem sua matéria-prima de agricultores familiares, desta forma o governo criou o selo combustível social, que concede aos produtores em escala industrial isenções fiscais e acesso a melhores condições de financiamento. Dessa

forma, uma maior expansão da oferta, baseada na melhoria da tecnologia agrícola, acarreta o barateamento do óleo vegetal, que é o principal componente dentro do custo do biodiesel. Mas, para uma maior eficiência existe outro fator que é a possibilidade de uma redução dos custos de produção de biodiesel por meio do aproveitamento de seus subprodutos (MARTINS, 2012).

Como exemplo para a produção de biodiesel, no setor agroindustrial, a empresa Fertibom, possui sua própria tecnologia de produção proveniente de matérias primas variadas e um banco de dados com mais de três mil formulações de biocombustível. A empresa apresenta uma capacidade de produção anual superior a 120 milhões de litros. Outro exemplo é a JSB Biodiesel com uma capacidade de produção, tanto a partir de óleos vegetais quanto de gordura animal, de 201,6 milhões de litros por ano (MARTINS, 2012).

Em 2012 o maior produtor mundial de biodiesel é a Alemanha, que possui cerca de 2000 postos de venda de biodiesel, onde uma mesma bomba contém dois bicos, um para o petrodiesel e outro com o biodiesel, desta forma distribuindo o B100, biodiesel sem qualquer mistura ou aditivos e que também é aproximadamente 12% mais barato em relação ao petrodiesel (MARTINS, 2012).

Dessa forma, os usuários podem misturar nas mais diversas proporções, este biocombustível com o diesel comum. Com o objetivo de reduzir os poluentes na atmosfera e fazer uso do B100, montadoras automobilísticas adaptaram seus veículos para receber esse biocombustível, associando isso a questões fiscais, legais e ambientais. Outros países ainda estão em processo de adaptação para o uso do biodiesel como, por exemplo, a França, que atualmente utiliza a mistura B30 em frotas de transportes públicos, já a Áustria, utiliza o B100 em transportes públicos. A União Europeia, por exemplo, estabeleceu como meta, até 2020, que 20% da energia consumida deverá provir de fontes renováveis, sendo que, desse total, 10% sejam voltados especificamente para o setor de transportes, o que inclui a utilização de biocombustíveis (MARTINS, 2012).

1.3.5 Vantagens no uso do biodiesel

Todo produto, incluindo combustíveis, tem vantagens e desvantagens relacionadas com o custo de produção, implementação e também com as emissões de poluentes na atmosfera.

Uma das principais vantagens do biodiesel é a sua capacidade de redução em cerca de 90% das emissões de poluentes como o dióxido de carbono, 98% de enxofre e possibilita também a criação de empregos após e durante a sua produção. O biodiesel apresenta diferentes valores de emissão de poluentes na atmosfera de acordo com a sua percentagem de utilização juntamente com o gasóleo, sendo que as emissões de CO (monóxido de carbono), HC (hidrocarbonetos), PM (partículas como a fuligem) diminuem com o aumento da percentagem de biodiesel, por outro lado, aumenta as emissões de NOx (óxidos de azoto) devido à combustão do biodiesel nos motores (VULTOS, 2012).

Além de colaborar com a diminuição de poluentes atmosféricos o biodiesel é responsável pelo auxílio à diminuição do êxodo rural promovendo o desenvolvimento da agricultura em zonas rurais mais desfavorecidas, dando origem ao aumento da mão de obra e evitando assim a desertificação humana (VULTOS, 2012).

Para as águas subterrâneas e solo em caso de algum acidente, o biodiesel não representa uma ameaça, na medida em que, é classificado como um combustível biodegradável e seguro. Pois em caso de acidente esse biocombustível para explodir precisa de uma fonte de calor acima dos 150°C, apresentando um risco de explosão baixo, facilitando o seu transporte e armazenamento (VULTOS, 2012).

1.3.6 Mercado do Biodiesel

As projeções mundiais previstas para 2020, para a produção de biodiesel, pela IEA – International Energy Agency apontam uma crescente substituição para as fontes de combustível de origem fóssil pelas fontes de energia renováveis, dentre elas a cana-de-açúcar e o milho para a produção de etanol e as derivadas dos óleos vegetais de canola, de soja, de mamona, entre outros, para a produção de biodiesel (DABDOUD et al., 2009; BEATRIZ et al., 2011; MENDES et al., 2012).

Devido ao aumento de preço do petróleo, o mercado de produtos referente aos biocombustíveis obteve crescentes perspectivas de consumo para os próximos anos relacionando também a diminuição das agressões ao meio ambiente. Dessa forma, o mundo todo tem como foco principal o aumento da produção desses biocombustíveis onde o etanol, serve para uso em automóveis, e o biodiesel para caminhões, ônibus, tratores, transportes marítimos, e em motores estacionários para a produção de energia elétrica, nos quais o óleo diesel é o combustível mais empregado (BRAGA et al., 2012).

A União Européia e os Estados Unidos são os detentores das maiores capacidades de produção no mundo. A União Européia produz biodiesel em escala industrial desde 1992. Onde consta em seu acervo 120 plantas industriais, com uma produção de aproximadamente 6 milhões de toneladas métricas (QUINTELHA et al., 2009).

Em 2006 a Alemanha foi responsável por 44% da produção de biodiesel da União Européia, seguida da Itália com 14% e da França com 13%. A principal matéria-prima utilizada para o processamento de biodiesel europeu é a canola, em menores dimensões, estão os óleos de soja, de palma e de girassol. Essas plantas são encontradas na Alemanha, na França, na Itália, na Áustria e na Suécia (QUINTELHA et al., 2009; BRAGA et al., 2012).

Muitos são os países relacionados com a produção de biocombustíveis, os quais dispõem de programas que estimulam o uso e a produção do biodiesel. Os programas incluem discussão sobre medidas de apoio à implantação das indústrias, auxílios para os agricultores, isenção de impostos e percentuais escalonados para a mistura do biodiesel ao óleo diesel (QUINTELHA et al., 2009).

1.3.7 O mercado do biodiesel no Brasil

Conforme o art. 4^a da Lei nº 11.097/2005, que modificou o art. 6^o, XXV da Lei nº9.478/97, o biodiesel é um *“combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”*. Adicionalmente, estima que todos os veículos de transporte de cargas do Brasil serão obrigados a usar o combustível conhecido como B5, ou seja, uma

composição de 95% de óleo diesel e 5% de biodiesel, de acordo com as projeções do Programa Nacional de Biodiesel (QUINTELHA et al., 2009).

No Brasil a utilização do biodiesel pode atender a diferentes demandas, e a dois tipos de mercados diferentes, o primeiro é o mercado automotivo e o segundo é o uso em estações estacionárias. Cada um destes mercados possui características próprias e podem ser subdivididos em submercados (QUINTELHA et al., 2009; MOTA et al., 2009).

O mercado de estações estacionárias caracteriza-se basicamente por instalações de geração de energia elétrica, sendo seu uso peculiar nas localidades não supridas pelo sistema regular em regiões remotas do País. Essa metodologia pode representar reduções significativas relacionadas aos custos de transporte e, principalmente, a inclusão social e o resgate da cidadania dessas comunidades. Outros segmentos de mercado para utilização do biodiesel na geração de energia podem ser encontrados em pequenas indústrias e no comércio, como forma de redução do consumo de energia no horário de ponta, aliado aos aspectos propaganda e marketing (QUINTELHA et al., 2009).

O mercado automotivo pode ser subdividido em dois grupos, sendo um composto por grandes consumidores de uma área restrita, tais como empresas de transportes urbanos, de prestação de serviços municipais, transporte ferroviário e hidroviário entre outras. A segunda parcela caracteriza-se pelo consumo a varejo, com a venda do combustível nos postos de revenda tradicionais para transporte de passageiros e para veículos leves (QUINTELHA et al., 2009).

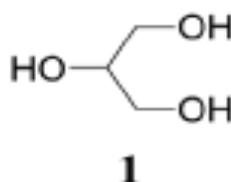
A quantidade de matéria-prima para a produção de biodiesel no Brasil é extremamente grande. As regiões mais quentes do país são propícias para o cultivo de mamona, dendê, babaçu, amendoim, pinhão manso, girassol, algodão e soja. Entre as plantas cultivadas no Brasil, o dendê e o pinhão-manso têm a melhor produtividade de óleo por hectare. O dendê (também conhecido como palma) produz de 3 a 6 toneladas de óleo por hectare cultivado. O Pinhão Manso, 1 a 6 toneladas de óleo por hectare. O sucesso não é só pelo ótimo desempenho produtivo, mas também porque tais plantas são cultivadas por médios e pequenos agricultores espalhados pelo país. Desta forma, há um incentivo para a produção do biodiesel,

pois o governo deseja manter as populações no campo e aumentar a renda dessas famílias (QUINTELHA et al., 2009).

1.3.8 Co-produto: Glicerol

O glicerol foi descoberto em 1779 por Carl W. Scheele (químico sueco), pelo aquecimento de uma mistura de óxido de chumbo com azeite de oliva. Na época, o pesquisador o batizou de “o doce princípio das gorduras”. O nome glicerol é derivado da palavra grega *glykys*, doce (BEATRIZ et al., 2011). O glicerol (1,2,3-propanotriol) é um composto orgânico de função álcool com três hidroxilas, como mostra na figura 5 fórmula molecular C₃H₈O₃. Possui gosto adocicado, é líquido, não tem cheiro, é muito viscoso, possui uma densidade mais elevada que a água e é caracterizado com uma elevada viscosidade (BEATRIZ ET AL., 2010; UMPIERRE E MACHADO, 2013). E o termo glicerina refere-se aos produtos comerciais purificados, com a presença de 95% de glicerol (KNOTHE ET AL., 2006; PACHAURI E HE, 2006).

Figura 5. Estrutura química do glicerol.



Fonte : BEATRIZ; 2011

O glicerol ocorre naturalmente em formas combinadas, como nos triglicerídeos, em todos os óleos graxos animais e vegetais, sendo isolado quando estes óleos são saponificados com hidróxido de sódio ou potássio, no processo de manufatura de sabões (MOTA et al., 2009; MARTINS, 2012; UMPIERRE, MACHADO, 2013). A tabela 2 apresenta as propriedades físico-químicas do glicerol.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do glicerol a 20°C

Fórmula química	C₃H₈O₃
Massa molecular	92,09382 g mol⁻¹
Densidade	1,261 g cm⁻³
Viscosidade	1,5 Pa s
Ponto de fusão	18,2 °C
Ponto de ebulição	290 °C
Calorias	4,32 kcal g⁻¹
Ponto de fulgor	160 °C
Tensão superficial	64,00 mN m⁻¹
Coefficiente de temperatura	-0,0598 mN (mK)⁻¹

Fonte : BEATRIZ; 2011

Várias descobertas acarretaram um aumento na demanda da glicerina. Como exemplo, em 1846 o químico italiano Ascanio Sobrero produziu pela primeira vez a nitroglicerina. Desde o final dos anos 40 o glicerol tem sido produzido a partir da epícloridrina obtida a partir do propileno (sendo este de combustíveis fósseis) (BEATRIZ et al., 2011).

A glicerina purificada (grau USP ou também chamada de glicerina farmacêutica) tem ampla aplicação em vários setores como o de: cosméticos, higiene pessoal, alimentos, medicamentos, fumo e quando associada à transformação química se faz presente na produção de explosivos, como a nitroglicerina. A Tabela 3 mostra o consumo industrial de glicerol no Brasil. Como principais consumidores destacam-se as indústrias de cosméticos, saboarias e fármacos, onde o glicerol é usado na forma bruta, principalmente como umectante. (MOTA et al., 2009; BEATRIZ et al., 2011).

Tabela 3. Distribuição do consumo de glicerina nos diferentes setores industriais

Uso em	%
Cosméticos, saboaria, fármacos	28
Revenda	15
Ésteres	13
Poliglicerina	12
Alimentos e bebidas	8
Resinas alquídicas	6
Filmes de celulose	5
Tabaco	3
Papel	1
Outros	10

Fonte: BEATRIZ; 2011

O corrente uso do biodiesel acarretou, por consequência, o aumento na produção, que como resultado gerou um grande excedente de glicerina. Essa glicerina bruta apresenta algumas impurezas como: água, metanol e material orgânico não glicerol, o que lhe confere um baixo valor comercial (MARTINS, 2012; PUTTI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Desta forma, com o aumento na demanda desse biocombustível, surge então a necessidade de estudos para novas aplicações desse subproduto, o qual se for descartado no meio ambiente pode causar grande impacto (ARRUDA et al., 2007; MILLI et al., 2011).

Para facilitar o procedimento de purificação da glicerina, há a necessidade de separar a glicerina do biodiesel metílico pelo processo decantação. Desta forma a glicerina resultante da fabricação do biodiesel chega a apresentar cerca de 20% de impurezas. As impurezas existentes no resíduo estão relacionadas ao tipo de óleo usado na produção do biodiesel (BEATRIZ et al., 2011).

1.3.9 Glicerina Residual

O Brasil pode se tornar o maior produtor e consumidor mundial de biodiesel, uma vez que possui grande disponibilidade de matéria-prima oleaginosa e um crescimento contínuo na indústria de óleos vegetais e do etanol (CAMPELO, 2011).

Conforme dados da ANP, no ano de 2010 a quantidade de biodiesel produzida em todo território brasileiro foi de 2.397.272 m³. Considerando que cerca de 10% do biodiesel produzido corresponde a glicerina residual que é prejudicial ao meio ambiente, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de descobrir novas aplicações para a glicerina residual visto que o mercado desse subproduto encontra muitas dificuldades em absorver o excedente originado da síntese do biodiesel. Assim, o Brasil passou a se preocupar não só com a produção de combustíveis, mas em destinar o resíduo da produção de biodiesel (CAMPELO, 2011).

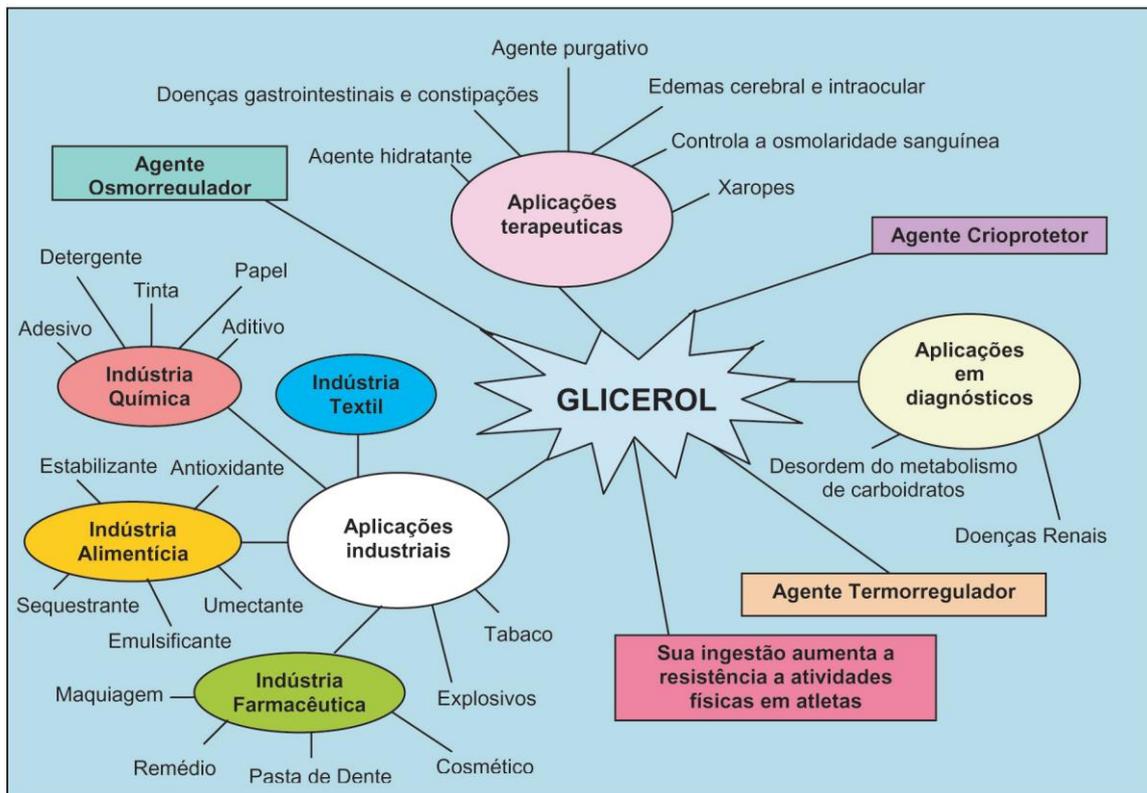
Em função das impurezas contidas no glicerol obtido na produção de biodiesel, sua aplicação em alguns tipos de indústrias se torna inviável, como por exemplo na indústria de alimentos onde atua como aditivo alimentar, agindo como estabilizante, antioxidante, sequestrante, emulsificante e umectante e na indústria farmacêutica onde é utilizado em xaropes. Financeiramente, vários processos dependem da redução dos custos de produção e do preço final do produto e, com isso, há interesse na sua purificação ou no seu aproveitamento sem tratamento (KNOTHE, 2006).

1.3.10 Aplicações da Glicerina

A indústria da glicerina é ampla, sendo o produto matéria prima para diferentes fins. A figura 6 apresenta as aplicações em diversas áreas.

Derivados do glicerol ativos opticamente são materiais de partida para síntese de compostos orgânicos importantes, tais como glicerofosfolípidos, beta-bloqueadores, prostaglandinas, PAF (fator de agregação plaquetária) e muitos outros. A diferenciação entre os dois grupos enantiotópicos da molécula pró-quiral do glicerol pode de fato levar à obtenção de moléculas quirais, as quais podem ser transformadas em ambos os enantiômeros de derivados do glicerol por manipulação seletiva de um grupo funcional. Métodos de dessimetração têm sido muito explorados, tanto na catálise química como na biocatálise, e oferecem uma tática valiosa para indução assimétrica. Em processos biocatalíticos é frequente o uso de enzimas isoladas ou de células integrais de micro-organismos (KOTHE, 2006; RIVALDI et al., 2007).

Figura 6. Principais setores industriais que utilizam a glicerina.



Fonte: MOTA; 2009.

Os derivados do glicerol têm aplicações diversas, destacando-se o uso como aditivo para combustíveis, surfactantes, flavorizantes e solventes para uso em medicina (RIVALDI et al., 2007; MENDES E SERRA, 2012).

Éteres com grande potencial de utilização na síntese de materiais poliméricos podem ser obtidos através da oligomerização do glicerol. Normalmente, a formação de oligômeros de glicerol (diglicerol e triglicerol) ocorre via reação entre o grupamento hidroxila primária, conduzindo a formação de oligômeros com cadeia linear. Embora a hidroxila primária seja mais reativa, o que favorece a formação preferencial de dímeros e trímeros lineares, durante o processo de oligomerização do glicerol, outros éteres provenientes da reação de condensação entre hidroxilas primária-secundária, secundária-secundária também são obtidos. A eterificação do glicerol produz compostos de menor polaridade e viscosidade e, por conseguinte, de maior volatilidade. Isto faz com que os éteres do glicerol tenham inúmeras

aplicações, sobretudo como aditivos para combustíveis e solventes (RIVALDI et al., 2007; MILLI et al., 2011).

Assim, o glicerol tem grande potencial para ser utilizado como matéria-prima na síntese de materiais poliméricos, seja *in natura* (em combinação com poliácidos e/ou ácidos graxos), ou pela sua modificação química (funcionalização), dando origem a importantes substâncias químicas, como por exemplo, o propanodiol, propileno glicol, ésteres, olefinas, éteres, epóxidos, carbonatos, ácidos carboxílicos, etc. Polímeros de elevado interesse industrial podem ser obtidos via polimerização de compostos químicos oriundos da funcionalização química do glicerol, destacando-se os poliésteres, as resinas alquídicas e epóxidas, as poliolefinas, poliuretanas (KOTHE, 2006; MILLI et al., 2011).

O glicerol é considerado como futura matéria-prima para fermentações industriais (WANG et al., 2001). Pois muitos microorganismos podem utilizar naturalmente o glicerol como única fonte de carbono (SILVA et al., 2009).

Desta forma diversos estudos são realizados para a aplicação do glicerol bruto, como: conversão catalítica do glicerol para propilenoglicol, ácido propínico, ácido acrílico, propanol, acroleína, propanediol, e na conversão biológica para ácido cítrico, 1,3-propanodiol entre outros (GU et al., 2007; NEMETH & SEVELLA, 2008; ZHENG et al., 2008; ZHOU et al., 2008) como também a produção de combustível oxigenado como o acetal (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il, um aditivo para gasolina), produção de H₂ e Syngas (gás sintético formado por monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrogênio) (ITO et al., 2005; ADHIKARI et al., 2008); como fonte de carbono para reatores de drenagem ácida em minas e conjuntamente pode ser convertido em ração para frangos e porcos (CERRATE et al., 2006; GARCIA et al., 2008; DELLA CASA et al., 2009; JANAUN & ELLIS, 2010).

Muitas pesquisas procuram utilizar o glicerol como matéria-prima para a indústria química na síntese ácido dodecanóico e monoésteres de glicerina e olefinas (SCIENCEDAILY, 2009), ou para síntese de monolaurina através da reação de glicerol por esterificação direta com ácido láurico (FREITAS et al., 2009), são exemplos de alguns estudos que analisam a utilização de glicerol bruto como solvente para tratamento de biomassa lignocelulósica (PEREIRA-SOARES &

SIMONE, 2007; SUN & CHEN, 2008; CLAUWAERT et al., 2008; ZUO et al., 2008; CANTERINO et al., 2009; FENG et al., 2011).

Paralelamente, o glicerol bruto contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio, originários dos óleos, e sódio ou potássio dos catalisadores, que podem ser utilizados pelos microorganismos durante os processos fermentativos. Além disso, também possuem proteínas, gorduras e carboidratos (THOMPSON & HE, 2005; RIVALDI et al., 2007; KOLESAROVA et al., 2011).

Por outro lado, com a finalidade de utilizar o glicerol residual foi investigada a sua aplicabilidade na produção de alimentação animal. Resultados sugerem que o glicerol modula as enzimas ou os microorganismos do trato digestivo de ruminantes, com vistas a determinar proporções ideais, potencial toxicidade e metabolismo (FERRARO et al., 2009; KANSEDO et al., 2009; WANG et al., 2009; HASHEMINEJAD et al., 2011).

Em estudo microbiológico demonstra-se que o fungo *Penicillium simplicissimum* é capaz de crescer em meio contendo glicerol bruto obtido a partir de óleo de mamona e produzir lipases capazes de hidrolisar substratos com ácidos graxos de cadeia média (GODOY et al., 2010).

Outro estudo rastreou várias espécies de bactérias na tentativa de identificar se existiam entre elas linhagens capazes de produzir ácido glicérico a partir de glicerol (HABE et al., 2009), porém o estudo não foi realizado em resíduo bruto. Outros autores analisaram a fermentação anaeróbica de glicerol pela bactéria *Paenibacillus macerans* (GUPTA et al., 2009). Modificações no metabolismo de *Escherichia coli*, por engenharia genética, resultou na produção de 1,2-PDO (1,2-propanodiol), etanol, formato, succinato e lactato a partir de glicerol.

Além disso, diferentes bactérias foram estudadas quanto à capacidade de crescerem em glicerol bruto e produzirem biogás (YAZDANI, GONZALEZ, 2007; SHAMS YAZDANI, GONZALEZ, 2008; BLANKSCHIEDEN et al., 2010; CLOMBURG & GONZALEZ, 2010; MAZUMDAR et al., 2010; KOLESAROVA et al., 2011).

A produção de DHA (Ácido Docosa-hexanóico) e a qualidade da biomassa produzida pela alga *Schizochytrium limacinum*, crescida em meio contendo glicerol

bruto obtido da produção de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas, foi também exitosamente determinada (PYLE et al., 2008).

1.3.11 Conversão Microbiológica do Glicerol

A glicerina é considerada uma fonte de carbono assimilável por bactérias e fungos sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula, sendo um dos poucos substratos capazes de atravessar a membrana celular por difusão facilitada. Por isso, um dos destinos possíveis para o material resultante da indústria do biodiesel é seu uso na composição de meios de cultura para crescimento de microorganismos em processos biotecnológicos, que levem à produção de moléculas de interesse econômico (PAPANIKOLAOU et al., 2002; ITO et al., 2005; PAPANIKOLAOU et al., 2008; RIVALDI et al., 2008; EASTERLING et al., 2009; SILVA et al., 2009; AMARAL et al., 2009; MOTA et al., 2009) .

Desta forma, muitos estudos foram desenvolvidos e vários deles apontam para um mecanismo de assimilação de glicerina por estes microorganismos para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis. Resulta que a bioconversão da glicerina adiciona um valor significativo à produtividade da indústria do biodiesel. Portanto, uma solução estratégica para o excesso desse resíduo é sua aplicação biotecnológica (RIVALDI et al., 2008; CAMPELO; 2011).

A literatura descreve que em microorganismos eucarióticos, o glicerol constitui-se o principal composto formado para regular as variações de atividade de água, quando expostos em ambientes altamente osmofílicos (WANG et al., 2001; SILVA et al., 2009).

O glicerol pode ser assimilado pela glicólise, através de glicerol-3-fosfato ou dihidroxiacetona por levedura. Em *Saccharomyces cerevisiae*, o glicerol é assimilado pela glicerol quinase e adenina dinucleotídeo (FAD)-dependente e desidrogenase glicerol-3-fosfato (WANG et al., 2001; RIVALDI et al., 2008; AMARAL et al., 2009; MOTA et al., 2009). O produto formado por glicerol quinase, o glicerol-3-fosfato, pode ser usado como um precursor da biossíntese de lipídeos ou na conversão para dihidroxiacetona fosfato, como intermediário, podendo ser transformado em

1.3.12 Resposta Oxidativa

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados espécies reativas de oxigênio ou espécies reativas de nitrogênio. Nas células e nos organismos mais complexos, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (YU, 1994; DRODGE, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; JOMOVA et al., 2010; AUGUSTINIÁK et al., 2010).

A tabela 4 apresenta o processo de formação de espécies reativas de oxigênio.

Tabela 4. Redução do oxigênio a espécies reativas

$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$	<i>radical superóxido</i>
$O_2^{\cdot-} + H_2O \longrightarrow H_2O^{\cdot-} + OH$	radical hidroperóxil
$H_2O^{\cdot-} + e^- + H \longrightarrow H_2O_2$	peróxido de hidrogênio
$H_2O_2 + e^- \longrightarrow \cdot OH + OH^-$	radical hidroxila

Fonte: KOURY, 2003

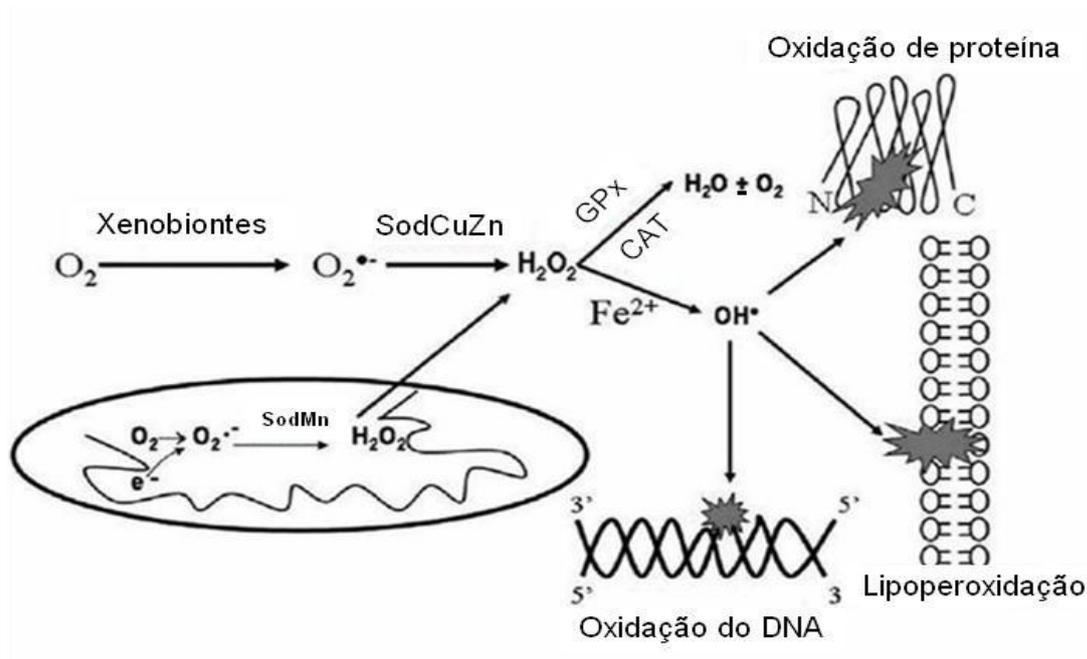
As espécies reativas de oxigênio são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não pareado em sua órbita externa. Tendem a ligar o elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons. Nessas reações são formados intermediários reativos (Tabela 4), como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), sendo este último o mais reativo das espécies (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

As espécies reativas de oxigênio podem reagir com determinadas estruturas celulares danificando as células, e induzir a morte celular programada conhecida como apoptose. A dosagem de efeitos genotóxicos e citotóxicos é uma importante

ferramenta na avaliação do comprometimento das estruturas celulares (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana plasmática, e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com seu sítio de formação. A figura 8 representa o mecanismo de ataque de EROs, partindo da redução monoelétrica do O_2 e os sistemas de defesa antioxidante (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

Figura 8. Danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio



Fonte: RAMAKRISHNAN, RAJESH; SULOCHANA, 2007.

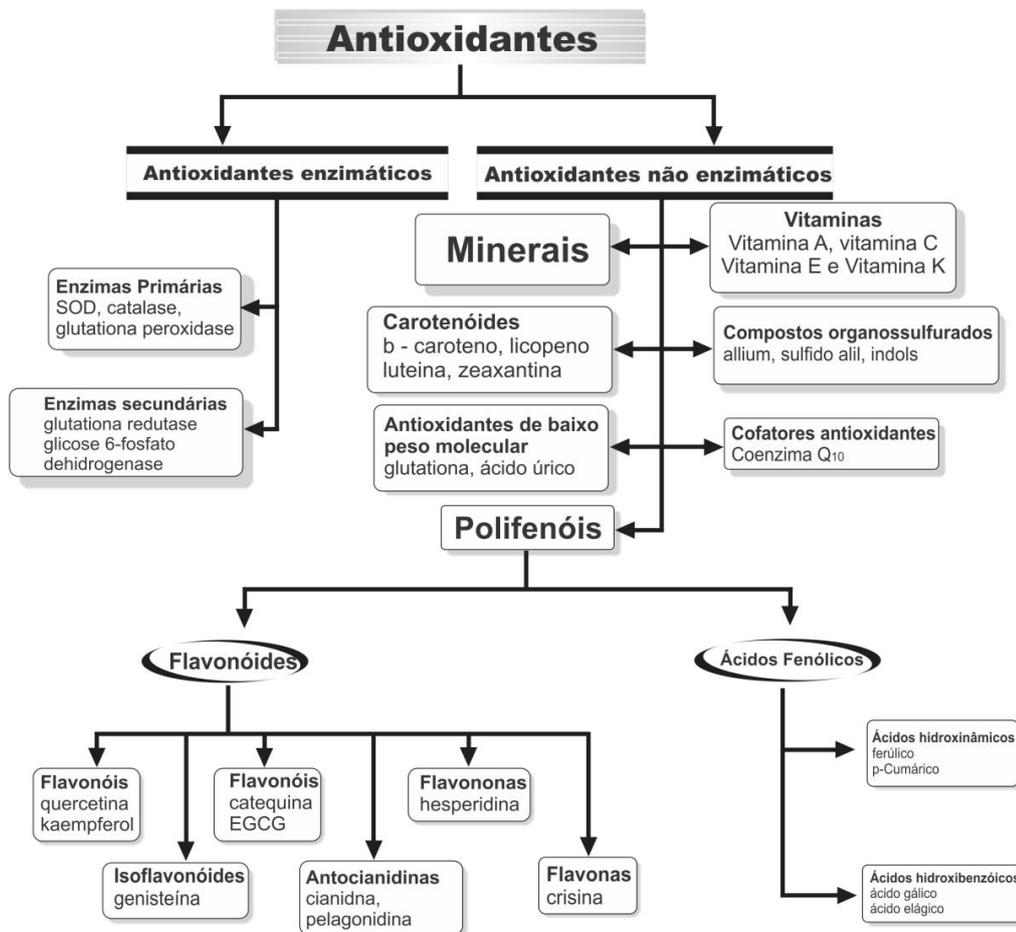
Uma vez que os sistemas vivos estão expostos constantemente a condições físicas, químicas e biológicas adversas, tais condições originam um fenômeno denominado, de modo geral, estresse (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; FERRARI, SOUZA, 2009; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

Assim, o desequilíbrio entre a liberação de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de ação dos sistemas de defesa antioxidante leva ao estresse oxidativo.

Uma vez que os sistemas vivos estão expostos constantemente a condições físicas, químicas e biológicas adversas, tais condições originam um fenômeno denominado, de modo geral, estresse (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; FERRARI, SOUZA, 2009; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

Assim, o desequilíbrio entre a liberação de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de ação dos sistemas de defesa antioxidante leva ao estresse oxidativo. Com o objetivo de minimizar os efeitos danosos das EROs, os organismos, ao longo de sua evolução, desenvolveram sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Figura 9).

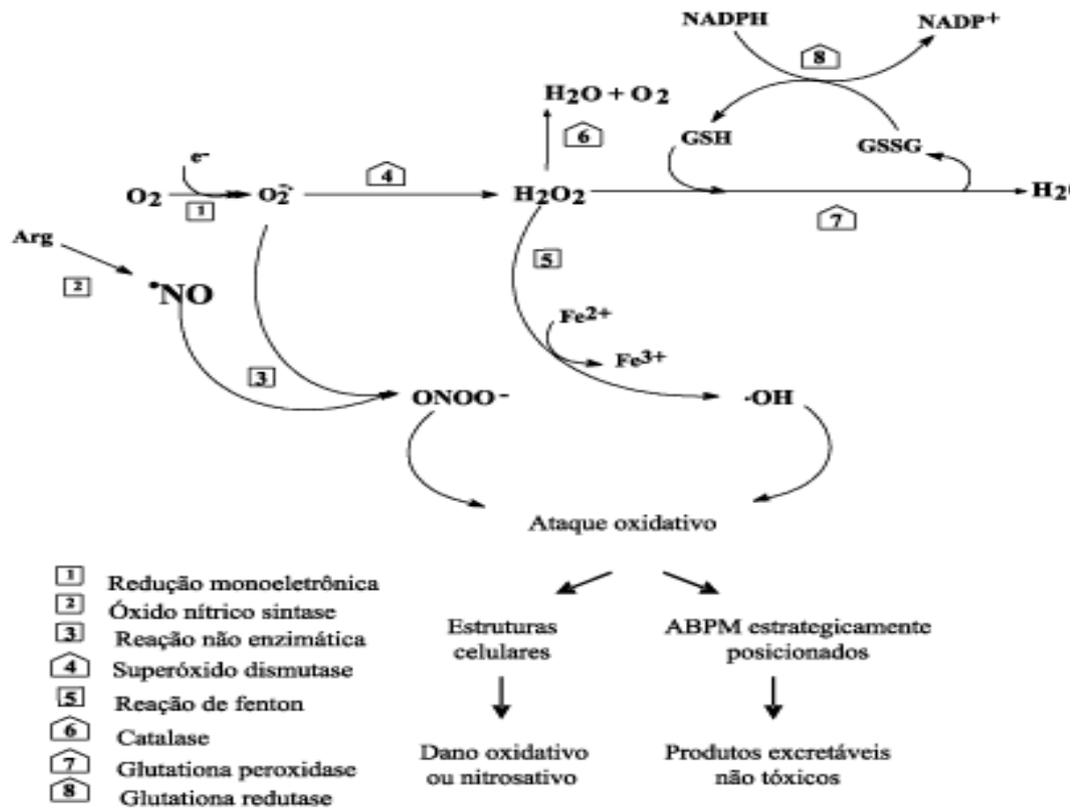
Figura 9. . Mecanismo de ataque de EROs e os sistemas de defesa antioxidante. O símbolo □ refere-se aos mecanismos de produção de EROs e o símbolo △, às principais enzimas de defesas antioxidante.



Fonte: GANDRA, et. al. 2004.

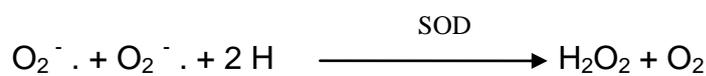
As defesas antioxidantes enzimáticas são fundamentais, uma vez que podem atuar diretamente contra as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ou, ainda, reparar os danos causados ao organismo por essas espécies. Entre as principais estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona S-Transferase (GST) como mostra na figura 10 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Figura 10. Classificação dos antioxidante.



Fonte: RATNAM et al, 2006

A SOD é uma metaloenzima que age sobre o radical superóxido (O₂^{•-}), dismutando-o a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e protegendo a célula em até 97% dos alvos do ataque do ânion superóxido. como mostra a reação:



Em eucariotos são encontradas duas principais isoformas, no citosol a forma SOD-CuZn (possui cobre e zinco em seu sítio ativo), enquanto que na mitocôndria a forma SOD-Mn (com manganês em seu sítio ativo) é a mais observada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Para a eliminação de peróxidos produzidos, existem duas enzimas principais, A catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase GPx (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A catalase (CAT) converte o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigênio (O₂), conforme a reação descrita abaixo: .

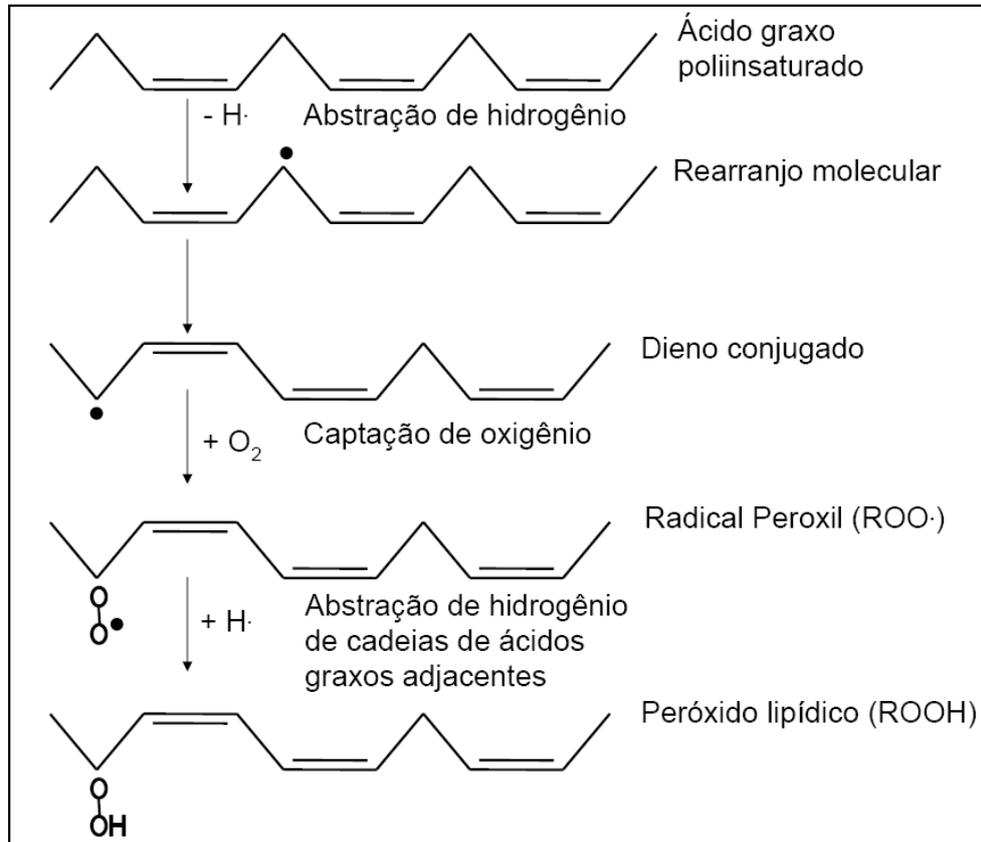


A glutathiona-S-transferase (GST) é responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos a GSH, reduzindo sua toxicidade, além de torná-los mais hidrofílicos, permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular, metabolizados pela via do ácido mercaptúrico. A GST e o citocromo P450, por serem enzimas sensíveis a compostos exógenos, têm sido largamente utilizados como biomarcadores moleculares das respostas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A peroxidação de lipídeos é uma reação em cadeia que resulta do ataque às cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (com dois ou mais carbonos de sua cadeia com ligação dupla), que envolve três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. O começo desta reação geralmente ocorre através da abstração de átomo hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-) através do ataque de uma molécula reativa, como ERO, ou outros radicais livres, formando um radical de carbono. Este, por sua vez, realizará um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, o qual pode reagir com moléculas de oxigênio, formando um radical peroxil (ROO). A partir da formação deste radical ocorre a fase de propagação, devido à sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metilenos de cadeias adjacentes (transformando-se em um peróxido lipídico). Estes sofrerão processos de rearranjo molecular, formação de dienos conjugados e, posteriormente, ataque de moléculas de oxigênio, formando um novo radical peroxil.

Este reinicia o processo, gerando uma reação oxidativa em cadeia (Figura 11) (MOSIALOU, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Figura 11. Lipoperoxidação ou peroxidação de lipídeos – LPO

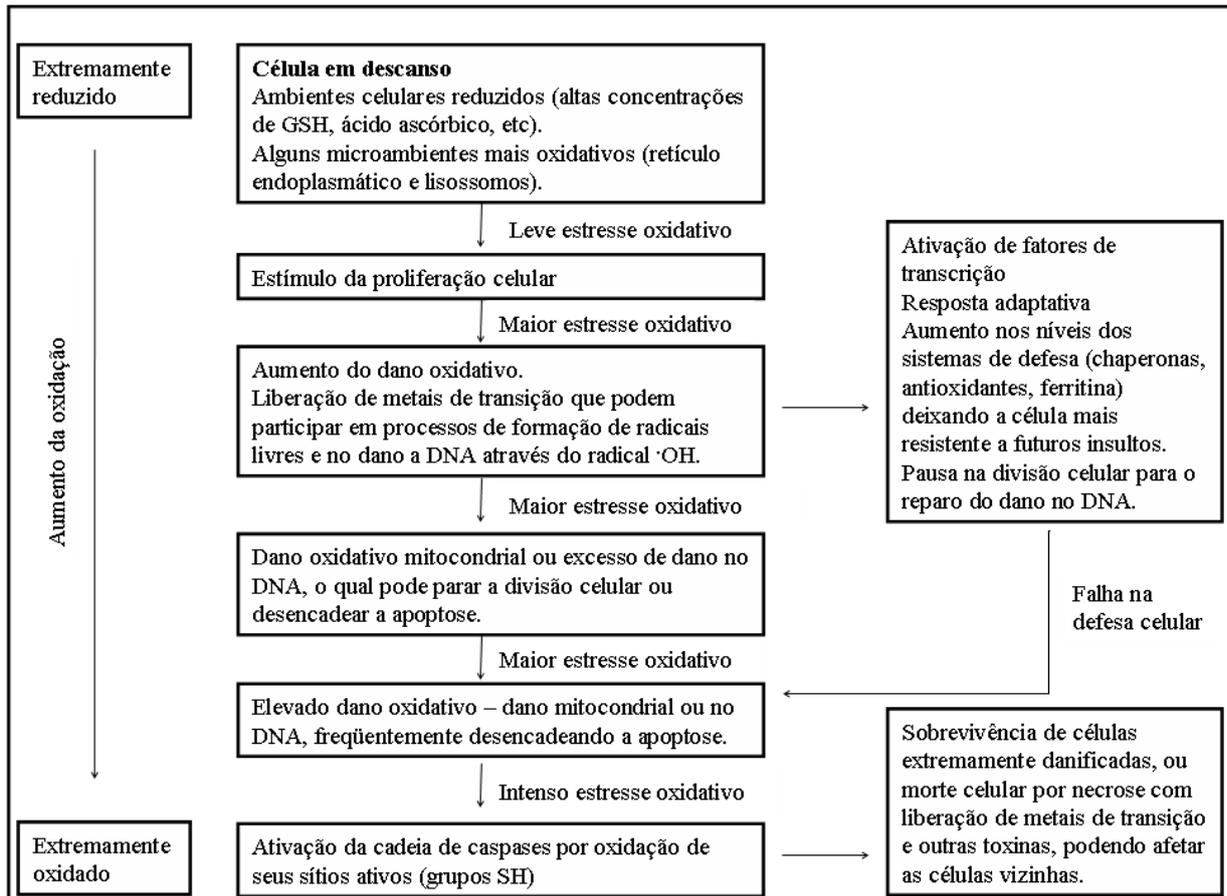


Fonte: MOSIALOU, 1993

A remoção de átomos de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (neste esquema representado por três ligações duplas) leva à formação de um dieno conjugado por rearranjo molecular. Esta molécula pode sofrer o ataque de oxigênio, formando um radical peróxido. Este radical pode continuar o ciclo de lipoperoxidação através da abstração de átomos de hidrogênio de cadeias poliinsaturadas próximas, transformando-se em um peróxido lipídico (TREVISAN, 2008). Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi nonenal (4-HNE). Acredita-se que níveis elevados desses compostos atuem em processos citotóxicos e genotóxicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A figura 12 apresenta as diversas possibilidades de respostas celulares frente ao estresse oxidativo.

Figura 12. Respostas celulares a diferentes graus de estresse oxidativo



Fonte: HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007

Mesmo atuando como fonte de carbono alguns trabalhos relatam respostas antioxidantes enzimáticas com o cultivo na presença de glicerol. A presença do poliól no meio de cultivo pode aumentar ou diminuir a atividade de enzimas como catalase, superóxido dismutase, glutathion peroxidase, glutathion redutase, o que pode causar um estado pró-oxidante e conseqüentemente estresse oxidativo (VALKO, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

1.3.13 Lipídeos Produzidos por Fungos

Na natureza os lipídeos podem estar agregados a outros compostos, tais como: proteínas, aminoácidos e polissacarídeos. Os ácidos graxos encontrados na membrana celular são responsáveis pelo controle da entrada e saída de nutrientes e metabólitos. A fluidez da membrana plasmática é controlada pela presença de ácidos graxos saturados e insaturados, que a torna mais rígida ou flexível devido à curvatura formada pelas insaturações. Sendo assim, a temperatura é o principal fator de regulação do grau de insaturações dos ácidos graxos nos organismos (CAMPELO, 2011).

Nos microorganismos os lipídeos são sintetizados durante a fase de crescimento, fazendo parte do processo metabólico e como reserva de carbono. A quantidade e qualidade desse processo esta relacionada a espécie, e aos nutrientes disponíveis no meio de cultura (CAMPELO, 2011).

Ácidos graxos constituídos de dezoito ou mais átomos de carbono e com mais de duas ligações duplas são profusamente sintetizados por organismos como algas, bactérias e fungos ou por plantas oleaginosas tais como soja, canola, girassol e gergelim. Os ácidos graxos insaturados tais como: oléico e linoléico imperam sobre os ácidos saturados (CAMPELO, 2011). O ácido gama linolênico é um ácido graxo essencial, possuindo várias funções importantes, sendo seu uso é recomendado no tratamento de: tensão pré-menstrual, osteoporose, processos inflamatórios e na pressão sanguínea alta. Este ácido atualmente vem sendo extraído de plantas, porém, determinados fungos filamentosos são muito utilizados em sua fabricação (CAMPELO, 2011).

Existem várias razões para a utilização de microorganismos na indústria de óleos (WELLBAUM, 2006):

- Os óleos microbianos têm a vantagem de possuir somente ácidos graxos poliinsaturados, diferentemente dos óleos de plantas e de animais que possuem além dos insaturados, os ácidos graxos saturados;
- Ácidos graxos poliinsaturados microbianos são óleos com maior valor comercial, quando comparados aos óleos de soja e girassol;

- Taxas de crescimento extremamente altas em uma grande variedade de substratos, possibilitando o uso de matérias primas econômicas, até mesmo de custo zero na formulação de meios de cultura;

- A produção de óleo pode ser feita ao longo do ano inteiro, sem dependência sazonal ou climática;

- As fontes microbianas podem oferecer a produção de ácidos graxos poli-insaturados, com alto grau de pureza, mais concentrados e com qualidade controlada;

- O potencial enzimático dos microorganismos permite ainda a produção simultânea de óleos e outros produtos de interesse industrial;

- A manipulação de genes para a otimização da produção, bem como os mutantes são de controle e monitoramento bem mais fácil do que os organismos mais complexos, como plantas e animais;

- Os microorganismos podem usar glicerina como fonte de carbono para produzir biodiesel, além de outros produtos, como lipídeos, carboidratos (quitina e quitosana), proteínas, vitaminas, antioxidantes;

- A produção industrial de óleos a partir de microorganismos tem vantagem sobre outras fontes de óleos, pois não necessita de grandes extensões de terra agriculturáveis e de enormes quantidades de água. As instalações poderiam estar dispostas em qualquer área com dimensões modestas, mesmo para produzir grandes quantidades do produto, sem prejudicar o habitat natural e/ou causar algum impacto ambiental.

Usualmente os triglicerídeos e os ácidos graxos compreendem uma grande fração dos lipídeos produzidos por fungos. Os ácidos graxos produzidos por fungos oleaginosos podem abranger até 88% da fração lipídica (CAMPELO, 2011).

1.3.14 Reino Fungi

Os fungos são encontrados em todo planeta, alimentam-se através da secreção de enzimas digestivas, exibem várias características próprias que os diferenciam dos demais grupos de seres vivos. Em 1969, Whittaker realizou um estudo morfológico, citológico e bioquímico classificando os fungos em um reino a

parte, o reino Fungi (BONONI & GRANDI, 1998). Os fungos possuem estruturas que são representadas por hifas, que agrupadas constituem o micélio, e sua nutrição é do tipo absorção. Como qualquer sistema vivo, os fungos necessitam de fontes de carbono, nitrogênio e água (ALEXOPOULOS et al., 1999; RAVEN, 2002).

São classificados como seres eucarióticos, heterotróficos, e não apresentam pigmentos fotossintetizantes, sendo encontrados no ar, na água, no solo, nos vegetais e animais (LACAZ et al., 1991; SIDRIM e MOREIRA, 1999; TRABULSI et al., 1999). É no ambiente terrestre que são encontrados a maioria dos fungos, seja no solo ou sobre matéria orgânica em decomposição (PELCZAR et al., 1981). Reproduzem-se de forma sexuada e assexuada, gerando como produto final os esporos (BONONI, 1998).

O reino fungi compreende quatro filas: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. O filo Chytridiomycota são predominantemente aquáticos, possuindo cerca de 790 espécies descritas. O filo Zygomycota apresenta aproximadamente cerca de 1.060 espécies, essencialmente terrestres, apresentando algumas espécies parasitas de plantas, insetos e animais terrestres de pequeno porte. Uma das características marcante dos zigomicetos são hifas abundantes que os tornam mais fáceis de serem reconhecidos, e seu rápido crescimento. O filo Ascomycota compreende cerca de 32.300 espécies. O filo Basidiomycota apresenta cerca de 22.300 espécies descritas, dentre elas estão os cogumelos bem familiares pelo uso na gastronomia e na medicina (RAVEN, 2002).

1.3.14.1 Fungos e Biotecnologia

As estratégias governamentais propostas pelo poder público para biotecnologia têm sido direcionadas para adoção de políticas que promovam a sustentabilidade e o direito ao meio ambiente. Novas alternativas biotecnológicas se desenvolveram também como aplicações de interesse geral, tais como produtos de diagnóstico, técnicas de vacinação e de preparação de insumos químicos e biológicos, pela engenharia genética, técnicas de seleção e melhoramento de espécies vegetais e animais (COLLUCI, 2013).

A biotecnologia pode agregar inúmeras denominações, reveladoras de sua complexidade e possibilidade de aplicação. Sendo assim através da utilização de

microorganismos ou de insumos produzidos por eles, tem sido amplamente empregado nos processos industriais. Portanto, os fungos são organismos que colaboram para uma grande variedade de aplicações a favor do progresso do homem, além da fermentação microbiana que fornece vários alimentos e bebidas. (CAMPELO, 2011).

Os fungos filamentosos possuem um importante papel em um gama de processos biotecnológicos, em particular, por serem produtores de grandes variedades de enzimas e metabólitos como antibióticos, ácidos orgânicos, pigmentos e outros aditivos alimentares. Através da produção industrial são comercializadas enzimas, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos, ácidos graxos, polissacarídeos, pães, queijo, e combustíveis como álcool e biogás (HAWKSWORTH, 1991; CAMPELO, 2011).

1.3.14.2 Filo Zygomycota

Segundo os conceitos taxonômicos vigentes, baseados principalmente em estudos morfológicos, a ordem Mucorales está inserida na classe Zygomycetes, do filo ou divisão Zygomycota do reino Fungi. Correspondem a fungos que se reproduzem sexuadamente por estruturas chamadas Zigosporângios, apresentando micélio desenvolvido com hifas cenocíticas ou septadas irregularmente. Possuem uma parede celular constituída majoritariamente por quitina e quitosana; (ALEXOPOULOS et al., 1999).

Os zigomicetos estão distribuídos em sete ordens, trinta e duas famílias e cento e trinta gêneros, com aproximadamente novecentas espécies. Mucorales é a ordem com maior número de espécies. Seus representantes também são conhecidos como fungos do açúcar, pois apresentam a capacidade de degradação de estrutura mais simples, como glicose e sacarose (ALEXOPOULOS et al., 1996; KIRK et al., 2008). A ordem Mucorales compreende exemplares de gêneros de grande interesse econômico: *Chonephora*, *Mycotipha*, *Cunningamella*, *Mortierella*, *Syncephalastrum*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Radiomyces*, esses fungos são utilizados pelas indústrias por sintetizarem produtos industriais importantes como ácidos, etanol e enzimas (PUTZKE et al., 2004).

Dentre os fungos, representantes da Classe Zygomycetes exibem rápido crescimento, utilizam diferentes substratos, e apresentam alto potencial biotecnológico na produção de moléculas de alto valor agregado, como quitina, quitosana, e principalmente óleos (ALEXOPOULOS et al., 1996; CARLILE, WATKINSON, 1996; MENG et al., 2009).

Schipper (1975) realizou estudos relevantes sobre a variabilidade e a morfologia de representantes do gênero *Mucor*, posicionando-os taxonomicamente e elaborando chaves para identificação de *Mucor hiemalis*, *M. mucedo*, *M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. laxorrhizus*, *M. nanus*, *M. grandis* e espécies relacionadas (DOMSCH et al., 1980; ALVES, 2002).

As espécies do gênero *Mucor* ganham destaque na biotecnologia sendo responsáveis pela produção de várias enzimas como: amilase, lipase, pectinase e protease. *Mucor hiemalis*, *M. racemosus* e *M. miehei* são espécies que apresentam atividade enzimática proteásica de importância comercial (GUTIERREZ et al., 2011).

Mucor circinelloides é uma espécie dimórfica, com interessante habilidade para produção aeróbica e anaeróbica de etanol. Dentre os zigomicetos exibe maior repertório molecular, incluindo transformação genética utilizando-se plasmídeos auto-replicativos, transformação integrada mediada por *Agrobacterium*, geração de mutantes e uso de procedimentos baseados em RNAi para supressão de genes (GUTIERREZ et AL., 2011).

A espécie também apresenta interesse biotecnológico como fonte de carotenoides. Grande parte dos estudos acerca de microorganismos oleaginosos baseia-se nessa espécie que é capaz de acumular corpos lipídicos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, incluindo ácido gama linolênico (6,9,12-*cis,cis,cis*-ácido octadecatrenóico, ω -6) (NICOLAS et al., 2007; 2008; 2009; 2010; GUTIERREZ et al., 2011).

Dados da literatura revelam que o crescimento e a acumulação de lipídeos em *M. circinelloides*, em meio de cultura definido, são estimulados por monossacarídeos (aldoses e cetoses), oligossacarídeos (com exceção de lactose e rafinose) e em alguns polissacarídeos, triacilgliceróis ácidos graxos, mas não em meios contendo acetato, citrato e alcoóis (sorbitol, etanol e glicerol). Ainda é capaz de render grande produção de biomassa durante cultivo em diferentes fontes de

carbono (WOLF, 2002; SILVA 2006; TORRES et al., 2012). Tal comportamento aponta o fungo como sistema de biomassa alternativa aos óleos de plantas, o que sugere sua utilização como matéria prima para a produção de biodiesel (VELAYOS, ESLAVA et al., 2000; VELAYOS, BLASCO et al., 2000; XIA, 2011).

1.4 REFERÊNCIAS

ADHIKARI, S.; FERNANDOM, S. D.; HARYANTO, A. Hydrogen production from glycerin by steam reforming over nickel catalysts. **Renew Energy**. v. 33, n. 5, p. 1097–1100, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Biodiesel: estratégias para produção e uso no Brasil. Unicorp, 26-27, abr. Anais. v. 1, p. 1-23, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, G. N. E. B. Resolução ANP nº 7/2008 2008.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Intoductory Mycology**. 4. Ed. New York: John Wiley & Sons. p. 127-144, 1999.

ALVES, M. H.; TRUFEM, S. F.B.; MILANEZ, A. I. Táxons de *Mucor* Fresen. (Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife-PE. **Revista Brasil**. v. 25, n. 2, p.147-160, 2002.

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**. v. 87, p. 179-186, 2009.

AMADO, L.; KUZMINOV, A. Polyphosphate accumulation in *Escherichia coli* in response to defects in DNA metabolism. **Journal of Bacteriology**. v. 191, p. 7410-6, 2009.

ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFERM, M.; MITTELBACH, M.; GUEBITZ G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 3051-3056, 2009.

APOLINÁRIO, F. D. B.; PEREIRA, G. F.; FERREIRA, J. P. Biodiesel e alternativas para utilização da glicerina resultante do processo de produção de biodiesel. **Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e Fluminense**. v. 2, n. 1, p.141-146, 2012.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**. v. 26, p. 56-62, 2007.

AUGUSTYNIAK, A.; SKRZYDLEWSKA, E. The influence of L-carnitine supplementation on the antioxidative abilities of serum and the central nervous system of ethanol-induced rats. **Metabolic Brain Disease**. v. 25, n. 4, p. 381-389, 2010.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Quimica Nova**.v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ, K. **Renewable Sustainable Energy Review**. DOI:10.1016/j.rser.07.016, 2006.

BLANKSCHIEN, M. D.; CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol. **Metabolic Engineering**. v. 12, n. 5, p. 409-19, 2010.

BONONI, V. L. R.; TRUFEM. S. F. B. (Org.) **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: Noções básicas de taxonomia e aplicação biotecnológicas**. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p. 184, 1998.

BRAGA, C. F. G. V.; BRAGA, L. V. Desafios da energia no Brasil: panorama regulatório da produção e comercialização do biodiesel. **Cadernos Ebape. BR**. v. 10, n. 3, p. 751-762, 2012.

CAMPELO, B. G. **Produção de ácidos graxos pelo fungo *Mortierella sp* a partir de glicerina residual**. Faculdade Salesiana, 2011.

CANTERINO, M.; DI SOMMA, I.; MAROTTA, R.; ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V. Energy recovery in wastewater decontamination: simultaneous photocatalytic oxidation of an organic substrate and electricity generation. **Water Research**. v. 43, n. 10, p. 2710-6, 2009.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. The Fungi. **Academic Press**. p. 385, 1996.

CERRATE, S.; YANG, F.; WANG, Z. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed Ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**. v. 11, n. 5, p. 1001-1007, 2006.

CLAUWAERT, P.; HA, D. V. D.; VERSTRAETE, W. Energy recovery from energy rich vegetable products with microbial fuel cells. **Biotechnology Letters**. v. 98, p. 1-5, 2008.

CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,2-propanediol from glycerol. **Biotechnology Bioengineering**. v. 108, n. 4, p. 867-79, 2010.

COLUCCI, M. G. Biotecnologia e sustentabilidade energética: construindo diálogo pela sobrevivência comum. **Revista Jurídica**. v. 30, n. 1, p. 429-450, 2013.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

DELLA CASA, G.; BOCHICCHIO, D.; FAETI, V. Use of pure glycerol in fattening heavy pigs. **Meat Science Journal**. v. 81, p. 238-244, 2009.

DELATORRE, A. B.; RODRIGUES, M. P.; AGUIAR, C. J.; ANDRADE, V. V. V.; ARÊDES, A.; PEREZ, V. H. Produção de biodiesel: considerações sobre as diferentes matérias-primas e rotas tecnológicas de processos. **Academic Journal Database**. p. 21- 47, 2011.

DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. **Energy Policy Journal**. v. 35, p. 4661-4670, 2007.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON T. H. Compendium of soil fungi. **Academic**. 1980.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Reviews**. v. 82, n. 1, p. 47- 95, 2002.

EASTERLING, E. R.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 356–361, 2009.

FENG, Y.; YANG, Q.; WANG, X.; LIU, Y.; LEE, H.; REN, N. Treatment of biodiesel production wastes with simultaneous electricity generation using a single-chamber microbial fuel cell. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 411–415, 2011.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de Soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

FERRARI, R. A.; SOUZA, W. L. avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**. v. 32, n. 1, p. 106-111, 2009.

FERRARO, S. M.; MENDOZA, G. D.; MIRANDA, L. A.; GUTIERREZ, C. G. *In vitro* gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. **Animal Feed Science and Technology**. v. 154, p. 112-118, 2009.

FRANCO, P. F. Biodiesel, Glicerol e Micro organismos. Disponível em: <<http://www.infobibos.com>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; BARCZA, M. V.; CASTRO, H. F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de Biodiesel: Síntese enzimática de monolaurina por esterificação. **Química Nova**. v. 32, n. 9, p. 2277-2281, 2009.

GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**. v. 89, p. 147-163, 2003.

GARCIA, E.; LACA, M.; PEREZ, E.; GARRIDO, A.; PEINADO, J. Newclass of acetal derived from glycerin as a biodiesel fuel component. **Energy Fuels**. v. 22, n. 6, p. 4274–4280, 2008.

GANDRA, P. G; ALVES, A. A; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**. v. 27, n. 6, p. 980-985, 2004.

GERPEN, J. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**. v. 86, p. 1097– 1107, 2005.

GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L.; FREIRE, D. M. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 38, n. 8, p. 945-953, 2011.

GOMES, M. C. S.; PEREIRA, N. C.; BARROS, S. T. D. Separation of biodiesel and glycerol using ceramic membranes. **Journal of Membrane Science**. v. 352, p. 271-276, 2010.

GONÇALVES, B. R. L.; PEREZ, L.; ÂNGELO, A. C. D. Glicerol: Uma Inovadora Fonte de Energia Proveniente da Produção de Biodiesel. Disponível em: <<http://www.advancesincleanerproduction.net/>>. Acesso em: 01 jun. 2012.

GU, Y.; AZZOUZI, A.; POUILLOUX, Y.; JÉRÔME, F.; BARRAULT, J. Heterogeneously catalyzed etherification of glycerol: new pathways for transformation of glycerol to more valuable chemicals. **Green Chemistry**. v. 10, n. 2, p. 164-167, 2007.

GUPTA, A.; MURARKA, A.; CAMPBELL, P.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol in *Paenibacillus macerans*: metabolic pathways and environmental determinants. **Applied Environmental Microbiology**. v. 75, n. 18, p. 587- 83, 2009.

GUTIERREZ, A.; LOPES-GARICA, S.; GARRE, V. High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. **Journal of Microbiology Methods**. v. 83, p. 442-446, 2011.

HABE, H.; SHIMADA, Y.; YAKUSHI, T.; HATTORI, H.; ANO, Y.; FUKUOKA, T.; KITAMOTO, D.; ITAGAKI, M.; WATANABE, K.; YANAGISHITA, H.; MATSUSHITA, K.; SAKAKI, K. Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol. **Applied Environmental Microbiology**. v. 75, n. 24, p. 7760-6, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press. v. 1, p. 851, 2007.

HASHEMINEJAD, M.; TABATABAEI, M.; MANSOURPANAH, Y.; KHATAMIFAR, M.; JAVANI, A. Upstream and downstream strategies to economize biodiesel production. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 461-468, 2011.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity; magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**. v. 95, p. 641-55, 1991.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process, **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 100, p. 260–265, 2005.

JANAUN, J.; ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 1312–1320, 2010.

JOMOVA, K.; VONDRAKOVA, D.; LAWSON, M.; VALKO, M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 345, n. 1-2, p. 91-104, 2010.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**. v. 283, p. 65–87, 2011.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Medica**. 8 ed. São Paulo: Sarvier, p. 695, 1991.

LI, L.. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 43, p. 58–62, 2006.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S.; Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**. v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

KANSEDO, J.; LEE, K. T.; BHATIA, S. *Cerbera odollam* (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. **Fuel**. v. 88, p. 1148–1150, 2009.

KIRK, P. M.; CANNON, P.F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. (editors). **Ainsworth & Bisbys Dictionary of Fungi**. 10 edition. Wallingford. Cabi Publishing, 2008.

KNOTHE, G. The Biodiesel Handbook. **American Oil Chemists' Society Press**. Illinois, 2a edição, p. 516, 2005.

KNOTHE, G. Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 83, n. 10, p. 823-833, 2006.

KNOTHE, G. Biodiesel: Current Trends and Properties. **Topics in Catalysis**. v. 53, p. 714-720, 2010.

KOLESAROVA, N.; HUTNAN, M.; BODIK, I.; SPALKOVA, V. Utilization of biodiesel by-products for biogas production. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2011, p. 1-15, ID: 1267-98, 2011.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Z. Estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**. v. 16, n. 4, 2003.

MARTINS, C. A.; ANDRADE JUNIOR, P. P. Biodiesel: análise social, ambiental e econômica. Disponível em: <<http://conferencias.utfpr.edu.br>>. Acesso em: 25 out. 2012.

MAZUMDAR, S.; CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Escherichia coli strains engineered for homofermentative production of D-lactic acid from glycerol. **Applied Environmental Microbiology**. v. 76, n. 13, p. 4327-36, 2010.

MENDES, D. B.; SERRA, J. C. V. Glicerina: uma abordagem sobre a produção e o tratamento. **Revista Liberato**. v. 13, n. 20, p. 59-67, 2012.

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

MILLI, B. B.; GRIPA, D. C.; SIMONELLI, G. Aplicações alternativas da glicerina oriunda do biodiesel. **Enciclopédia Biosfera**. v. 7, n. 12, p. 1-9, 2011.

MOSIALOU, E. **Microssomal Glutathione Transferase and Oxidative Stress**. Dissertação de Pós- Doutorado, Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology. 1993.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

MURUGESAN, A.; UMARANI, C.; SUBRAMANIAN, R.; NEDUNCHEZHIAN, N. Biodiesel as an alternative fuel for diesel engines—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 13, p. 653–662, 2009.

NÉMETH, Á.; BALÁSSY, A.; SEVELLA, B. Difficulties and solutions for the assays of the key enzymes of a new enzymatic glycerol bioconversion. **Periodica Polytechnica**. v. 52, n. 1, p. 17-22, 2008.

NICOLAS, F. E.; HARO, J. P.; TORRES-MARTINEZ, S.; RUIZ-VASQUEZ, R. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. **Fungal Genome Biology**. v. 44, p. 504-516, 2007.

NICOLÁS, F.; CALO, S.; MURCIA-FLORES, L.; GARRE, V.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTÍNEZ, S. A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 280, p. 81–88, 2008.

NICOLAS, F. E.; TORRES-MARTINEZ, S.; RUIZ-VASQUEZ, R. Transcriptional activation increases RNA silencing efficiency and stability in the fungus *Mucor circinelloides*. **Journal Biotechnology**. v.142, p. 123-126, 2009.

NICOLÁS F.; MOXON, S.; DE HARO, J. P.; CALO, S.; GRIGORIEV, I. V.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; MOULTON, V.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M.; DALMAY, T. Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. **Nucleic Acids Research**. v. 38, p. 5535–5541, 2010.

OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN YUNUS, W. M. Z. Glycerol Residue: A Rich Source of Glycerol and Medium Chain Fatty Acids. **Journal of Oleo Science**. v. 53, n. 1, p. 29-33, 2004.

OLIVEIRA, L.B.; MUYLEAERT, M.S.; ROSA, L.P.; BARATA, M.; ROVERE, E. Analysis of the sustainability of using wastes in the Brazilian power industry. **Renewable and Sustainable Energy Review**. DOI:10.1016/j.rser.10.013, 2006.

OLIVEIRA, J. S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. D.; MÜLLER, M. D. Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. **Ciência Rural**. v. 43, n. 3, p. 509-512, 2013.

PACHAURI, N.; HE, B. Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production: A Survey of Current Research Activities. **American Society of Agricultural and Biological Engineers International Annual Meeting**.v 9.n.12 p. 1-16, 2006.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, S.; CHEVALOT, L.; AGGELIS, I.; MARC, G. I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol, **Journal of Applied Microbiology**. v. 92, p. 737–744, 2002.

PAPANIKOLAOU S.; GALIOTOU-PANAYOTOU M.; FAKAS S.; KOMAITIS M.; AGGELIS, G. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. **Bioresource Technology**. v. 99, n. 7, p. 2419-2428, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. **Lipid Technology**. v. 21, p. 83–87, 2009.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Micobiologia**. São Paulo, Mc Grawhill do Brasil, v. 1, p. 556, 1981.

PENG, X.; CHEN, H. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis sp.* from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 3885-3889, 2008.

PEREIRA-SOARES, V. L.; SIMONE, S. S. **Aproveitamento de Sub-produtos de Biodiesel: Preparação de Monoéster de Glicerina e Ácido Dodecanóico na Presença de Derivados de Nióbio**. 2007.

POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy Journal**. v. 35, p. 5393–5398, 2007.

PUTTI, F. F.; LUDWIG, R.; MACINI, N. Análise da viabilidade da produção de biodiesel a partir do uso do algodão. **VIII Fórum Ambiental da Alta Paulista**. v. 8, n. 7, p. 127-142, 2012.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. 2a edição Edunisc, p. 168, 2004.

PYLE, D. J.; GARCIA, R. A.; WEN, Z. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 56, n. 11, p. 3933-9, 2008.

QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral Com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; RAVI KUMAR, M. N. V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**. v. 113, p. 189-207, 2006.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de Biodiesel: Uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1374-1380, 2007.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 37, p. 44-51, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. **Biologia Vegetal**. 6a edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2002.

SÁ PARENTE, E. J. **Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado**. Ed. Tecbio, p. 66, 2003.

SANTOS, J. C.; LEAL, I. R.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; FERNANDES, G.; W.; TABARELLI, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical Forest. **Tropical Conservation Science**. v. 4, p. 276-286, 2011.

SCIENCEDAILY, L. B. N. L. **Plastics From Biomass Inexpensive Method For Removing Oxygen From Biomass Discovered**. 2009.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clinico-laboratoriais da micologia medica.**: Guanabara Koogan, p. 171-190, 1999.

SCHIPPER, M. A. A.; SAMPSON, R. A.; STAPLERS, J. A. **Zygosporangium Ornamentation in the Genera Mucor and Zygorhynchus**. 1975.

SHAMS YAZDANI, S.; GONZALEZ, R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. **Metabolic Engineering**. v. 10, n. 6, p. 340-51, 2008.

SILVA, F.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; GARRE, V. Distinct *white collar-1* genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. **Molecular Microbiology**. v. 61, p. 1023–1037, 2006.

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

SMITH, S. A.; MUTCH, N. J.; BASKAR, D.; ROHLOFF, P.; DOCAMPO, R.; MORRISSEY, J. H. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. **Proceedings of the National Academy Sciences**. v. 103, p. 903-908, 2006.

SUN, F.; CHEN, H. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 5474–5479, 2008.

TORRES-MARTINEZ, S.; RUIZ-VASQUEZ, R.; GARRE, V.; LOPEZ-GARCIA, S.; NAVARRO, E.; VILA, A. Molecular Tools for Carotenogenesis Analysis in the Zygomycete *Mucor circinelloides*. **Methods in Molecular Biology**. v. 898, p. 85-107, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTATHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3a Ed. São Paulo: Atheneu, p. 421-422, 1999.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from Biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**. v. 22, n. 2, p. 261-265, 2005.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses**. Monografia do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (2008).

UBRABIO - União Brasileira do Biodiesel. O biodiesel e sua contribuição ao desenvolvimento brasileiro. Ubrabio/Fundação Getúlio Vargas. p. 36, 2010.

UMPIERRE, P. A.; MACHADO, F. Gliceriquímica e Valorização do Glicerol. **Revista Virtual de Química**. v. 5, n. 1, p.106-116, 2013.

VALKO, M.; MORRIS, H. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**. v. 11, n. 1161–1208, 2005.

VELAYOS, A.; ESLAVA, A. P.; ITURRIAGA, E. A. A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. **European Journal of Biochemistry**. v. 267 p. 5509–5519, 2000.

VELAYOS, A.; BLASCO, J. L.; ÁLVAREZ, M. I.; ITURRIAGA, E. A.; ESLAVA, A. P. Blue-light regulation of the phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. **Planta**. v. 210. p. 938–946, 2000.

VIEIRA, B. M. **Síntese do biodiesel para obtenção do álcool alílico**. Pelotas: Ufpel, 2011.

VULTOS, D. A. A. N. **Desenvolvimento Sustentável: A utilização do Biodiesel no Concelho do Seixal**. Dissertação Mestrado - Fcsh, cap. 1, 2012.

WANG, C.; LIU, Q.; HUO, W. J.; YANG, W. Z.; DONG, K. H.; HUANG, Y. X.; GUO, G. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**. v. 121, p. 15-20, 2009.

WANG, X. Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advanced**. v. 19, p. 201–223, 2001.

WELBAUM, G. E. Natural defense mechanisms in seeds. In: BASRA, A.S. (ed.). **Handbook of Seed Science and Technology**. Food Product Press: An Imprint of the Haworth Press, p. 451-473, 2006.

WOLF, A. M.; ARNAU, J. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter in recombinant protein production. **Fungal Genetics and Biology**. v. 35, p. 21–29, 2002.

XIA, C.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides* **Biotechnology for Biofuels**. v. 4, n. 15, p. 1-10, 2011.

YANG, Z. X.; ZHOU, Y. N.; YANG, Y.; JIN, D. J. Polyphosphate binds to the principal sigma factor of RNA polymerase during starvation response in *Helicobacter pylori*. **Molecular Microbiology**. v. 77, p. 618-627, 2010.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 18, p. 213-219, 2007.

YU, B. P. Cellular Defenses against Damage from Reactive Oxygen Species. **Physiological Reviews**. v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

ZUO, Y.; XING, D.; REGAN, J. M.; LOGAN, B. E. Isolation of the Exoelectrogenic Bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by Using a U-Tube Microbial Fuel Cell. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 10, p. 3130–3137, 2008.

ZHANG, Y.; DUBE, M.A.; MCLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**. v. 89, p. 1–16, 2003.

ZHENG, Y.; CHEN, X.; SHEN, Y. Commodity Chemicals Derived from Glycerol, an Important Biorefinery Feedstock. **Chemical Reviews**. v. 108, p. 5253-5277, 2008.

ZHOU, C.; BELTRAMINI, J. N.; FAN, Y.; LU, G. Q. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chemical Society Reviews**. v. 37, n. 3, p. 527–549, 2008.

CAPÍTULO 2

Molecules **2014**, *19*, 1-x manuscripts; doi:10.3390/molecules180x0000x

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Artigo

Valorização Biotecnológica de Glicerol Cru Extraído de Biodiesel para produção de Biomassa e Lipídeo Unicelular (SCO) por *Mucor circinelloides* UCP 050 Isolado de Manguezal

Cinthya Barbosa da Silva^{1,2}; Marcos Antônio Cavalcanti Luna²; Adriana Ferreira de Souza²; Maria Helena Menezes Estevam Alves²; Layla Carvalho Mahnke²; Kaoru Okada²; Carlos Alberto Alves da Silva²; Galba Maria de Campos-Takaki^{2*} and Aline Elesbão do Nascimento²

¹ Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50.050-900 Recife - PE, Brasil; prof_cinthya@hotmail.com (C.B.S.);

² Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 50050-590, PE, Brasil; E-Mails: macluna@bol.com (M.A.C.L.); maria@helena.bio.br (M. H. M. E. A.); laylacm@gmail.com (L. C. M.) kao@unicap.br (K. O.); elesbao@unicap.br (A.E.N.); galba_takaki@yahoo.com.br (G.M.C.T.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: galba_takaki@yahoo.com.br; Tel.: +55-81-2119-4044; Fax: +55-81-2119-4043.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract

Este estudo refere-se à avaliação dos efeitos do resíduo de glicerol, derivado de biodiesel, utilizado como substrato para produção de biomassa, lipídeo unicelular e na composição de ácidos graxos do fungo *Mucor circinelloides*, isolado de manguezal (Pernambuco, Brasil). Estudos foram realizados com as enzimas superóxido dismutase,

catalase e glutathione-S-transferase em relação aos efeitos tóxicos da utilização do glicerol residual (GR). Os resultados utilizando a coloração sudan black revelou corpos de inclusão de lipídios e um aumento na ramificação micelial relacionado ao glicerol residual presente e sua concentração. Na concentração de 8% do GR observou-se um rendimento na produção de biomassa de 11,83g /L , em comparação com 5,62 g/L e 5,515 g/L utilizando glicose e glicerol comercial (GC), respectivamente. Um teor de lipídeo unicelular de 52,91% foi obtido em 8 % de glicerol residual, e mostrou o ácido ω 3Linolênico (C18:3) (45,4%) como o principal ácido graxo a partir de biomassa. Atividades de 67 U/mg de proteína , 65 U/mg de proteína e 0.744U/mg de proteína foram obtidas para as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione-S-transferase, respectivamente, em 8 % de concentração do GR. Estes dados apontam uma utilização eficiente do resíduo para a produção de biomassa, ácidos graxos e lipídeo unicelular, recursos valiosos para a própria produção de biodiesel. Estes dados são também de grande importância uma vez que se baseia na utilização de um isolado nativo da caatinga.

Palavras-chave: *Mucor circinelloides*; glicerol; biodiesel; biomassa; lipídeos; resposta a estresse; Manguezal

1. Introdução

Nas últimas décadas, a humanidade percebeu que a elevação dos preços do petróleo, as emissões decorrentes do uso deste combustível e de sua finitude teria de ser confrontado com uma nova perspectiva para a procura de alternativas para os derivados de petróleo. Como alternativa a essa problemática, aparecem os biocombustíveis, sendo o biodiesel considerado um excelente substituto para o petróleo. O biodiesel é um combustível renovável, compatível com as atuais demandas mundiais ambientais e comerciais, apresentando toxicidade reduzida [1]. Sua estrutura química corresponde a ésteres mono-alquílicos de óleos vegetais ou de gorduras animais, sendo produzido por transesterificação com um álcool mono-hídrico, o que resulta em ésteres de alquilo de ácidos graxos e glicerol, como os principais produtos líquidos [2,3]. O teor de glicerol no glicerol residual equivale a 27%-28% em peso, com uma concentração de metanol, que pode variar de 6,2% a 12,6% em peso [4,5].

A demanda crescente da indústria de biodiesel criou um excedente de glicerol, resultando em uma grande quantidade deste resíduo com um impacto significativo sobre o preço do glicerol refinado. Por isso, a necessidade de encontrar abordagens eficientes para converter os resíduos de glicerol em produtos mais desejáveis é urgente e necessária [1,6]. Exemplos de possíveis processos de produção com base no glicerol residual demonstram que o mesmo é uma fonte abundante e promissora para a produção de produtos com valor agregado, o que poderia melhorar a viabilidade econômica da indústria de biodiesel [7].

Vários estudos abordam a identificação de possíveis utilizações do glicerol bruto para produção de diferentes produtos químicos, como o Hidrogênio [8], aditivos para combustíveis automotores [9], o etanol [10] ou metanol [11]. Outros usos potenciais para o glicerol bruto são: como suplemento alimentar animal [12], codigestão [13], co-gaseificação [14] e no tratamento de resíduos [15,16]. Recentemente, o governo brasileiro definiu as normas para o uso de glicerina da produção de biodiesel como complemento de ração animal.

Uma aplicação promissora deste subproduto é utilizá-lo como fonte de carbono na microbiologia industrial para produção de outros produtos químicos valiosos, como por exemplo, a dihidroxiacetona, ácido succínico, ácido propiônico, ácido cítrico, pigmentos, polihidroxicano, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, poliésteres, ácido láctico, poligliceróis, e biossurfactantes entre outros [17-21].

Outra alternativa para valorização do glicerol bruto é a sua biotransformação por leveduras oleaginosas e fungos filamentosos em lipídios e ácidos graxos (Lipídeo Unicelular – Single Cell Oil), considerando-se que os lipídios microbianos poderiam contribuir para a cobertura da crescente demanda industrial de óleos e gorduras, e podendo, ainda, ser aplicado na produção de biodiesel, uma vez que a sua estrutura e composição, são semelhantes às dos óleos vegetais comuns [22-26].

Alguns estudos sobre as respostas antioxidantes apontam uma interação entre as condições de cultura, relacionado a fontes de carbono (fermentáveis e não fermentáveis), e os sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos de fungos filamentosos e leveduras [27,28]. A expressão de enzimas oxidativas em organismos aeróbios, e a consequente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila são subprodutos do metabolismo normal. As células são capazes de lidar com insultos ambientais usando maquinário enzimático específico e os componentes não enzimáticos para se proteger e para manter o estado redox celular. O sistema enzimático de

defesa consiste normalmente de pequenas moléculas solúveis em meios aquosos ou oleosos, que removem o radical livre a partir da solução. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade do superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), para minimizar os efeitos tóxicos dos radicais livres formados. A peroxidação lipídica também é uma resposta fisiológica relacionada com a resposta ao stress e enzimas antioxidantes [29,30].

Os microrganismos desempenham um papel significativo no solo e sua diversidade pode ser usada como um parâmetro básico na implementação de ações de gestão em áreas prioritárias para a conservação e proteção. A bioprospecção em locais pouco explorados, tais como terras de mangue, tem sido relevante para a descoberta de novos sistemas biológicos e seus compostos para a pesquisa biotecnológica e industrial [31]. *Mucor circinelloides* pertence à ordem dos Mucorales e é um fungo dimórfico que cresce como levedura na forma anaeróbica e como fungo filamentoso aerobicamente [32, 33]. O fungo é também capaz de germinar e crescer em uma ampla variedade de fontes de carbono no meio líquido sintético [34]. A espécie apresenta um elevado potencial para aplicações biotecnológicas na produção de etanol, lipases [35] e celulases [36]. Alguns estudos relatam a produção de ácidos graxos pela espécie, o que poderia ser usado como uma fonte adequada de ácidos graxos poli-insaturados. *M. circinelloides* é capaz de acumular lípidos quando cultivado em diversas fontes de carbono, e vários destes lípidos podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel [36]. A adequação deste fungo como um modelo fúngico lipogênico também se baseia na descoberta de seu amplo repertório de ferramentas moleculares associadas, incluindo a transformação genética usando plasmídeos auto-replicativos [37] e mediação por *Agrobacterium* [38], electroporação [39], e polietileno glicol [40]. Além disso, sua seqüência genômica está disponível, possibilitando abordagens genômicas.

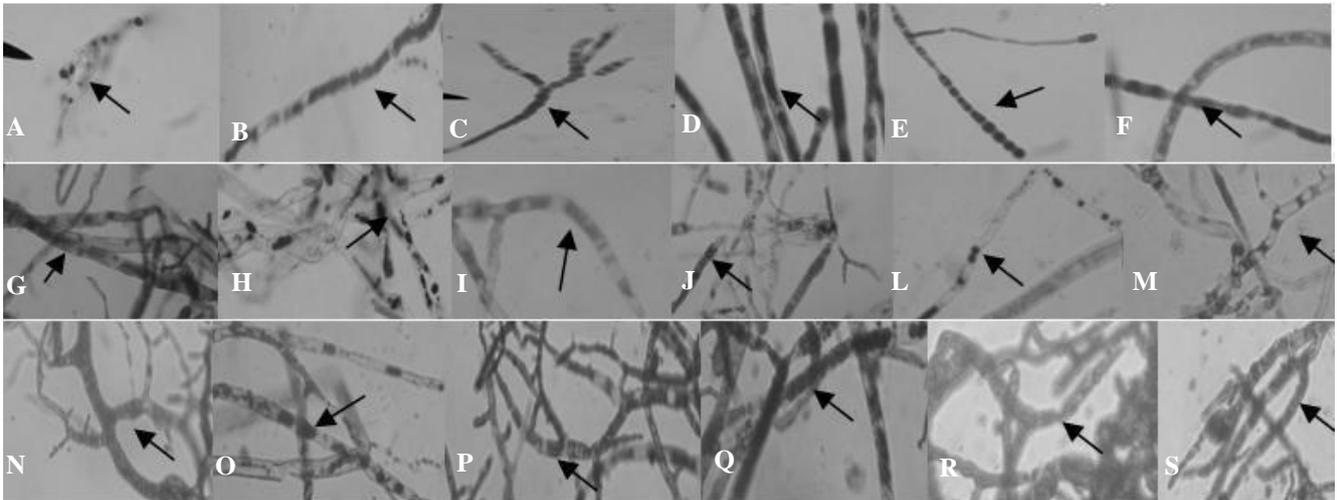
Neste trabalho, os efeitos do glicerol residual do biosiesel sobre o aumento de biomassa, na produção de lipídeo unicelular (ácidos graxos e lipídeos), e resposta enzimática anti-oxidante foram investigados em uma cepa de *Mucor circinelloides* isolado em Pernambuco de sedimento de manguezal.

2. Resultados e Discussão

2.1. Análise qualitativa de lipídeos através do método Sudan black e avaliação morfológica

A utilização da coloração com Sudan black em micélios de *M. circinelloides* cultivados em glicose, glicerol puro e glicerol refinado pode revelar a presença de de lipídeos sob a forma de corpos de inclusão de cor escura (Figura 1).

Figura 13. Coloração do micélio de *Mucor circinelloides* com sudan black. A-C – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicose, 3 dias; D-F – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicose, 5 dias; G-I – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicerol comercial, 3 dias; J-L – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicerol comercial, 5 dias; M-O – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicerol residual, 3 dias; P-R – cultivo em 2%, 4% e 8% de glicerol residual, 5 dias. X40.



Uma análise das micrografias revela que, em todas as condições de cultura, há uma forte coloração de corpos lipídicos. No entanto, é possível notar que o crescimento do fungo em glicose gerou um micélio homogêneo, com longas hifas, com as inclusões de lipídios homogeneamente distribuídas. Por outro lado, o crescimento em glicerol resultou em micélio heterogêneos, intensa ramificação lateral e apical e inclusões de lipídios mais difusas e dispersas no citoplasma celular. A intensidade destas alterações é relacionada com a concentração de fonte de carbono e é mais elevada em culturas cultivadas em glicerol bruto. A coloração de corpos lipídicos de fungos usando o sudan black foi descrita pela primeira vez por Burdon (1946) [41]. Desde então, o corante tem sido usado para revelar a presença de inclusões de lipídios como uma análise qualitativa para o rastreamento e avaliação da capacidade de células microbianas para acumular lipídios [42, 43, 44].

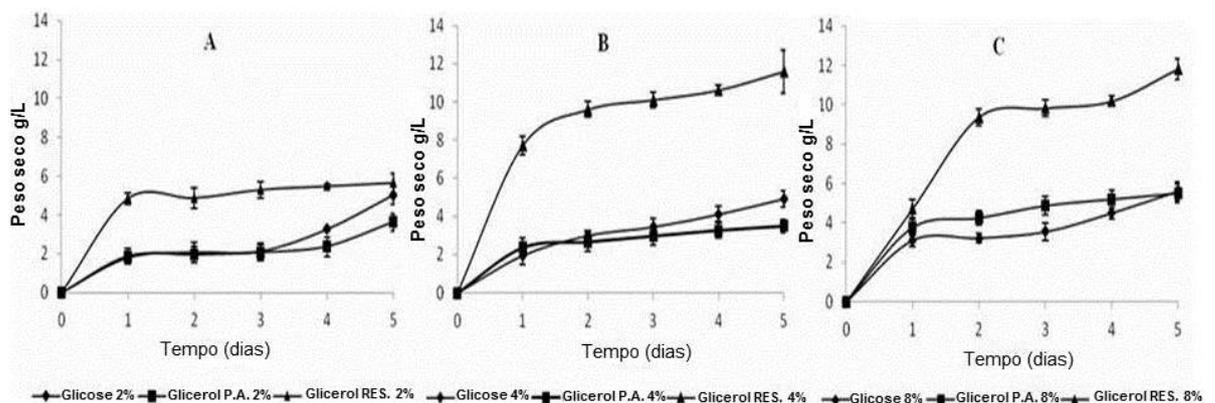
O uso de Sudan Black para corar inclusões lipídicas em *M. circinelloides* foi avaliado em glicose em 3% e avicel, demonstrando resultados semelhantes aos obtidos neste estudo [36]. No entanto, este trabalho revelou as alterações relacionadas ao padrão de ramificação, incomum em hifas de células cultivadas na presença de glicerol. Uma busca na literatura não mostrou dados relacionados aos efeitos de glicerol na morfologia microbiana, sendo este estudo o primeiro a revelar tais modificações.

Hifas ramificadas aumentam a área de superfície da colônia, o que resulta em um aumento da assimilação de nutrientes e media a fusão de hifas, processo importante para a troca de nutrientes e de sinais entre as diferentes hifas da mesma colônia [45]. De acordo com estes dados, os padrões de ramificação observada em *M. circinelloides* cultivados em glicerol podem estar relacionados com o aumento da assimilação da fonte de carbono não fermentável e para a troca de nutrientes, mantendo o crescimento e o desenvolvimento fungico.

2.2. Efeitos de glicerol residual na massa seca, biomassa e produtividade de lipídeo unicelular e perfil de ácidos graxos de *Mucor circinelloides*

Os resultados apresentados na figura 14 apresentam as curvas de crescimento de *M. circinelloides* com base no peso seco de micélio obtido após 5 dias, a 28°C. Os resultados demonstram os efeitos da glicose, glicerol comercial e glicerol residual durante o crescimento celular.

Figura 14. Crescimento do *M. circinelloides* de acordo com o peso seco em glicose (w / v), glicerol comercial (v / v) e glicerol residual (v / v) a 2% (A), 4% (B) e 8% (C).



Observa-se que o fungo pode crescer em todos os três meios e produz uma quantidade significativa de biomassa. A partir dos resultados é claramente observado um aumento

progressivo no peso seco, em todas as condições testadas. Os efeitos da fonte de carbono foram relacionados com as concentrações utilizadas. Quando as células foram cultivadas em fontes de carbono a 2%, o rendimento de biomassa foi de 5,66 g/L em glicerol residual, 5,04 g/L em glicose e 3,64 g/L em glicerol comercial, indicando uma redução do rendimento da biomassa seca de 10,9 % e 35,7 % , respectivamente para glicose e glicerol comercial. Um comportamento semelhante foi observado para as células cultivadas nas fontes de carbono em concentração de 4 %. Reduções de 57,5 % e 69,8 % foram determinados para a glicose (4,93 g/L) e glicerol comercial (3,5 g/L) em relação ao glicerol residual (11,59 g/L). O rendimento máximo de biomassa foi obtido com glicerol residual de 8%, rendendo 11,83 g/L em comparação com 5,62 g/L e 5,66 g/L para a glicose e glicerol comercial, respectivamente, indicando uma redução de peso seco superior a 50%.

Os resultados para a produtividade de biomassa e de lipídeo unicelular de *M. circinelloides* cultivados em meios contendo glicose, glicerol residual e glicerol comercial são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Biomassa e Produtividade lipídica de *Mucor circinelloides* cultivado em diferentes concentrações de glicose (w/v), glicerol comercial (v/v) e glicerol residual (v/v)

		Densidade da Biomassa (g L ⁻¹)	Produtividade de Biomassa (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	Lipídeos (g/g biomassa)	Lipídeos (g L ⁻¹)	Lipídeos (%)	Produtividade de lipídeos (g L ⁻¹ dia ⁻¹)
Glicose	2%	5,04	0,81	0,182	0,92	18,25	0,15
	4%	4,93	0,74	0,158	0,78	15,90	0,12
	8%	5,62	0,62	0,159	0,90	16,01	0,10
Glicerol Comercial	2%	3,64	0,44	0,105	0,40	10,10	0,04
	4%	3,5	0,33	0,08	0,30	8,57	0,03
	8%	5,52	0,43	0,111	0,61	11,05	0,05
Glicerol Residual	2%	5,66	0,45	0,176	1,00	17,67	0,08
	4%	11,59	0,97	0,484	5,6	48,32	0,47
	8%	11,83	1,78	0,529	6,26	52,91	0,94

O crescimento em glicerol residual, glicose e glicerol comercial resultou em mudanças no rendimento de lipídeo unicelular celular e na produtividade de biomassa. A menor produtividade lipídica e de biomassa foi obtida em cultivos contendo glicerol comercial. O cultivo na presença de glicose gerou uma produtividade de lipídeos de aproximadamente 20%. Por outro lado, o isolado quando cultivado em glicerol residual apresentou maior produtividade lipídica; 48,32% e 52,91% para 4% e 8%, respectivamente. Em comparação

com glicose e glicerol comercial a 4%, aumentos de 67% e 82% foram obtidos, respectivamente. *M. Circinelloides* quando cultivado em 8% de glicose e glicerol comercial apresentaram reduções 69% e 79% na produtividade de lipídeo unicelular quando comparados ao cultivo em glicerol residual. Estes resultados mostram que a estirpe do manguezal é promissor na assimilação do glicerol residual para produzir um rendimento elevado de biomassa e acumulação de quantidades significativas de lipídeo unicelular. Por meio da cromatografia gasosa, foi obtido o perfil de ácidos graxos de *M. circinelloides* cultivado em glicose, glicerol comercial e glicerol residual. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Alterações na composição de ácidos graxos dos lipídeos totais de *Mucor circinelloides* cultivado em glicose (w/v), glicerol comercial (v/v) e glicerol residual (v/v)

Ácidos Graxos	Glicose			Glicerol Comercial			Glicerol Residual		
	2%	4%	8%	2%	4%	8%	2%	4%	8%
(C14:0)									
Ácido Mirístico (C16:0)	4.3	5.37	3.79	1.91	nd	2.02	nd	0.14	0.12
Ácido Palmítico (C18:0)	24.4	20.7	17.7	23.3	29.5	2.6	18.3	20.1	16.4
Ácido Estearico (C18:1)	8.87	13.9	17.1	12.7	9.96	10.4	5.21	2.78	2.86
Ácido Oleico (C18:2)	36.8	33.3	32.1	36.8	33.4	38.8	20.8	17.8	33.6
Ácido Linoleico (C18:3- ω -3)	13.5	15.7	13.8	16.1	23.7	9.15	51.6	54.5	nd
Ácido Linolênico Omega3 (C18:3- ω -3)	4.7	5.77	5.46	8.68	nd	12.7	3.47	3.56	45.4
Ácido Linolênico Omega6 (C18:3- ω -6)	0.3	0.32	0.33	0.3	3.21	0.71	0.49	0.02	0.01
Ácido Araquídico (C20:1)	nd	nd	0.61	nd	nd	nd	nd	0.17	0.25
Ácido Eicosenoico (C22:0)	nd	nd	0.67	nd	nd	nd	nd	0.22	0.17
Ácido Behênico (C22:1)	1.54	nd	0.75	nd	nd	nd	nd	0.15	0.21
Ácido Erúxico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.67
Outros	5.26	4.94	7.69	0.21	0.23	0.22	0.13	0.56	0.31
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100

A análise FAME nas amostras de *M. Circinelloides* revelou quantidades significativas de ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico e ácido linolênico. No entanto, a composição de cada um dos ácidos graxos foi diversa em função do tipo de fonte de carbono e da concentração utilizada no meio de cultura. O crescimento em glicerol comercial rendeu o maior teor de ácido oleico (C18:1) e o ácido palmítico (C16:0). Glicerol residual como fonte de carbono rendeu o maior teor de ácido linoleico (C18:2) em concentrações de 2% (51,5%) e 4% (54,5%). O conteúdo de α -linolênico (C18:3- ω -3) em 8% de glicerol residual atingiu 45,4%.

Atualmente, uma grande preocupação para os produtores de biodiesel é a produção de glicerol bruto como um produto residual. Como a produção de biodiesel tem subido, o mercado atual tem sido inundado com o excesso de glicerol [46].

Formas alternativas para usar esse excesso de glicerol bruto se tornam importantes com a expansão da produção de biodiesel. Se um método de baixo custo para o consumo deste glicerol bruto for encontrado, não refinar o biodiesel seria um processo mais lucrativo [36].

Vários investigadores têm estudados os efeitos de glicerol de biodiesel para promover o rendimento de biomassa e a produtividade de lipídeo unicelular utilizando células microbianas, revelando a viabilidade do glicerol residual de biodiesel como um substrato de carbono alternativo à glicose para o cultivo de microorganismos, e conseqüente redução dos custos em relação a glicose para produção e acúmulo de lipídeos [47-50]. Apesar das diferenças em dados relacionados com a espécie microbiana, a concentração de glicerol e a origem do resíduo, um aumento significativo no conteúdo de biomassa e de lipídeo unicelular é relatado quando do uso do glicerol residual como fonte alternativa de carbono em meio de cultura [51-55].

Células de fungos filamentosos têm vantagens sobre outros microorganismos para a produção de lipídios, devido ao seu maior volume celular, o que permite maior síntese e capacidade de armazenamento e sua utilização para a produção de produtos e processos de valor na indústria biotecnológica [56].

M. circinelloides é filogeneticamente próximo de dois outros fungos lipogênicos amplamente estudados: *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabellina*, ambos relatados como excelentes acumuladores de altos níveis de lipídios (60 a 70% w/w da massa celular seca) [57]. Além disso, a conversão microbiana de biomassa em biocombustíveis é uma via atrativa para o desenvolvimento de biocombustível, porque alguns microorganismos, incluindo o *Mucor circinelloides*, são capazes de acumular os lípidos através do crescimento em açúcares liberados a partir do pré-tratamento da biomassa, resultando no potencial uso desses lipídios como matéria-prima para a produção de biodiesel [58-60].

Alguns estudos têm demonstrado que as estirpes de *M. circinelloides* podem utilizar glicose, xilose [61], ácido acético [62, 63], e o resíduo hidrolisado de vários resíduos agroindustriais [64-66] como fontes de carbono. Ademais, algumas pesquisas apontam a glicose como o fator mais importante na produção de lipídios em microrganismos oleaginosos [67-69]. No entanto, quando a concentração de glicose aumenta um efeito inverso sobre a

produtividade de lipídios é observado, devido ao aumento do potencial osmótico do meio [70]. Este efeito não foi observado na estirpe de *M. circinelloides* utilizada neste estudo, uma vez que o aumento de glicose rendeu uma maior produção de biomassa e de lipídeos. No entanto, o perfil de ácidos graxos do lipídeo microbiano produzido e o seu conteúdo foram afetados pela fonte de carbono utilizada.

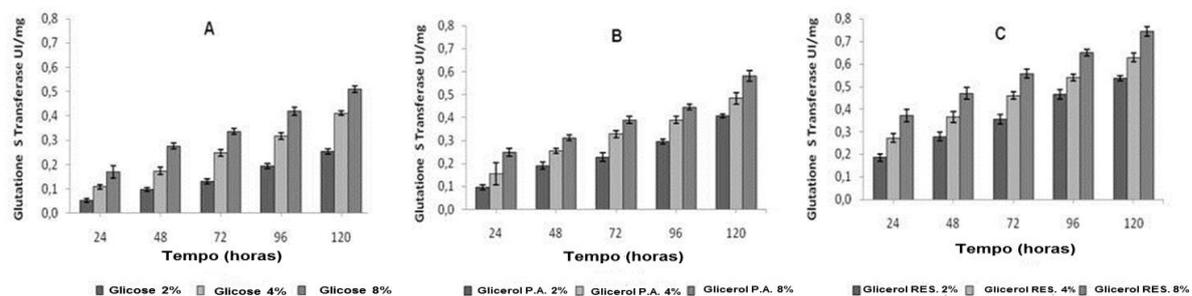
O perfil de FAME encontrado neste trabalho é consistente com a literatura e está intimamente relacionado àqueles obtidos para *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabellina*, com a exceção da forte presença de C14 [71].

Este estudo conseguiu identificar um isolado nativo de *Mucor circinelloides* com potencial para acumular lipídeos e que pode encontrar aplicação na produção ácidos graxos a partir de glicerol residual do biodiesel. A cepa foi capaz de crescer em abundância e rapidez em glicerol e acumular lipídios, o que pode ser traduzido como um organismo potencial na conversão de biomassa em biocombustíveis.

2.3. Efeito da glicose, glicerol comercial e glicerol residual em enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica em *Mucor circinelloides*

O efeito da glicose, glicerol comercial, e glicerol residual, como fontes de carbono, no sistema de defesa antioxidante representado pelas enzimas glutatona-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e na peroxidação lipídica (LPO) de *Mucor circinelloides* foram investigados. Os resultados são apresentados nas Figuras 15-17.

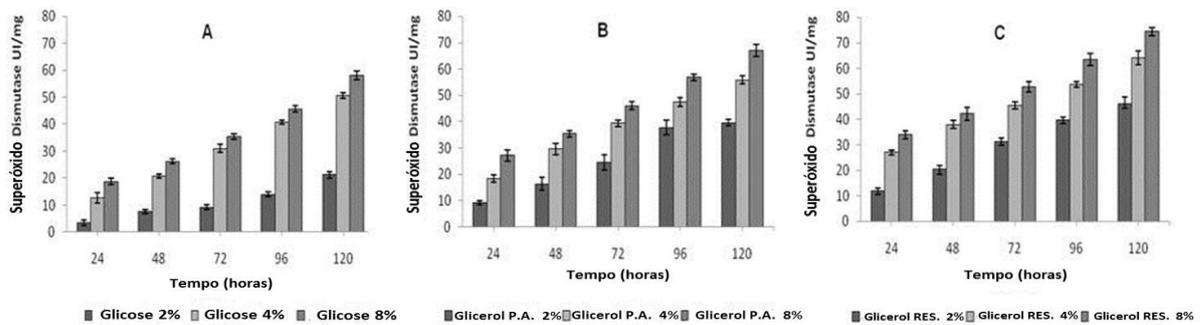
Figura 15. Atividade da enzima glutatona-S-transferase de *M. circinelloides* cultivado em diferentes concentrações de glicose (A), glicerol comercial -PA (B) e glicerol residual (C) durante 120 horas a 28 °C e 150 rpm.



O crescimento em glicose resultou em atividades de 0.254 IU/mg de proteína, 0.412 IU/mg de proteína e 0.5 IU/mg de proteína para 2%, 4% e 8%, respectivamente. O aumento

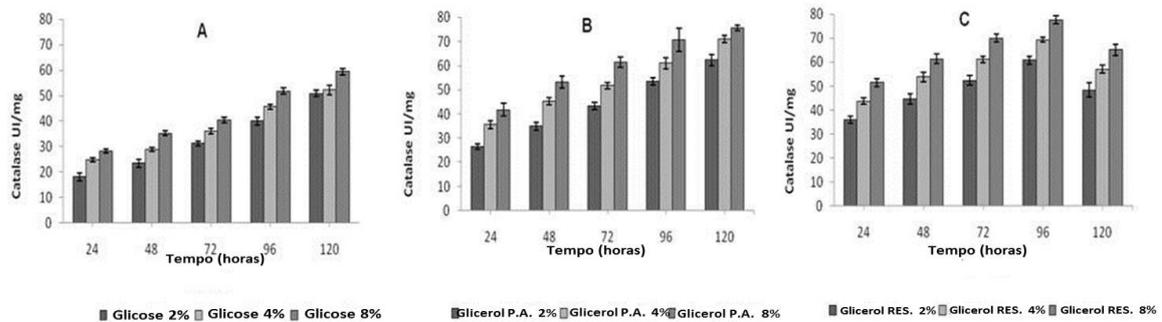
foi relacionado ao tempo de incubação. Resultados semelhantes foram obtidos para o glicerol comercial e glicerol residual, o que rendeu 0,408 UI/mg de proteína, 0,484 UI/mg de proteína e 0.582 UI/mg de proteína em glicerol comercial e 0,536 UI/mg de proteína, 0,628 UI/mg de proteína e 0.744 UI/mg de proteína em glicerol residual nas concentrações de 2%, 4% e 8%, respectivamente. Os resultados revelaram reduções de 52%, 34% e 31% na atividade da enzima em 2%, 4% e 8% de glicose em comparação com as atividades de glicerol residual. A atividade da enzima em células cultivadas em glicerol comercial foi reduzido em 23%, 22% e 21%, respectivamente, nas concentrações de 2%, 4% e 8%.

Figura 16. A atividade da enzima superóxido dismutase de *M. circinelloides* cultivado em diferentes concentrações de glicose (A), glicerol comercial - PA (B) e glicerol residual (C) durante 120 horas a 28 °C e 150 rpm.



Os resultados mostram que a atividade SOD atingiu um pico em 120 horas de cultivo em todas as condições testadas e foi maior em células cultivadas na presença de glicerol residual. O total de atividade da enzima em glicose foi de 21.2 IU/mg de proteína, 50,6 UI/mg de proteína e 58 UI/mg de proteína para as concentrações de 2%, 4% e 8%, respectivamente. Em glicerol comercial – PA, atividades correspondentes a 39.6 IU/mg de proteína, 55.8 IU/mg de proteína e 67 IU/mg de proteína foram determinadas nas concentrações 2%, 4% e 8%. Com o cultivo em glicerol residual valores de 46 IU/mg de proteína, 64 UI/mg de proteína e 74,4 UI/mg de proteína foram determinadas para as concentrações de 2%, 4% e 8%, respectivamente. A atividade da SOD aumentou consideravelmente nas células cultivadas em glicerol residual, apresentando reduções de 53% e 13%, 20,9% e 12,8%, e 25% e 13% nas células cultivadas em glicose e glicerol comercial nas concentrações de 2%, 4% e 8%, respectivamente.

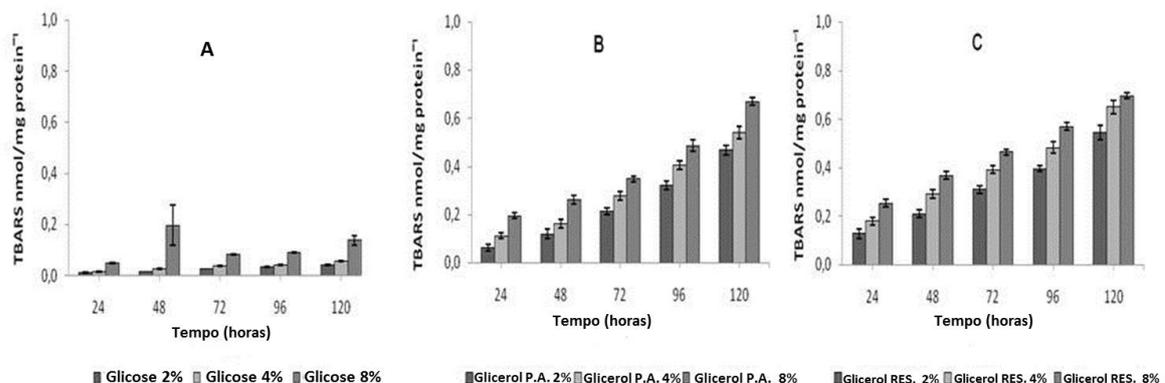
Figura 17. Comportamento da atividade da catalase de *M. circinelloides* cultivado em diferentes concentrações de glicose (A), glicerol comercial - PA (B) e glicerol residual durante 120 horas a 28 °C e 150 rpm.



Como mostrado na figura, a atividade de CAT aumentou significativamente durante o crescimento do *M. circinelloides*. A atividade mais elevada da enzima foi obtida no cultivo em glicerol comercial, rendendo 62,4 UI/mg de proteína em 2%, 71 IU/mg de proteína a 4% e 75.6 IU/mg de proteína a 8%, respectivamente. Em glicose nas concentrações de 2%, 4% e 8% de glicose, foram determinadas atividades de 50.8 IU/mg de proteína, 52.2 IU/mg de proteína e 59.4 IU/mg de proteína. Para células cultivadas em glicerol residual atividades de 48,45 IU/mg de proteína, 57.05 IU/mg de proteína e 65.15 IU/mg de proteína foram obtidas para as concentrações de 2%, 4% e 8%, respectivamente.

Os resultados obtidos para a influência da fonte de carbono sobre os níveis de peroxidação lipídica são apresentados na figura 18.

Figura 18. Nível de peroxidação lipídica, em *Mucor circinelloides* cultivado em diferentes concentrações de glicose (A), glicerol PA (B) e de glicerol residual (C) durante 120 horas a 28 °C e 150 rpm.



O nível de LPO mais baixo foi determinado para as células cultivadas em glicose em comparação com glicerol comercial e residual. No entanto, o LPO aumenta com a concentração da fonte de carbono. Os níveis de LPO determinados para a glicose a 2% , 4% e 8% correspondem a 0,043 nmolMDA/mg de proteína, 0,05 nmolMDA/mg de proteína e 0,138 nmolMDA/mg de proteína, respectivamente. Para glicerol comercial, 0,47 nmolMDA/mg de proteína, 0,54 nmolMDA/mg de proteína e 0,67 nmolMDA/mg de proteína foram obtidos nas concentrações de 2 %, 4 % e 8 %. Os níveis mais elevados de LPO foram determinados em células cultivadas em glicerol residual e corresponderam a 0,54 nmolMDA/mg de proteína, 0,65 nmolMDA/mg de proteína e 0,7 nmolMDA/mg de proteína, para 2%, 4% e 8%, respectivamente.

A maior parte das descobertas que levaram a uma maior compreensão do papel biológico das enzimas antioxidantes foram obtidos em estudos realizados com bactérias, leveduras e eucariotos complexos. Os fungos filamentosos são adequados para estudos acerca das enzimas SOD, CAT e GST devido as suas vantagens potenciais como micélio abundante e respiração intensa que são pré-requisitos para a geração de espécies reativas de oxigênio [72].

As células microbianas podem alterar o seu comportamento metabólico, dependendo da natureza da fonte de carbono [73]. A captação de glicerol pode ser efetuada por difusão passiva, embora os sistemas de transporte ativos sejam descritos em algumas leveduras, agindo principalmente em condições de stress osmótico. As alterações no transporte e concentrações da fonte de carbono afetam o metabolismo da energia, especialmente o transporte de eletrons na membrana mitocondrial interna, processo no qual a maior quantidade de ROS celulares é gerada, podendo resultar em variações na atividade das enzimas antioxidantes [72].

Atividade de GST foi identificada em quase 30 espécies de fungos, entre tais organismos destacam-se *Mucor circinelloides* (anteriormente *M. javanicus*) [74,75], *Fusarium oxysporum*, *Issatchenkia orientalis* [76], *Phanerochaete chrysosporium*, [77] e *Yarrowia lipolytica* [78]. *Mucor circinelloides* variavelmente expressa duas isoenzimas da glutathione S-transferase. Variações na expressão de isoenzimas individuais podem ser uma resposta seletiva a um estímulo químico ou ambiental semelhante ao conhecido em outros eucariotos [72, 73]. Os autores obtiveram as atividades correspondentes a 1,9 U/mg de proteína e 0,96 U/mg de proteína com o cultivo em extrato de malte e glicose a 2%.

Neste estudo, após a suplementação com glicerol, como fonte de carbono alternativa, foi obtido um aumento das atividades de GST, SOD, Catalase e LPO em *M. Circinelloides*. Em um estudo com *Fusarium equiseti* cultivado em glicerol e sacarose, houve um aumento na atividade da SOD e catalase de 88,24% e 293,48 % em 15 g/L de sacarose em comparação com 5 g/L de sacarose, causando um nível de LPO de 96,41%. Em meio suplementado com glicerol, a atividade da SOD aumentou 210%, embora a atividade da CAT tenha diminuído em 48,29% em meio contendo 20 g/L de glicerol em comparação com 5 g/L de glicerol e os níveis de LPO atingiram 13,18%. À luz dos resultados para as fontes de carbono, apesar da menor atividade de SOD e GSH-Px, valores elevados de CAT e níveis inferiores de LPO em meio contendo 15 g/L de sacarose em comparação com 20 g/L de glicerol foram obtidos. Células cultivadas em meio contendo sacarose apresentaram maiores atividades que aquelas cultivadas em glicerol [79].

Maiores atividade de SOD e CAT foram obtidas na presença de maltose 2%, enquanto que nessas condições um nível mínimo de LPO foi observado em *Fusarium acuminato* [80]. O aumento da atividade de SOD foi obtido em glicerina e as concentrações de glicose superiores a 15%, ao passo que a atividade de CAT diminuiu com o aumento da concentração de glicerina e glicose. Uma análise comparativa dos níveis de LPO, determinadas em meio suplementado com glicerina e glicose, revelou um nível mínimo de LPO de 1,88 +/-0,028 nmol de malondialdeído/g em peso húmido de 15 g/L de glicerina [81].

Vários outros trabalhos revelaram os efeitos de fontes de carbono no meio de cultura sobre a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo destas fontes em fungos filamentosos [82-85]. Atividades de SOD e catalase, correspondentes a 44,3 U/mg de proteína na presença de 20% de caldo de batata mais 2% de meio de glicose e 93,7 U/mg de proteína na presença de 20 % de caldo de batata , mais 1 % de meio de glicose, também foram determinadas para o fungo *Cordyceps militaris*, respectivamente [86].

Neste estudo, o tempo da biossíntese das enzimas SOD, GST e CAT equivaleu aos tempos de produção máxima de biomassa. *M. Circinelloides* quando cultivado em glicose apresentou redução na atividade das enzimas antioxidantes e na peroxidação lipídica em relação ao glicerol comercial e ao glicerol residual. As atividades avaliadas aumentaram em função do aumento da concentração de fonte de carbono. Está claramente demonstrado o efeito de fontes de carbono e suas concentrações no sistema antioxidante de *M. circinelloides*.

3. Experimental

3.1 Microorganismo e condições de cultivo

O microorganismo *Mucor circinelloides* UCP 050, isolado de solo de Manguezal mantido no Banco de Cultura do Núcleo de Pesquisa de Ciências Ambientais e Biotecnologia - Universidade Católica de Pernambuco, foi selecionado para o estudo da análise de crescimento em várias concentrações de glicerol residual de biodiesel. A estirpe foi mantida em Agar Dextrose de Batata (PDA) a 5 °C. Para a produção de pré-inóculo, a estirpe foi cultivada em meio de Sabouraud sólido e incubou-se a 28 °C durante 7 dias. Os esporos foram recolhidos e foi preparada uma suspensão.

3.2. Pré-tratamento de glicerol bruto- obtenção do glicerol residual

Glicerol bruto foi obtido no CENTRO DE TECNOLOGIA DO NORDESTE, CETENE (Pernambuco, Brasil), produzido a partir da transesterificação alcalina do óleo de algodão. O glicerol bruto foi submetido a remoção de metanol e correspondeu a 65% de glicerina.

3.3 Determinação da biomassa microbiana seca

Pré-inóculo correspondente a 10 % de uma suspensão de esporos foram inoculados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 150 mL de caldo de Sabouraud contendo a glicose em concentrações de 2%, 4% e 8%, pH 5, e incubados a 28 °C, sob agitação 150rpm por 5 dias. Neste estudo a glicose foi substituída por glicerol residual nas concentrações de de 2%, 4 % e 8%. Glicerol puro de grau laboratorial (glicerol comercial/PA) foi usado como controle. Amostras de micélio foram coletados durante experimento para determinação do crescimento em peso seco celular. As amostras de cada frasco foram filtradas através de um papel de filtro Whatman No.1, pesados e pré-lavados com 25 ml de água destilada. O papel de filtro foi então seco a 90 °C até um peso constante. O peso em seco médio das cinco réplicas foi usada para estabelecer o gráfico correspondente com a curva de crescimento.

3.4 Determinações Bioquímicas

3.4.1 Análise qualitativa de lipídios por coloração Sudan Black

Para a análise da acumulação de lipídios no micélio de *M. circinelloides*, amostras obtidas em todos os tratamentos, correspondentes a 3 e 5 dias de cultivo, foram submetidas a coloração com Sudan black (Burdon 1946). As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído durante 1 hora e usado para preparar um esfregaço micelial. As lâminas foram incubadas em Sudan black (0,3% em etanol a 70%) durante 20 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido e as lâminas foram submetidas à secagem completa. Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com safranina, (solução aquosa a 0,5%) durante 5 a 8 segundos. As lâminas foram lavadas com água destilada e secadas, cobertas com glicerina tamponada e lamínula. Posteriormente, foram observadas em microscópio modelo Nikon Microscópio Alphaphot 2 Y52, e fotografados com uma câmera Nikon FDX-35. Corpos lipídicos e inclusões na cor preta foram observados.

3.4.2 Extração e quantificação de lipídeos

As amostras de micélios liofilizadas (1,0 g) foram extraídas com 20 vol. de clorofórmio/metanol sendo as misturas: 2:1, 1:1 e 1:2 (v/v) [87]. Posteriormente, as amostras foram suspensas em clorofórmio/metanol (2: 1, v/v) e homogeneizadas durante 1 h. O extrato foi separado por centrifugação a 5000 g durante 5 minutos, e o sedimento foi acrescido de clorofórmio/metanol (1:1, v/v) e homogeneizado durante 15 minutos. O extrato foi separado por centrifugação e o sedimento foi ressuspenso em clorofórmio/metanol (1:2, v/v) com agitação constante. Os extratos combinados foram reduzidos quase à secura em um evaporador rotativo. A quantificação de lipídeos é expressa como gramas de lipídeos extraídos por grama de biomassa. A produtividade lipídica também foi avaliada usando a seguinte equação: % de lipídios totais = Lipídeos peso (g)/peso micélio (g) x 100.

3.4.3 Extração e metilação de ácidos graxos

Os ácidos graxo foram convertidos em ésteres metílicos de acordo com o método de Dunlap e Perry (1967) [88]. A biomassa liofilizada (100 mg) foi colocada num tubo de tampa de rosca, misturado com 2 mL de uma solução de trifluoreto de boro em 14% de metanol e 2 mL de benzeno e em seguida incubadas over night a 60 °C. Em seguida 2 mL de água

destilada foram adicionados à mistura e os tubos foram agitados em vórtex durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 1700 xg durante 10 minutos a 40 °C. Após a centrifugação, o benzeno foi removido e evaporado com azoto, enquanto que os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram ressuspensos em n-hexano e analisados por cromatografia em fase gasosa (GC).

3.4.4 Cromatografia em fase gasosa para avaliação de ácidos graxos

As análises foram realizadas num cromatógrafo de gás Varian modelo CP-3380 juntamente com auto-mostrador CP-8200, coluna capilar CP SIL 8CB (30 mx 0,25 mm), utilizando hélio como gás de transporte. A temperatura do injetor e do detector (FID) foi mantida a 250 °C, a temperatura de "forno" foi inicialmente regulada para 130 °C, depois aumentado para 170 °C à razão de 1 a 3 °C/min e foi finalmente mantida isotermicamente a 180 °C durante 10 minutos. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os padrões e as quantidades relativas de éster metílico realizadas pela composição de ácidos graxos celulares - CFA foram calculadas por integração das áreas dos picos. Os padrões de ácidos graxos foram obtidos da Sigma.

3.5 Preparação de amostras para determinação de enzimas antioxidantes

Amostras de 1g de micélio, coletados nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias, foram filtradas, lavadas com água deionizada e misturadas com uma solução contendo cloreto de potássio 1,15% e fluoreto de fenil-metil-sulfanila (inibidor da protease) a uma concentração de 100 mM em isopropanol. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas durante 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada. Os sobrenadantes foram recolhidos e utilizados para determinar as atividades enzimáticas antioxidantes e o nível de peroxidação lipídica.

3.5.1. Catalase (Cat)

A elevada velocidade de reação desta enzima associada a uma menor "afinidade", permite a determinação da sua atividade com concentrações elevadas de H₂O₂ (10 mM). A atividade foi determinada pela taxa de consumo de H₂O₂ no primeiro minuto de reação, com leitura a 240 nm ($\epsilon = 40M^{-1} cm^{-1}$) [89]. É ainda descontado o desaparecimento de peróxido de hidrogênio, sem a presença da amostra. O ensaio de enzima é realizado em tampão de

fosfato de potássio 40 segundos (KP) a 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7, contendo 0,012% de Triton X-100. Como substrato iniciador é utilizado 10 mM de H₂O₂. A linha de base da absorvância é deduzida a partir das leituras da reação na ausência de amostra de teste. Os dados estão expressos em U/mg de proteína. As proteínas foram medidas pelo método de biureto [90].

3.5.2. *Glutathione-S-transferase (GST)*

Conjugação de GSH com substrato de clorodinitrobenzeno (CDNB) catalisada por GST produz um composto que pode ser detectada a 340 nm ($\epsilon = 9600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado [91]. Esta atividade é descontada com a leitura de linha de base da reação obtida pela reação entre a GSH e CDNB, sem a presença da amostra. O ensaio de enzima foi de 5 minutos realizadas em tampão fosfato de potássio (KPI), 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7, contendo 1 mM de GSH. O iniciador foi utilizado como substrato 1 mM CDNB. A absorvância da linha de base foi deduzida a partir das leituras da reação na ausência da amostra de teste. Os dados são expressos como UI/mg de proteína. As proteínas foram medidas pelo método de biureto [90].

3.5.3. *Superóxido dismutase (SOD)*

Atividade da SOD foi medida por redução de Nitroblue de tetrazólio (NBT) [92]. O meio de incubação continha, num volume final de 3,0 mL, tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 45 M de metionina, 5,3 mM de riboflavina, 84 μM e 20 μM NBT cianeto de potássio. A quantidade do homogeneizado adicionado a este meio foi mantido abaixo de uma unidade de enzima para garantir a precisão suficiente. Os tubos foram colocados numa caixa forrada de papel de alumínio mantida a 25 °C e equipado com lâmpadas fluorescentes de 15 W. Após a exposição à luz durante 10 minutos, a redução do NBT foi medido espectrofotometricamente a 600 nm. A redução máxima foi observada na ausência da enzima. Uma unidade de atividade de SOD foi definida como a quantidade de SOD necessária para a inibição da redução de NBT por 50% (A_{560}) e foi expressa como unidades por mg de proteína (U/ mg de proteína). As proteínas foram medidas pelo método de biureto [90].

3.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada pelo método de TBARS [93], com algumas modificações. O método tem como princípio básico a formação de um pigmento vermelho rosado composta de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) e de malondialdeído (MDA). Uma alíquota (100 uL) da amostra foi adicionada uma solução de 1 mL contendo 400 uL de ácido acético 1,3 M tampão de ácido HCl 0.27M, pH 3,4, 400 uL de 0,8% TBA e 200 uL de dodecilsulfato de sódio - 8,1% de SDS. A mistura foi incubada a 95 °C durante 60 minutos. A reação de TBA com MDA produz um cromóforo que pode ser medido fotometricamente a 532nm. Os dados foram expressos em nmol/mg de proteína. As proteínas foram medidas pelo método de biureto [91].

4. Conclusões

Os dados revelam uma alternativa promissora para o uso de glicerol bruto como fonte de carbono para a produção de biomassa, de lípidos e ácidos graxos por *Mucor circinelloides* de manguezal. O isolado também apresenta uma elevada capacidade de produção de lípidos e pode ser testado como matéria prima de biodiesel de acordo com o seu perfil de ácidos graxos. Verificou-se que as percentagens mais elevadas de ácidos graxos poli-insaturados foram produzidas quando 8% de glicerol bruto foi usado como fonte de carbono. O uso de glicerol bruto a 8 % melhora a acumulação de ácido gama linolênico na biomassa fúngica e isso, considerando o baixo custo do resíduo, tem implicações econômicas positivas. Este estudo também revelou os efeitos do glicerol do biodiesel como um componente para a expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase. O composto induziu alterações morfológicas relacionadas com a ramificação de micélio. Os dados microbiológicos, obviamente, contribuem para a compreensão do comportamento microbiano em resposta a glicerol residual do biodiesel e indicam os potenciais fisiológicos e biotecnológicos do isolado, os quais devem ser avaliados mais especificamente para o desenvolvimento de bioprocessos de baixo custo.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico), FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Os autores agradecem ao Núcleo de Pesquisa e Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco (Recife-PE, Brasil) pelo uso dos laboratórios.

5. Referência

1. LEONETTI, A.B., ARAGÃO-LEONETTI, V., OLIVEIRA, S.V.W.B.; Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use on unrefined glycerol. *Renw. En.* 2012, 45, 138-145.
2. AYOUB, M., ABDULLAH, A. Z.; Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renew. Sust. Ener. Rev. Malasia*, 2012, 16, 5, 2671-2686.
3. UMPIERRE, A. P., MACHADO, F.; Gliceroquímica e valorização do glicerol. *Rev. Virt. Quím.*, 2013, 5, 1, 106-116.
4. BEATRIZ, A., ARAÚJO, Y. J. K., LIMA, D. P.; GLICEROL: UM BREVE HISTÓRICO E APLICAÇÃO EM SÍNTESES ESTEREOSELETIVAS. *Quim. Nova*, 2011, 34, 2, 306-319.
5. MOTA, C. J. A., SILVA, C. X. A. S., GONÇALVES, V. L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção do biodiesel. *Quím. Nova*, 2009, 32, 3, 639-648.
6. ANDRÉ, A.; Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Ind. Crops Prod.*, 2010, 31, 2, 407-416.
7. LI, C., LESNIK, K. L., LIU, H. Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. *Energies*, 2013, 6, 4739-4768.

8. ADHIKARI S, FERNANDO, S.D., HARYANTO, A. Hydrogen production from glycerol: an update. *En. Conv.Manag.* 2009, 50, 2600-2604.
9. FAN, X., BURTON, R., ZHOU, Y.; Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals e mini review. *Op. Fuels & En. Sc. J.*, 2010, 3, 17-22.
10. OH, B.R., SEO, J.W., HEO, S,Y., HONG, W,K., LUO, L,H., JOE, M.H.: Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. *Biores. Technol.*, 2011, 102, 4, 3918-3922.
11. GOETSCH, D., MACHAY, I.S., WHITE, L.R.; *Production of methanol from the crude glycerol by-product of producing biodiesel.* United States Patent. US7388034B1, 2008.
12. SHIELDS, M.C., VAN HEUGTEN, E., LIN, X., ODLE, J., STARK, C.S.; Evaluation of the nutritional value of glycerol for nursery pigs. *J. An. Sci.* 2014, 89, 2145-2153.
13. FOUNTOULAKIS, M. S., MANIOS, T.; Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Biores. Technol.*, 2009,100, 12, 3043-3047.
14. WEI, L., PORDESIMO, L. O., HARYANTO, A., WOOTEN, J.; Co-gasification of hardwood chips and crude glycerol in a pilot scale downdraft gasifier. *Biores. Technol.*, 2011, 102, 10, 6266-6272.
15. SILES, J. A., MARTÍN, M. A., CHICA, A. F., MARTÍN, A.; Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. *Biores. Technol.*, 2010, 101, 16, 6315-6321.
16. BODÍK, I., BLSTAKOVA, A., SEDLÁČEK, S.; Hutnan M. Biodiesel waste as source of organic carbon for municipal WWTP denitrification. *Biores. Technol.*, 2009, 100, 8, 2452-2456.
17. ETHIER, S., WOISARD, K., VAUGHAN, D., WEN, Z.; Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Biores. Techn.*, 2011, 102, 1, 88-93.
18. ASHBY, R. D., SOLAIMAN, D. K. Y., FOGLIA T. A., Bacterial Poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream. *J. Pol. Environ.*, 2004, 12, 3, 105-112.

19. DEMIREL, S., LEHNERT, K., LUCAS, M., CLAUS, P., Use of renewables for the production of chemicals: glycerol oxidation over carbon supported gold catalysts. *Appl. Catal.*, 2007, 70, 1e4, 637-643.
20. KYUNG, O. Y., JU, J., AHMAD, B. R., SE, H. C., SEUNG, W. K., CHULHWAN, P.; Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain for increasing the accumulation of triacylglycerol as a microbial oil feedstock for biodiesel production using glycerol as a substrate. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110, 343–347.
21. EASTERLING, E. R., FRENCH, W. T., HERNANDEZ, R., LICHA, M., The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol*, 2009, 100, 356–361.
22. SUBRAMANIAM, R., DUFRECHE, S., ZAPPI, M., BAJPAI, R.; Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J Ind Microb Biotechnol*, 2010, 37,1271–1287.
23. CHTZIFRAGKOU, S., FAKAS, M., GALIOTOU-PANAYOTOU, M., KOMAITIS, G., AGGELIS, P. S.; Commercial sugars as substrates for lipid accumulation by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *Eur J Lipid Sci Technol* 2010, 112, 1048–1057.
24. BELLOU, S., MOUSTOGIANNI, A., MAKRI, A., AGGELIS, S.; Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by Zygomycetes grown on glycerol. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 166, 146–158.
25. AGEITOS, J. M., VALLEJO, J. A., VEIGA-CRESPO, P., VILLA, T. G., Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90, 1219–27.
26. CHATZIFRAGKOU, A., MAKRI, A., BELKA, S., BELLOU, M., MAVROU, M., MASTORIDOU, P., PAPANIKOLAOU, S.; Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 2011, 36, 1097–1108.
27. ZHOU, H., LORENZ, M.C.: Carnitine acetyltransferases are required for growth on non-fermentable carbon sources but not for pathogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology*, 2008, 154, 500–509.
28. RODAKI, A., BOHOVYCH, I. M., ENJALBERT, B., YOUNG, T., ODDS, F. C., GOW, N. A., BROWN, A. J., Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell*, 2009, 20, 4845– 4855.

29. HALLIWELL B.; Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 2007, 35, 1147-1150.
30. HALLIWELL, B.; Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol.* 2006, 141, 312-322.
31. BARRIOS, E.; Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecol. Econ.* 2007, 64, 2, 269-285.
32. ORLOWSKI, M.; *Mucor* dimorphism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1991, 55, 234–258.
33. LUBBEHUSEN, T. L., NILSEN, J., MCINTYRE, M.; Morphology and physiology of the dimorphic fungus *Mucor circinelloides* (syn. *M. racemosus*) during anaerobic growth. *Mycol Res*, 2003, 107, 223–230.
34. BOTHA, A.; KOCK, J.L.F.; COETZEE, D.J.; BOTES, P.J. Physiology properties and fatty acid composition in *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*. *Ant. van Leeuw.*, 1979, 71, 201-206.
35. GARCIA-GALAN, C., BARBOSA, O., ORTIZ, C., TORRES, R., RODRIGUES, R. C.; Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2013, 93, 34–43.
36. WEI, H., WANG, W., YARBROUGH, J. M., BAKER, J. O., LAURENS, L.; Genomic, Proteomic, and Biochemical Analyses of Oleaginous *Mucor circinelloides*: Evaluating Its Capability in Utilizing Cellulolytic Substrates for Lipid Production. *PLoS ONE*, 2013, 8, 9, 1-12.
37. CSERNETICS, A., NAGY, G., ITURRIAGA, E. A., SZEKERES, A., ESLAVA, A. P.; Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fungal Gen. Biol.*, 2011, 48, 696–703.
38. NYILASI, I., A´CS. K., PAPP, T., NAGY, E., VA´GVOLGYI C.; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Fol. Microbiol.*, 2005, 50, 415–420.
39. GUTIERREZ, A., LOPEZ-GARCIA, S., GARRE, V.; High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J. Microbiol. Meth.*, 2011, 14,1-20.

40. PAPP, T., VELAYOS, A., BARTOK, T., ESLAVA, A. P., VAGVOLGYI, C.; Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 69, 526–531.
41. BURDON, K. L.; Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *J. Bacteriol.*, 1946, 52, 665-78.
42. PRASANNA, T., BABU, P. A., LAKSHMI, P. D., CHAKRAPANI, R., RAO, C. S. V. R.; Production of Poly (3-hydroxybutyrates) by *Bacillus* species isolated from Soil. *J. Pharm. Res. Rev.*, 2011, 1, 15-18.
43. NEEMA, P. M.; KUMARI, A.; Isolation Of Lipid Producing Yeast And Fungi From Secondary Sewage Sludge And Soil. *Austral. J. Bas. Appl. Sc.*, 2013, 7, 9, 283-288.
44. MacEACHRAN, D. P., SINSKEY, A. J.; The *Rhodococcus opacus* TadD protein mediates triacylglycerol metabolism by regulating intracellular NAD(P)H pools. *Microb. Cell Fact.*, 2013, 12, 104-115.
45. HARRIS, S.D.; Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 2008, 100, 6, 823–832.
46. ABAD, S., TURON, X., Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.*, 2012, 30, 3, 733-741.
47. TACCARI, M.; Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Biores. Technol.*, 2012, 110, 488-495.
48. SAENGE, C.; Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem.*, 2011, 46, 1, 210-218.
49. KITCHA, S., CHEIRSILP, B.; Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *En. Proc.*, 2011, 9, 274-282.
50. CHATZIFRAGKOU, A.; Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 2011, 36, 2, 1097-1108.

51. ANDRÉ, A.; Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Indust. Crops Product.*, 2010, 31, 2, 407-416.
52. JUSZCZYK, P.; Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Biores. Technol.*, 2013, 137, 124-131.
53. ABU-ELREESH, G., ABD-EL-HALEEM, D.; An effective lipid-producing fungal sp. strain DGB1 and its use for biodiesel production. *African J. Biotechnol.*, 2013, 12, 34, 5347-5353.
54. PAN, L.; Isolation of the Oleaginous Yeasts from the Soil and Studies of Their Lipid-Producing Capacities. *Technol. Biotechnol.*, 2009, 47, 2, 215-220.
55. NICOL, R. W., MARCHAND, K., LUBITZ, W. D.; Bioconversion of crude glycerol by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93, 1865-1875.
56. MARCHAND, K., LUBITZ, W., R.W.NICOL.; Utilization of Biodiesel Derived Crude Glycerol by Fungal Isolates for Biomass and Single Cell Oil Production. *J. Biobased Mat. Bioen.*, 2013, 7, 3, 415-419.
57. FAKAS, S., PAPANIKOLAOU, S., BATSOS, A., GALIOTOU-PANAYOUTOU, M., MALLOUCHOS, A.; Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biom. Bioen.*, 2009, 33, 573-580.
58. XIA, C.; A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnol. Biof.*, 2011, 15, 4, 1-10.
59. SCHNEIDER, T.; Screening of Industrial Wastewaters as Feedstock for the Microbial Production of Oils for Biodiesel Production and High-Quality Pigments. *J. Combust.*, 2012, 2012, 1-9.
60. KHOT, M.; Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. *Microb. Cell Fact.*, 2012, 11, 71, 1-13.
61. CONTI, E.; STREDANSKY, M.; STREDANSKA, S.; ZANETTI, F. γ -linolenic acid production by solid-state fermentation of mucorales strains on cereals. *Biores. Technol.*, 2001, 76, 283-286.

62. DU PREEZ, J.C., IMMELMAN, M., KOCK, J.L.C., KILIAN, S.G.; Production of gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides* and *Mucor rouxii* with acetic acid as carbon substrate. *Biotechnol. Lett.*, 1995, 17, 9, 933 – 938.
63. DU PREEZ, J.C., IMMELMAN, M., KOCK, J. L. F., KILIAN, S.G.; The effect of acetic acid concentration on the growth and production of gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides* CBS 203.28 in fed-batch culture. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 13, 81-87.
64. HANSSON, L.; DOSTALEK, M. Effect of culture condition on mycelial and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1988, 28, 240-246.
65. IMMELMAN, M.; du PREEZ, J.C.; KILIAN, S.G. Effect of C:N ration on gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* grown on acetic acid. *Syst.. Appl. Microbiol.*, 1997, 20, 158-164.
66. JEFFERY, J., KOCK, J.L.F., BOTHA, A., COETZEE, D.J., BOTES, P.J., NIGAM, S.; Enhanced sunflower oil utilization and gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* CBS 108.16 in presence of acetate. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 13, 357-358.
67. JEENOR, S., LAOTENG, K., TANTICHAROEN, M., CHEEVADHANARAK, S.; Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. *FEMS Microbiol.* 2006, 259, 60-66.
68. FARAG, R. S.; Effects of Various Carbon and Nitrogen Sources on Fungal Lipid Production. *Jaocs*, 1983, 80, 4, 795-800.
69. WORKMAN, M., HOLT, P., THYKAER, J.; Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *Amb Express*, 2013, 58, 3, 1-9.
70. NEVOIGT, E., STAHL, U.; Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, 21, 3, 231-241.
71. WU, J., GAO, S., WAN, J., ZENG, Y., MA, F. ; Thermogravimetric kinetics of corn stalk pretreated by oleaginous fungi *Cunninghamella echinulata*. *Biores. Technol.*, 2011, 102, 5255–5258.

72. GESSLER, N., N., AVER'YANOV, A. A., BELOZERSKAYA, T. A.; Reactive oxygen species in regulation of fungal development, *Biochem.*, 2007, 72, 1091-1109.
73. BARBĂNEAGRĂ, T., MANOLIU, A., CRISTICA, M., CIORNEA, E., TUTU, E.; researches regarding catalase and peroxidase activity in fungus *Rhizopus nigricans* grown on medium with different concentration of grinded wheat caryopsis. *Lucrări științifice*, 2011, 54. 234-254.
74. ANDO, K. M., HONMA, S., CHIBA, S., TAHARA, J., MIZUTANI; Glutathione transferase from *Mucor javanicus*. *Agric. Biol. Chem.* 1988, 52, 135-139.
75. DOWD, C., SHEEHAN, D.; Variable expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the fungus *Mucor circinelloides*. *FEMS Microbiol.* 1999, 170, 13-17.
76. SHEEHAN, D., CASEY, J. P.; Microbial glutathione S-transferases. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993, 104B, 1-6.
77. DOWD, C. A., BUCKLEY, C. M., SHEEHAN, D.; Glutathione S-transferases from the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. J.* 1997, 324, 243-248.
78. FOLEY, V., SHEEHAN, D.; Glutathione S-transferases of the yeast *Yarrowia lipolytica* have unusually large molecular mass. *Biochem. J.* 1998, 333, 839-845.
79. AYAR-KAYALI, H., TARHAN, L. The Effect of cultural conditions on the variations of SOD, CAT and GSH-Px activities and LPO levels in the filamentous fungus *Fusarium equiseti*. *Turk J Chem.*, 2004, 28, 213-222.
80. AYAR-KAYALI, H., Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. *Academic Press, Turkey*, 2002, 400, 265-272.
81. KAYALI, H. A., TARHAN, L., The effect of glucose and maltose concentrations on pyruvate and ascorbate production, antioxidant enzyme activities and LPO levels in *Fusarium equiseti*. *Proc. Biochem.*, 2004, 39, 1, 1519-1524.
82. TOM, G. D., VISWANATH-REDDY, M.; Effect of carbon source on enzymes involved in glycerol metabolism in *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.*, 1978, 3, 117, 259-263.

83. AYAR-KAYALI, H.; TARHAN, L.; The variation of antioxidant defense system of *Streptomyces sp.* M4018 with respect to carbon sources. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2012, 42, 4, 472-480.
84. TAMARA, B., MIHAELA, C., CIORNEA, E., TUTU, E., MANOLIU, A.; Influence of carbon sources on the activity of biochemical indicators of oxidative stress in saprophytic fungus *Rhizopus nigrican*. *Lucrări Științifice*, 2012, 55, 2-17.
85. AYAR-KAYALI, H., OZER, N., TARHAN, L.; Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. *Arch. Biochem, Biophys.*, 2002, 400, 2, 265-272.
86. WANG, Z. S., GU, Y. X., YUAN, Q. S.; Effect of nutrition factors on the synthesis of superoxide dismutase, catalase, and membrane lipid peroxide levels in *Cordyceps militaris* mycelium. *Curr. Microbiol.*, 2006, 52, 1, 74-79.
87. MANOCHA, M.S., SAN-BLAS, G., CENTENO, S.; Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *J. Gen, Microbiol.*, 1980, 117, 147-154.
88. DUNLAP, K. R., PERRY, J. J.; Effect of substrate on the fatty acid composition of hydrocarbon-utilizing microorganisms. *J. Bacteriol.*, 1967, 94, 1919-1923.
89. AEBI, H.; Catalase *in Vitro*. *Meth. Enzym.*, 1984, 105: 121-126.
90. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
91. HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B.; Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 7130-7139
92. BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I.; Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.*, 1971, 44, 276-287.
93. DRAPER, H. H., HADLEY, M.; Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 1990, 186, 421-431.

CAPÍTULO 3

Conclusões Gerais

A partir dos dados obtidos durante a realização dos experimentos neste estudo, pode-se concluir que:

- O isolado exibiu um alto rendimento de biomassa utilizando como fonte de carbono o glicerol residual do biodiesel;
- A produtividade de lipídeos – Single Cell Oil (SCO também apresentou-se satisfatória em comparação com os dados da literatura;
- O isolado apresenta perfil de ácidos graxos compatível com a produção de ácidos graxos insaturados – C18:2 e C18:3;
- As fontes de carbono utilizadas exibiram influência sobre a atividade antioxidativa do isolado, que apresentou maior atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione-S-transferase;
- O glicerol residual também aumentou o nível de peroxidação dos lipídeos do isolado;
- O glicerol residual utilizado neste estudo é uma fonte de carbono alternativa e promissora para produção de biomassa, lipídios e produção de ácidos graxos por *Mucor circinelloides* UCP 050 isolado do manguezal;
- Os dados obtidos contribuem para a compreensão o comportamento microbiano em resposta ao glicerol não refinado, e indicam as potencialidades fisiológicas e biotecnológicas do isolado, que devem ser avaliados mais especificamente para o desenvolvimento de Bioprocessos a baixo custo.

ANEXOS

Molecules **2014**, *19*, 1-x manuscripts; doi:10.3390/molecules180x0000x

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Biotechnological Valorisation of Raw Glycerol from Biodiesel to Production Biomass and Single Cell Oil by *Mucor circinelloides* UCP 050 Isolated from Mangrove Land

Cinthya Barbosa da Silva^{1,2}; Marcos Antônio Cavalcanti Luna²; Adriana Ferreira de Souza²; Maria Helena Menezes Estevam Alves²; Layla Carvalho Mahnke²; Kaoru Okada²; Carlos Alberto Alves da Silva²; Galba Maria de Campos-Takaki^{2*} and Aline Elesbão do Nascimento²

¹ Post-Graduation Program in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, 50.050-900 Recife - PE, Brazil; prof_cinthya@hotmail.com (C.B.S.);

² Nucleus of Research in Environmental Science and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, Recife, 50050-590, PE, Brazil; E-Mails: macluna@bol.com (M.A.C.L.); maria@helena.bio.br (M. H. M. E. A.); laylacm@gmail.com (L. C. M.) kao@unicap.br (K. O.); elesbao@unicap.br (A.E.N.); galba_takaki@yahoo.com.br (G.M.C.T.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail:

galba_takaki@yahoo.com.br;

Tel.: +55-81-2119-4044; Fax: +55-81-2119-4043.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract

This study concerns to the evaluation of glycerol waste (GW) from biodiesel used as substrate on biomass, single cell oil and fatty acid composition by *Mucor circinelloides* strain from mangrove land (Pernambuco, Brazil). Studies were carried out with the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione S-

transferase related to the toxic effects mediated by GW. The results using sudan black staining revealed lipid inclusion bodies and an increase in mycelial branching related to glycerol waste (GW) presence and concentration. Growth on 8% glycerol waste rendered a biomass production of 11.83g/L, compared to 5.62 g/L and 5.515 g/L using glucose and commercial glycerol (CG), respectively. A single cell oil content of 52.91% was obtained at 8% of residual glycerol, and showed ω -3Linolenic acid (C18:3) (45.4%) as the main fatty acid from biomass using GW as substrate. Activities of 67U/mg protein, 65U/mg protein and 0.744U/mg protein were obtained for superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferase, respectively, in 8% of the residue. These data pointed out the efficient utilization of the residue for biomass, single cell oil and fatty acids production, which corresponding to a valuable resource for biodiesel production itself. These data also are of great importance once is based in the use of a native caatinga microbial diversity.

Keywords: *Mucor circinelloides*; glycerol; biodiesel; biomass; lipids; stress response; mangrove land

1. Introduction

In the last few decades the humanity perceived that the increase of oil prices, deriving emissions of this fuel use and its finitude would have to be faced with a new perspective for the search of alternatives for the oil derivatives. Amongst such alternatives the biofuels appear, being biodiesel considered an excellent substitute for the oil. Biodiesel constitutes a renewable fuel that is compatible with current environmental and commercial world demands, presenting reduced toxicity and emission profile [1]. Chemically the fuel is composed of mono-alkyl esters of vegetable oils or animal fats and is produced by transesterification with a monohydric alcohol, which results in fatty acid alkyl esters and glycerol as the major liquid products [2,3]. The glycerol content in waste glycerol is from 27 wt% to 28 wt% with a methanol concentration that can vary from 6.2 wt% to 12.6 wt% [4, 5].

The crescent demand for the biodiesel industry has created a surplus of glycerol, resulting in an inevitable abundance of waste glycerol with a significant impact on the price of refined glycerol. Therefore, the need to find efficient approaches to convert waste glycerol into more desirable products is urgent and necessary [1,6]. Examples of possible production processes based on glycerol demonstrate that glycerol is a promising abundant source which

could improve the economic viability of the biodiesel industry, demonstrating that the residue could be a substrate for value-added commercial compounds [7].

Several studies have addressed identification of possible uses for unrefined glycerol for the production of different chemical products such as hydrogen [8], additives for automotive fuels [9], ethanol [10] or methanol [11]. Other potential uses for unrefined glycerol are: as animal feed supplement [12], codigestion [13] and co-gasification [14], and waste treatment [15,16]. Recently the Brazilian Government defined the standards for the use of glycerin from biodiesel production as a complement of animal feed.

A promising application of this by-product is as a carbon source in industrial microbiology to yield other valuable chemical products, such as dihydroxyacetone, succinic acid, propionic acid, citric acid, pigments, polyhydroxyalcanoate, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, polyesters, lactic acid, and polyglycerols 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, polyesters, lactic acid, and polyglycerols and biosurfactants, amongst others [17-21].

Another alternative for raw glycerol valorization is its biotransformation by oleaginous yeasts and moulds into lipids and fatty acids (single cell oil -SCO), considering that microbial lipids could contribute to the covering of the increasing industrial demand of fats and oils, and can be applied in biodiesel production once their structure and composition are similar to those of common vegetable oils [22-26].

Some studies concerning the antioxidative responses point out an interaction between the culture conditions, related the carbon sources (fermentable and nonfermentables) and the expression of the enzymatic and not enzymatic defense systems in moulds and yeasts [27,28]. In aerobic organisms, reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical are produced as by-products of a normal metabolism. Cells are able to deal with environmental insults by using specific enzymatic and non enzymatic components to protect its cellular constituent and to keep the cellular state redox. The enzymatic system of defense consists typically of small soluble molecules in aqueous or oil environments, which remove the free radical from the solution. The enzymatic antioxidant defenses include the activity of superoxide dismutase (Sod), catalase (Cat), and glutathione S-transferase (GST), to minimize the toxic effect of formed free radicals. The lipid peroxidation is also a physiological response related to stress response and antioxidant enzymes [29,30].

Microorganisms play significant role in the soil and their diversity could be used as a basic parameter in the implementation of management actions on priority areas for

conservation and protection. Bioprospection in sites poorly explored, such as mangrove lands, has been relevant to the discovery of new biological systems and their compounds for biotechnological and industrial research [31].

Mucor circinelloides belongs to the order Mucorales and is a dimorphic fungus that grows as a budding yeast anaerobically and as a filamentous fungus aerobically [32, 33]. The fungus is also able to germinate and grow on a wide variety of carbon sources in synthetic liquid media [34]. The specie presents a high potential for biotechnological applications in ethanol, lipases [35], and celulases production [36]. Some papers relate the fatty acid production by the specie, which could be used as a suitable source for polyunsaturated fatty acids. *M. circinelloides* is able to accumulate lipids by growing on several carbon sources and these lipids can be used as feedstock for biodiesel production [36]. The suitability of *M. circinelloides* as a model lipogenic fungus is also based on the finding that it has a relatively broad associated molecular tool repertoire that includes genetic transformation using self-replicative plasmids [37] and mediation by *Agrobacterium* [38], electroporation [39], or polyethylene glycol [40]. In addition, its genome sequence is available, making possible genomic as well as secretomic approaches.

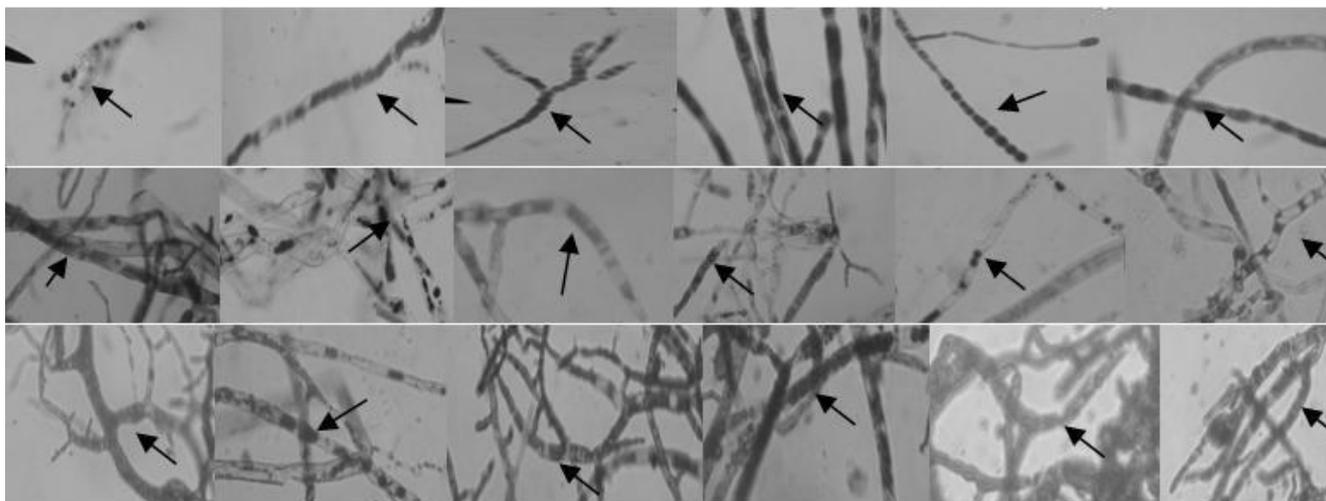
In this paper, the effects of glycerol from biodiesel on the enhancement of biomass and single cell oil (lipid and fatty acids) production, and the anti stress response were investigated in a *Mucor circinelloides* strain isolated from mangrove land.

2. Results and Discussion

2.1. Qualitative lipid analysis by sudan black and morphological evaluation

Sudan black staining of *M. circinelloides* mycelia grown on glucose, pure glycerol and unrefined glycerol can reveal the cellular lipid content in fungal mycelia as a black color inclusions (Figure 1).

Figure 1. Sudan black staining of *M. circinelloides* mycelia grown on glucose, commercial glycerol and residual glycerol. A-C – grown on 2%, 4% and 8% of glucose, at 3 days; D-F - grown on 2%, 4% and 8% of glucose, at 5 days; G-I - grown on 2%, 4% and 8% of commercial glycerol, at 3 days; J-L - grown on 2%, 4% and 8% of commercial glycerol, at 5 days; M-O - grown on 2%, 4% and 8% of residual glycerol, at 3 days; P-R - grown on 2%, 4% and 8% of glucose, at 5 days. X40.



An analysis of micrographs reveals that in all culture conditions there is a strong lipid bodies staining. However, is possible to note that the growth in glucose permit to visualize homogeneous mycelia with long hyphae. The lipid inclusions in the mycelia are more homogeneously distributed. The grown on glycerol resulted in the formation of heterogeneous and disperse mycelia with intense lateral and apical branching and lipid inclusions more diffuse and disperse in cellular cytoplasm. The intensity of these alterations is related to carbon source concentration and is higher in cultures grown in unrefined glycerol.

The use of sudan black as a fungal lipid bodies staining was first described by Burdon (1946)[41]. Since then, the dye has been used to reveal the presence of lipid inclusions as a qualitative analysis to the screening for microbial cell ability to accumulate lipids [42, 43, 44].

The use of sudan black to stain lipid inclusions in *M. circinelloides* was evaluated in glucose at 3% and avicel, and showed similar results [36]. However, this work revealed the alterations related to unusual branching pattern in hyphae of cells cultured in glycerol presence. A search in the literature did not show data related to effects of glycerol in microbial morphology, being this study the first to reveal this kind of data.

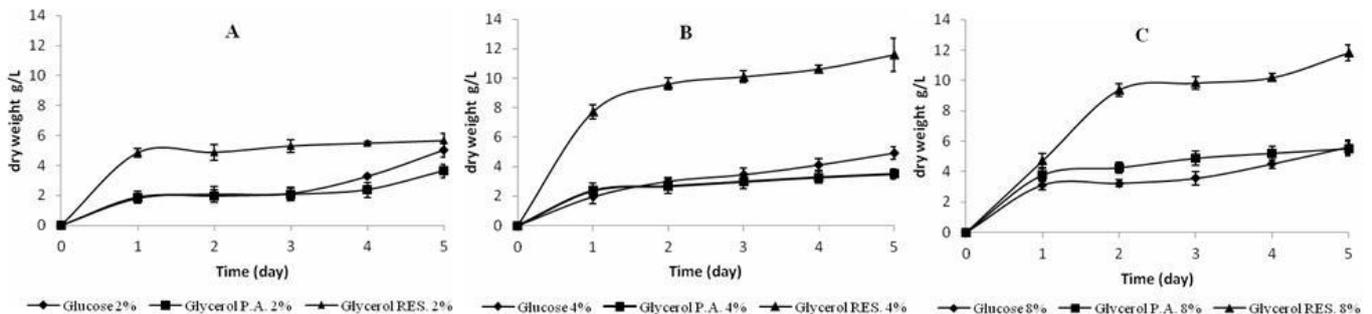
Hyphal branching increases the surface area of the colony and result in an enhancement of nutrient assimilation and mediate hyphal fusion that is important for nutrients

exchange and signals between different hyphae in the same colony [45]. According to these data, the branching pattern observed in *M. circinelloides* grown in glycerol could be related to the enhancement of the nonfermentable carbon source assimilation and to the exchange of nutrient to maintain the fungal growth and development.

2.2. Effects of residual glycerol on dry mass, biomass and single cell oil productivity and fatty acids profile of *Mucor circinelloides*

Results presented in figure 2 present the growth curves of *M. circinelloides* bases on mycelial dry weight obtained after 5 days at 28⁰C. The results demonstrate the effects of glucose, pure glycerol and residual glycerol during cellular growth.

Figure 2. Time course of *M. circinelloides* growth according to dry weight on glucose (w/v), commercial glycerol (v/v) and residual glycerol (v/v) at 2% (A), 4% (B) and 8% (C).



The fungus can grow in all the three media and produces significant amounts of biomass. From the results is clearly observed a progressive increase in the dry weight in all conditions tested. The effects of carbon source were related to the concentrations used. When cells were grown in carbon sources at 2% the biomass yield rendered residual glycerol 5.66g/L for residual glycerol, 5.04g/L for glucose and 3.64g/L for commercial glycerol, indicating a decrease of 10.9% and 35.7%, respectively for glucose and commercial glycerol dry weight. Similar behavior was observed for cells grown on carbon sources at 4%; reductions of 57.5% and 69.8% were determined for glucose (4.93g/L) and commercial glycerol (3.5g/L) compared to residual glycerol (11.59g/L). The maximum biomass yield was obtained in residual glycerol at 8%, rendering 11.83g/L, compared to 5.62g/L and 5.66g/L for glucose

and commercial glycerol, indicating a dry weight reduction higher than 50%. The biomass dry weight increased with the supplement and residual glycerol residual glycerol concentration.

The results for biomass productivity, single cell oil yield and productivity of *M. circinelloides* grown on media containing glucose, glycerol residual and commercial glycerol are shown in table 1.

Table 1. Biomass and lipid Productivity of *Mucor circinelloides* grown on glucose (w/v), commercial glycerol (v/v) and residual glycerol (v/v) at different concentrations

		Biomass density (g L⁻¹)	Biomass Productivity (g L⁻¹day⁻¹)	Lipid (g/g biomass)	Lipid (g L⁻¹)	Lipid (%)	Lipid Productivity (g L⁻¹day⁻¹)
Glucose	2%	5,04	0,81	0,182	0,92	18,25	0,15
	4%	4,93	0,74	0,158	0,78	15,90	0,12
	8%	5,62	0,62	0,159	0,90	16,01	0,10
Glycerol P.A.	2%	3,64	0,44	0,105	0,40	10,10	0,04
	4%	3,5	0,33	0,08	0,30	8,57	0,03
	8%	5,52	0,43	0,111	0,61	11,05	0,05
Residual Glycerol	2%	5,66	0,45	0,176	1,00	17,67	0,08
	4%	11,59	0,97	0,484	5,6	48,32	0,47
	8%	11,83	1,78	0,529	6,26	52,91	0,94

The growth on residual glycerol, commercial glycerol and glucose resulted in changes on the single cell oil/lipid yield and productivity. The lowest lipid yield and content bases on dry mass was obtained in cells cultured in commercial glycerol. The growth on glucose rendered almost 20% in lipid productivity. On the other hand, grown on residual glycerol rendered the highest oil productivity; 48.32% and 52.91% for 4% and 8%. Compared to glucose and commercial glycerol at 4%, increases of 67% and 82% were obtained, respectively. The grown on 8% of glucose and commercial glycerol rendered reductions of 69% and 79% in single cell oil productivity compared to residual glycerol.

These results showed that the caatinga strain is a promising mould, which can assimilate residual glycerol to produce high biomass yield and resulted in the accumulation of significant quantities of single cell oil.

By using gas chromatography, an interesting variation in the composition of *M. circinelloides* fatty acids was obtained for glucose, commercial glycerol and residual glycerol. Results are presented in table 2.

Table 2. Changes in fatty acid composition of extracted total lipids from *Mucor circinelloides* grown in glucose (w/v), commercial glycerol (v/v) and residual glycerol (v/v)

Fatty acids	Glucose			Commercial Glycerol			Residual Glycerol		
	2%	4%	8%	2%	4%	8%	2%	4%	8%
(C14:0)									
Myristic acid (C14:0)	4.3	5.37	3.79	1.91	nd	2.02	nd	0.14	0.12
Palmitic acid (C16:0)	24.4	20.7	17.7	23.3	29.5	26	18.3	20.1	16.4
Stearic acid (C18:0)	8.87	13.9	17.1	12.7	9.96	10.4	5.21	2.78	2.86
Oleic acid (C18:1)	36.8	33.3	32.1	36.8	33.4	38.8	20.8	17.8	33.6
Linoleic acid (C18:2)	13.5	15.7	13.8	16.1	23.7	9.15	51.6	54.5	nd
(C18:3 - ω -3)									
Linolenic acid Omega3 (C18:3 - ω -3)	4.7	5.77	5.46	8.68	nd	12.7	3.47	3.56	45.4
Linolenic acid Omega6 (C18:3 - ω -6)									
Linolenic acid Omega6 (C20:0)	0.3	0.32	0.33	0.3	3.21	0.71	0.49	0.02	0.01
Araquidic acid (C20:0)	nd	nd	0.61	nd	nd	nd	nd	0.17	0.25
Eicosenoic acid (C20:1)	nd	nd	0.67	nd	nd	nd	nd	0.22	0.17
Behenic acid (C22:0)	1.54	nd	0.75	nd	nd	nd	nd	0.15	0.21
Erucic acid (C22:1)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.67
Others	5.26	4.94	7.69	0.21	0.23	0.22	0.13	0.56	0.31
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100

The FAME analysis of *M. circinelloides* samples showed significant amounts of oleic acid, palmitic acid, stearic acid, myristic acid and linolenic acid, in order of prominence. However, the composition of each fatty acid changed according to carbon source type and concentration used in culture medium. The growth on commercial glycerol rendered the highest content of oleic acid (C18:1) and palmitic acid (C16:0). Residual glycerol as carbon source rendered the highest content of linoleic acid (C18:2) at concentrations of 2% (51.5%) and 4% (54.5%). α -linolenic acid (C18:3 - ω -3) contents at 8% of residual glycerol reached 45.4%.

Currently, a major concern for biodiesel producers is the production of crude glycerol as a waste product. As the production of biodiesel has gone up, the current market has flooded with excess glycerol [46].

Alternative ways to use this excess of crude glycerol are going to become important as the biodiesel production expands. If a cost effective method for the consumption of this crude glycerol could be found, it would make biodiesel refining a more lucrative process [36].

Several researchers have been studied the effects of glycerol from biodiesel to promote biomass and single cell oil productivity by using microbial cells, revealing the feasibility of residual glycerol from biodiesel as an alternative carbon substrate to glucose for microbial cultivation and a cost reduction of carbon substrate feed in the mechanism of single cell oil production may be expected [47-50]. In spite of differences in data related to microbial specie, glycerol concentration and origin, a significant increase in biomass content and single cell oil have been found [51-55].

Filamentous fungi cells have advantages over others microorganisms for lipid production due to its higher cellular volume, which allow more synthesis and storage capacity and its use for production of valuable products and processes in biotechnological industry [56].

M. circinelloides is phylogenetically close to two other broadly studied lipogenic fungi, *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*, both of which are reported to accumulate high levels of lipids (60 to 70% w/w of dry cell mass) [57].

Also, Microbial conversion of biomass to biofuels is an attractive route for biofuel development, because some microorganisms, including the model fungus *Mucor circinelloides*, are able to accumulate lipids by growing on the sugars released from the pretreatment of biomass; the lipids can be used as feedstock for biodiesel production [58-60].

Studies have demonstrated that *M. circinelloides* strains can utilize glucose, xylose [61], acetic acid [62, 63], and the hydrolysate of several agroindustrial waste residues [64-66]

Some researches point glucose as the most important factor on lipid production in oleaginous microorganisms [67-69]. However, when the glucose concentration increase an inverse effect on lipid productivity is observed due to the increase in osmotic potential of the medium [70]. This effect was not observed in the *M. circinelloides* strain used in this study, once the increase in glucose rendered a higher lipid and biomass production and productivity.

The FAME profile found in this work is consistent with the literature for the closely related strains *C. echinulata* and *M. isabellina*, with the exception of the C14 fatty acids [71]. However, the fatty acid profile of the microbial oil produced and its contents were affected by the carbon source used.

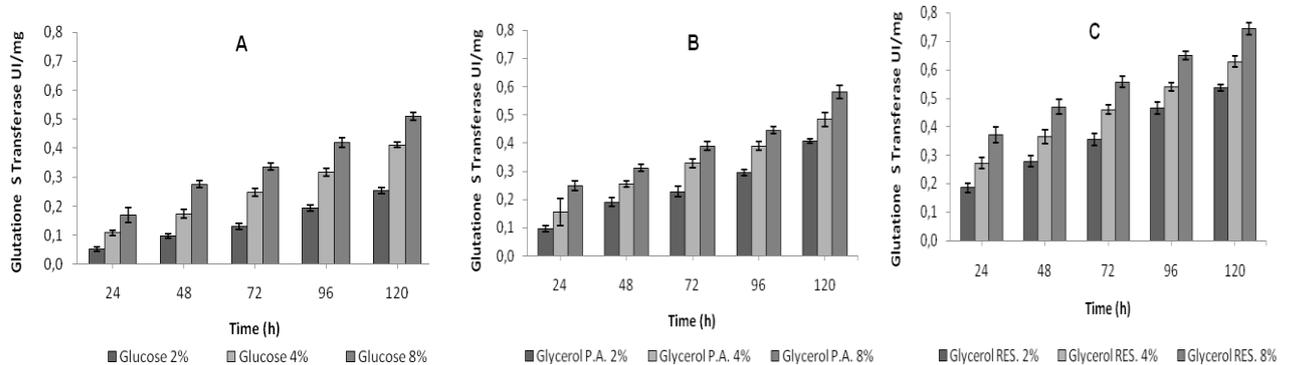
This study succeeded in identifying an environmental strain of *Mucor circinelloides* as an oleaginous mould that may find application in TAGs production from glycerol.

The strain was capable to grow abundantly and rapidly on glycerol and to accumulate lipids within intracellular lipid bodies, indicating that is a strain capable of converting biomass directly to biofuels.

2.3. Effect of glucose, commercial glycerol and residual glycerol on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in *Mucor circinelloides*

The effect of glucose, commercial glycerol, and residual glycerol as carbon sources on the antioxidant defense system such as glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activities, and membrane lipid peroxidation (LPO) levels of *Mucor circinelloides* were investigated. The results are presented in figures 3-6.

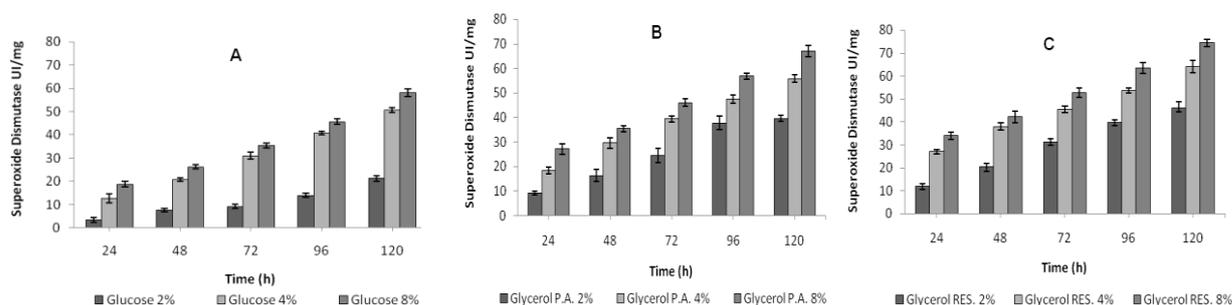
Figure 3. Activity of the enzyme glutathione S-transferase by *M. circinelloides* cultivated on different concentrations of glucose (A), glycerol PA (B) and Residual glycerol (C) for 120 hours at 28 ° C and 150 rpm.



The grown on glucose resulted in activities of 0.254IU/mg protein, 0.412IU/mg protein and 0.5IU/mg protein for 2%, 4% and 8%. The increase was related to incubation time. Similar results were obtained for commercial glycerol and residual glycerol, which rendered 0.408 IU/mg protein, 0.484 IU/mg protein and 0.582 IU/mg protein, 0.536 IU/mg protein, 0.628 IU/mg protein and 0.744 IU/mg protein, for carbon sources at 2%, 4% and 8%, respectively. Results revealed reductions of 52%, 34% and 31% in the enzyme activity for 2%, 4% and 8% of glucose compared to activities on residual glycerol. The enzyme activity

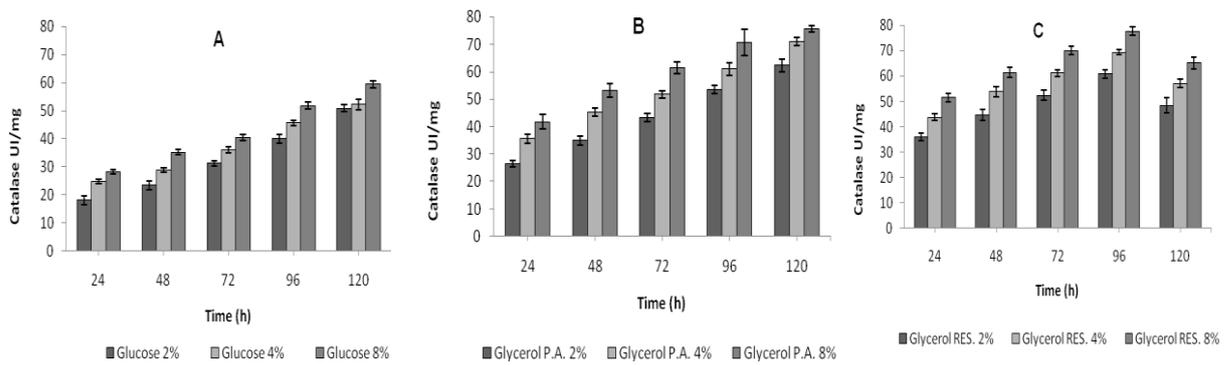
on cells grown on commercial glycerol reduced at 23%, 22% and 21%, respectively for 2%, 4% and 8%.

Figure 4. Activity of the enzyme superoxide dismutase by *M. circinelloides* cultivated on different concentrations of glucose (A), glycerol PA (B) and Residual glycerol (C) for 120 hours at 28 ° C and 150 rpm.



The results show that SOD activity peaked at 120 hours for all conditions tested and in cells grown on residual glycerol. The enzyme activity increase reaching for glucose 21.2IU/mg protein, 50.6 IU/mg protein and 58 IU/mg protein for 2%, 4% and 8%, respectively. Activities of 39.6IU/mg protein, 55.8IU/mg protein and 67IU/mg protein were determined for commercial glycerol at 2%, 4% and 8%. For the growth on residual glycerol activities of 46IU/ mg protein, 64 IU/mg protein and 74.4 IU/mg protein were obtained for 2%, 4% and 8%, respectively. The SOD activity increased markedly in cells grown on residual glycerol, rendered reductions of 53% and 13%, 20.9% and 12.8%, and 25% and 13% for cells grown on glucose and commercial glycerol at 2%, 4% and 8%, respectively.

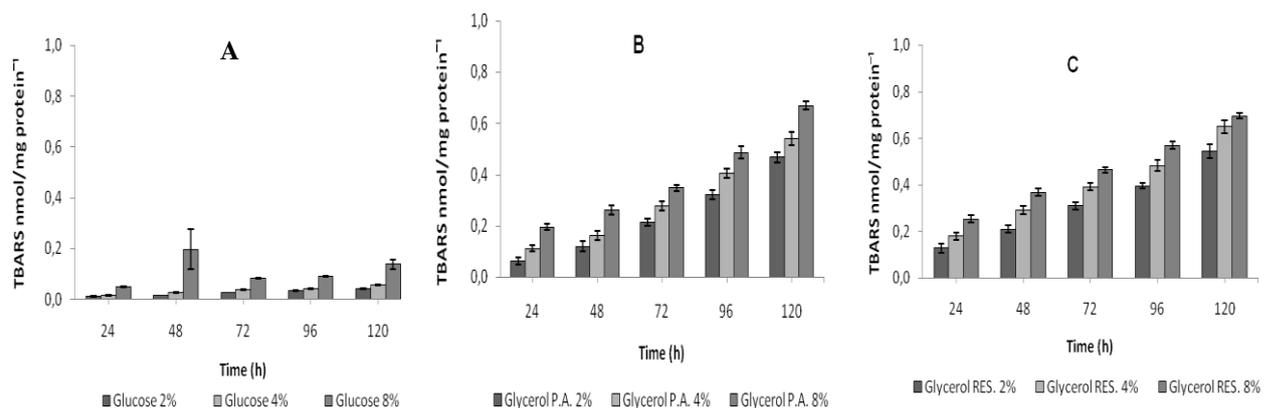
Figure 5. Behavior of catalase activity by *M. circinelloides* cultivated on different concentrations of glucose (A), glycerol PA (B) and Residual glycerol for 120 hours at 28 ° C and 150 rpm.



As shown in the figure, CAT activity increased significantly during the *M. circinelloides* growth. The highest enzyme activity was obtained in grown on commercial glycerol, rendered 62.4 IU/mg protein at 2%, 71IU/mg protein at 45 and 75.6IU/mg protein at 8%. At 2%, 4% and 8% of glucose, activities of 50.8IU/mg protein, 52.2IU/mg protein and 59.4IU/mg protein were determined. For cells grown on residual glycerol activities reached 48.45 IU/mg protein, 57.05IU/mg protein and 65.15IU/mg protein, at concentrations at 2%, 4% and 8%, respectively.

The results obtained for the influence of carbon sources on the lipid peroxidation levels are presented in figure 6.

Figure 6. Lipid peroxidation level in *Mucor circinelloides* cultivated on different concentrations of glucose (A), glycerol PA (B) and Residual glycerol (C) for 120 hours at 28° C and 150 rpm.



The lowest LPO level was determined for cells grown on glucose compared to commercial and residual glycerol. However the LPO increases with the carbon source concentration. The LPO levels determined for glucose 2%, 45 and 8% corresponded to 0.043 nmolMDA/mg protein, 0.05 nmolMDA/mg protein and 0.138 nmolMDA/mg protein,

respectively. For commercial glycerol, 0.47 nmolMDA/mg protein, 0.54 nmolMDA/mg protein and 0.67 nmolMDA/mg protein were obtained at 2%, 4% and 8%. The highest LPO levels were determined in cells grown on residual glycerol and corresponded to 0.54 nmolMDA/mg protein, 0.65 nmolMDA/mg protein and 0.7 nmolMDA/mg protein, for 2%, 4% and 8%, respectively.

Most of the findings which have led to a greater understanding of the biological role of antioxidant enzymes were obtained in studies performed using bacteria, yeasts and complex eukaryotes. Filamentous fungi are suitable for SOD, CAT and GST investigation because of their potential advantages, abundant mycelium and intensive respiration which are prerequisites for the generation of reactive oxygen species [72].

Microbial cells can change their metabolic behaviour depending on the nature of the carbon source [73]. The uptake of glycerol may be by passive diffusion, although active transport systems have been described in some yeasts, acting mainly in conditions of osmotic stress. Changes in transport and concentrations of carbon sources affect the energy metabolism, specifically the electron transport in the inner mitochondrial membrane, in the process of which most of the cellular ROS are generated and may cause the variation in antioxidant enzyme activities [72].

GST activity has been identified in almost 30 fungal species, they have been purified from *Mucor circinelloides* (previously *M. javanicus*) [74,75], *Fusarium oxysporum*, *Issatchenkia orientalis* [76], *Phanerochaete chrysosporium* [77] and *Yarrowia lipolytica* [78]. *Mucor circinelloides* variably expresses two isoenzymes of glutathione S-transferases. Variable expression of individual isoenzymes may be a selective response to a chemical or environmental stimulus similar to that known in other eukaryotes [72, 73]. The authors obtain activities corresponding to 1.9 U/mg protein and 0.96 U/mg protein in malt extract broth with glucose 2%.

In this study, following supplementation with glycerol as an alternative carbon source, GST, SOD and CAT activities and LPO levels in *M. circinelloides* increased.

In a study with *Fusarium equiseti* grown on glycerol and saccharose, an increase in SOD and CAT activities by 88.24% and 293.48% at 15 g/L of saccharose compared with 5 g/L of saccharose caused a decrease in LPO level of 96.41%. In medium supplemented with glycerol, SOD activity increased by 210% although CAT activity decreased by 48.29% in medium containing 20 g/L of glycerol compared with 5 g/L of glycerol and LPO levels thus

decreased by 13.18%. In the light of the results for the carbon sources, despite lower SOD and GSH-Px activity values there were higher CAT activity and lower LPO levels in the medium containing 15 g/L of saccharose compared with 20 g/L glycerol. In saccharose cells exhibited higher activity compared to glycerol [79].

Highest SOD, CAT, were obtained in the presence of maltose 2%, while the minimum LPO level was observed in *F. acuminatum* cells [80]. Increasing of SOD activity was obtained in glycerin and glucose concentrations above 15%, whereas CAT activity decreased with an increased concentration of glycerin and glucose. A comparative analysis of the LPO levels determined in media supplemented with glycerin and glucose, revealed the minimum LPO level was 1.88 ± 0.028 nmol of malondialdehyde/g wet wt at 15 g/L of glycerin [81].

Several other works revealed the effects of carbon sources on culture medium related to enzymes involved in these sources metabolism [82-85].

Other study revealed SOD and CAT activities of 44.3 U/mg protein in the presence of 20% potato broth plus 2% glucose medium and 93.7 U/mg protein in presence of 20% potato broth plus 1% glucose medium, respectively [86].

In this study, the time course of SOD, GST and CAT biosynthesis showed two maxima, which correspond to the maximum of biomass. The grown on glucose reduced the activity of antioxidative enzymes and lipid peroxidation compared to commercial and residual glycerol. The activity also increased in response to increase in carbon source concentration. It is clearly demonstrated the effects of carbon sources and its concentrations on antioxidant system of *M. circinelloides*.

3. Experimental

3.1 Microorganism and culture conditions

The microorganism *Mucor circinelloides* UCP 050, isolated from mangrove sediment, Rio Formoso, Pernambuco, Brazil, kept on Bank Cultures Center for Research in Environmental Sciences - Catholic University of Pernambuco was selected to study the growth at various concentrations of unrefined glycerol. The strain was maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) at 5°C. For the production of the pre-inoculum, the strain was grown in solid Sabouraud medium and incubated at 28°C for 7 days. Spores were collected and a suspension was prepared.

3.2. *Crude glycerol pretreatment*

Crude glycerol was obtained from the CENTRO DE TECNOLOGIA DO NORDESTE, CETENE (Pernambuco, Brazil). The refinery uses an alkali-catalyzed transesterification to produce the biodiesel from cotton oil. The crude glycerol was submitted to methanol removal and corresponded to 65% of glycerin and is referred as residual glycerol in this work.

3.3 *Determination of microbial dry biomass*

Pre-inoculums corresponding to 10% of a spore suspension were inoculated in Erlenmeyer flasks of 250 mL with 150ml of Sabouraud broth containing residual glucose at concentrations of 2%, 4% and 8%, pH 5 and incubated at 28°C under agitation of 150rpm for 5 days. In this study glucose was replaced by pretreated crude glycerol in concentrations of 2%, 4%, and 8%. An elementary analysis revealed a glycerin percentual of 65, 18% in the residue used in this work Laboratory grade pure glycerol (glycerol P.A.) was also used as a control. Mycelia samples were collected during experiment for growth determination by cell dry weight. Samples from each flask were filtering vacuum through a pre-weighed Whatman No.1 filter paper and washing with 25 mL of distilled water. The filter paper was then dried at 90 °C to a constant weight. The average dry weight of five replicas was used to establish the graph corresponding to the growth curve.

3.4 *Biochemical Determinations*

3.4.1 *Qualitative lipid analysis by Sudan Black staining*

For the lipid analysis of oil accumulated in mycelia of *M. circinelloides*, samples of all treatments were taken at 3 and 5 days of culture and submitted to Sudan Black staining (Burdon 1946). Samples were fixed in glutaraldehyde solution during 1 hour, and used to prepare a mycelial smear. The slides were flood with Sudan black B stain (prepared about 0.3% in 70% ethanol) and remain stand for 20 minutes at room temperature. The excess stain was removed and the slides were submitted to complete drying. Finally the slides were counter stained with Safranin, (0.5% aqueous solution) for 5 to 8 seconds. The slides were washed with distilled water, dried, observed under a Nikon Microscope model Alphaphot 2 Y52, and photographed with a Nikon camera FDX-35. Lipid bodies and inclusions are staining in black color.

3.4.2 Lipid Extraction and quantification

The lyophilized mycelia samples (1,0 g) were extracted with 20 vol. each of chloroform/methanol as 2: 1, 1 : 1 and 1 : 2 (v/v) mixtures [87]. The cultures were suspended in chloroform/methanol (2: 1 , v/v) and homogenized for 1 h. The extract was separated by centrifuging at 5000 g for 5 min and the pellet, suspended in chloroform/methanol (1 : 1, v/v), was homogenized for 15 minutes. The extract was separated by centrifuging and the pellet was resuspended in chloroform/methanol (1 : 2, v/v) with constant stirring. The combined extracts were reduced to near dryness on a rotary evaporator. Lipids quantification is expressed as grams of extractable lipid per gram of biomass. Also lipid productivity was evaluated by using the following equation: % Total lipids = Lipids weight (g)/ mycelia weight (g) x 100.

3.4.3 Extraction and methylation of fatty acids

The fatty acids were converted to methyl esters according to the method of Dunlap and Perry (1967) [88]. The lyophilized biomass (100mg) was placed into a screw cap tube, mixed with 2 ml of a solution of boron trifluoride in 14% methanol and 2 mL of benzene and then incubated overnight at 60°C. Following incubation, 2mL of distilled water was added to the mixture and the tubes were agitated in a vortex for 5 min. The mixture was centrifuged at 1700 Xg for 10 min at 40°C. Following centrifugation, the benzene was removed and evaporated with nitrogen, while the fatty acid methyl esters were resuspended in n-hexane and analyzed by gas chromatography (GC).

3.4.4 Gas chromatography for fatty acid evaluation

The analysis were performed on a gas chromatograph model Varian CP-3380 coupled to CP-8200 auto-sampler, capillary column CP SIL 8CB (30 m x 0,25mm), using helium as the carrier gas. The temperature of the injector and detector (FID) was maintained at 250°C, the temperature “oven” was initially set at 130°C, subsequently increased to 170°C at the rate of 1 to 3°C/min and was finally maintained isothermally at 180°C for 10 min. The fatty acids were identified by comparing the retention times of the peaks of the samples with the standards and the relative amounts of methyl ester accomplished by the composition of cellular fatty acids CFA were calculated by integration of the peak areas. A range of fatty acids standards was obtained from Sigma.

3.5 Preparation of samples for determination of oxidative enzymes

Samples of 1g of mycelium, collected at intervals of 3, 6, 9, 12 and 15 days were collected by filtration, washed with deionized water and mixed with a solution containing potassium chloride 1.15% phenylmethylsulfonyl fluoride (protease inhibitor) at a concentration of 100mM in isopropanol. The homogenized samples were centrifuged for 10 minutes at 3000rpm in a refrigerated centrifuge. The supernatants were collected and used to determine the enzymatic activities antioxidants and lipid peroxidation.

3.5.1. Catalase (Cat)

The high speed of reaction of this enzyme associated with lower "affinity", allows the determination of their activity with high concentrations of H₂O₂ (10mM). The activity was determined by the rate of consumption of H₂O₂ in the first minute of the reaction, 240nm ($\epsilon = 40\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [89]. It is discounted even the disappearance of hydrogen peroxide without the presence of the sample. The enzyme assay is performed in 40 seconds potassium phosphate buffer (KPi) 50mM, EDTA 0.5mM, pH 7 containing 0.012% Triton X-100. As substrate initiator is used 10mM H₂O₂. The absorbance baseline is deducted from the readings of the reaction in the absence of the test sample. The data are expressed as U/mg protein. Proteins were measured by the biuret method [90].

3.5.2. Glutathione-S-transferase (GST)

Conjugation of GSH with the substrate clorodinitrobenzeno (CDNB) catalyzed by GST produces a compound which can be detected at 340nm ($\epsilon = 9600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Enzyme activity is proportional to the speed of production of the conjugate compound [91]. This activity is discounted reaction baseline reading obtained by the reaction between GSH and CDNB assay without the presence of the sample. The enzyme assay 5 minutes was performed in potassium phosphate buffer (KPi) 100mM, EDTA 1mM, pH 7 containing 1mM GSH. Initiator was used as the substrate 1mM CDNB. The baseline absorbance was deducted from the readings of the reaction in the absence of the test sample. The data are expressed as IU/mg protein. Proteins were measured by the biuret method [90].

3.5.3. Superoxide dismutase (SOD)

SOD activity was measured by Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction [92]. The incubation medium contained, in a final volume of 3.0 ml, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 45 μ M methionine, 5.3 mM riboflavin, 84 μ M NBT and 20 μ M potassium cyanide. The amount of homogenate added to this medium was kept below one unit of enzyme to ensure sufficient accuracy. The tubes were placed in an aluminium foil-lined box maintained at 25°C and equipped with 15W fluorescent lamps. After exposure to light for 10 minutes, the reduced NBT was measured spectrophotometrically at 600nm. The maximum reduction was observed in the absence of the enzyme. One unit of SOD activity was defined as the amount of SOD required for inhibition of the reduction of NBT by 50% (A560) and was expressed as units per mg protein (U/mg protein). Proteins were measured by the biuret method [90].

3.6 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by the method of TBARS [93] with some modifications. The method has as basic principle the formation of a pinkish-red pigment composed of two molecules of thiobarbituric acid (TBA) and malondialdehyde (MDA). An aliquot (100 μ l) of sample was added 1ml solution containing 400 μ l of acetic acid buffer 1.3M HCl, 0.27M, pH 3.4, 400 μ l of 0.8% TBA and 200 μ l sodium dodecyl sulfate - SDS 8.1%. Mixing incubated to 95°C for 60 minutes. The reaction of TBA with MDA produces a chromophore which can be measured photometrically at 532nm. Data were expressed as nmol/mg protein. Proteins were measured by the biuret method [91].

4. Conclusions

The data reveals a promising alternative for the use of residual glycerol as a carbon source for biomass, lipid and fatty acid production by *Mucor circinelloides* from caatinga soil. The isolate also presents a high lipid-producing ability and could be tested as biodiesel feedstock according to its fatty acid profile. It was found that the highest percentages polyunsaturated fatty acids were produced when 8% of residual glycerol as carbon source. The use of residual glycerol at 8% enhanced gamma linolenic acid accumulation in fungal biomass and this, considering the low cost of the residue, has positive economic implications. This study also revealed the effects of glycerol from biodiesel as a medium component for improvement of

antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferase. The compound induced morphological alterations related to mycelial branching. The microbiological data obviously contribute to understanding the microbial behavior in response to unrefined glycerol, and indicate the physiological and biotechnological potentials of the isolate, which should be evaluated more specifically to the development of bioprocesses at low cost.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico), FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), The authors are grateful to the Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB), Catholic University of Pernambuco (Recife-PE, Brazil) for the use of its laboratories.

5. References

1. LEONETTI, A.B., ARAGÃO-LEONETTI, V., OLIVEIRA, S.V.W.B.; Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use on unrefined glycerol. *Renw. En.* 2012, 45, 138-145.
2. AYOUB, M., ABDULLAH, A. Z.; Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renew. Sust. Ener. Rev. Malasia*, 2012, 16, 5, 2671-2686.
3. UMPIERRE, A. P., MACHADO, F.; Gliceroquímica e valorização do glicerol. *Rev. Virt. Quím.*, 2013, 5, 1, 106-116.

4. BEATRIZ, A., ARAÚJO, Y. J. K., LIMA, D. P.; GLICEROL: UM BREVE HISTÓRICO E APLICAÇÃO EM SÍNTESES ESTEREOSELETIVAS. *Quim. Nova*, 2011, 34, 2, 306-319.
5. MOTA, C. J. A., SILVA, C. X. A. S., GONÇALVES, V. L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção do biodiesel. *Quím. Nova*, 2009, 32, 3, 639-648.
6. ANDRÉ, A.; Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Ind. Crops Prod.*, 2010, 31, 2, 407-416.
7. LI, C., LESNIK, K. L., LIU, H. Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. *Energies*, 2013, 6, 4739-4768.
8. ADHIKARI S, FERNANDO, S.D., HARYANTO, A. Hydrogen production from glycerol: an update. *En. Conv.Manag.* 2009, 50, 2600-2604.
9. FAN, X., BURTON, R., ZHOU, Y.; Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals e mini review. *Op. Fuels & En. Sc. J.*, 2010, 3, 17-22.
10. OH, B.R., SEO, J.W., HEO, S.Y., HONG, W.K., LUO, L.H., JOE, M.H.: Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. *Biores. Technol.*, 2011, 102, 4, 3918-3822.
11. GOETSCH, D., MACHAY, I.S., WHITE, L.R.; *Production of methanol from the crude glycerol by-product of producing biodiesel*. United States Patent. US7388034B1, 2008.
12. SHIELDS, M.C., VAN HEUGTEN, E., LIN, X., ODLE, J., STARK, C.S.; Evaluation of the nutritional value of glycerol for nursery pigs. *J. An. Sci.* 2014, 89, 2145-2153.
13. FOUNTOULAKIS, M. S., MANIOS, T.; Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Biores. Technol.*, 2009, 100, 12, 3043-3047.
14. WEI, L., PORDESIMO, L. O., HARYANTO, A., WOOTEN, J.; Co-gasification of hardwood chips and crude glycerol in a pilot scale downdraft gasifier. *Biores. Technol.*, 2011, 102, 10, 6266-6272.

15. SILES, J. A., MARTÍN, M. A., CHICA, A. F., MARTÍN, A.; Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. *Biores. Technol.*, 2010, 101, 16, 6315-6321.
16. BODÍK, I., BLSTAKOVA, A., SEDLÁČEK, S.; Hutnan M. Biodiesel waste as source of organic carbon for municipal WWTP denitrification. *Biores. Technol.*, 2009, 100, 8, 2452-2456.
17. ETHIER, S., WOISARD, K., VAUGHAN, D., WEN, Z.; Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosaheptaenoic acid. *Biores. Technol.*, 2011, 102, 1, 88-93.
18. ASHBY, R. D., SOLAIMAN, D. K. Y., FOGLIA T. A., Bacterial Poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream. *J. Pol. Environ.*, 2004, 12, 3, 105-112.
19. DEMIREL, S., LEHNERT, K., LUCAS, M., CLAUS, P., Use of renewables for the production of chemicals: glycerol oxidation over carbon supported gold catalysts. *Appl. Catal.*, 2007, 70, 1e4, 637-643.
20. KYUNG, O. Y., JU, J., AHMAD, B. R., SE, H. C., SEUNG, W. K., CHULHWAN, P.; Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain for increasing the accumulation of triacylglycerol as a microbial oil feedstock for biodiesel production using glycerol as a substrate. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110, 343-347.
21. EASTERLING, E. R., FRENCH, W. T., HERNANDEZ, R., LICHA, M., The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol*, 2009, 100, 356-361.
22. SUBRAMANIAM, R., DUFRECHE, S., ZAPPI, M., BAJPAI, R.; Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J Ind Microb Biotechnol*, 2010, 37, 1271-1287.
23. CHTZIFRAGKOU, S., FAKAS, M., GALIOTOU-PANAYOTOU, M., KOMAITIS, G., AGGELIS, P. S.; Commercial sugars as substrates for lipid accumulation by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *Eur J Lipid Sci Technol* 2010, 112, 1048-1057.
24. BELLOU, S., MOUSTOGIANNI, A., MAKRI, A., AGGELIS, S.; Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by Zygomycetes grown on glycerol. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 166, 146-158.

25. AGEITOS, J. M., VALLEJO, J. A., VEIGA-CRESPO, P., VILLA, T. G., Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90, 1219–1227.
26. CHATZIFRAGKOU, A., MAKRI, A., BELKA, S., BELLOU, M., MAVROU, M., MASTORIDOU, P., PAPANIKOLAOU, S.; Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 2011, 36, 1097–1108.
27. ZHOU, H., LORENZ, M.C.: Carnitine acetyltransferases are required for growth on non-fermentable carbon sources but not for pathogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology*, 2008, 154, 500–509.
28. RODAKI, A., BOHOVYCH, I. M., ENJALBERT, B., YOUNG, T., ODDS, F. C., GOW, N. A., BROWN, A. J., Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell*, 2009, 20, 4845–4855.
29. HALLIWELL B.; Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 2007, 35, 1147-1150.
30. HALLIWELL, B.; Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol.* 2006, 141, 312-322.
31. BARRIOS, E.; Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecol. Econ.* 2007, 64, 2, 269-285.
32. ORLOWSKI, M.; *Mucor* dimorphism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 1991, 55, 234–258.
33. LUBBEHUSEN, T. L., NILSEN, J., MCINTYRE, M.; Morphology and physiology of the dimorphic fungus *Mucor circinelloides* (syn. *M. racemosus*) during anaerobic growth. *Mycol Res*, 2003, 107, 223–230.
34. BOTHA, A.; KOCK, J.L.F.; COETZEE, D.J.; BOTES, P.J. Physiology properties and fatty acid composition in *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*. *Ant. van Leeuw.*, 1997, 71, 201-206.
35. GARCIA-GALAN, C., BARBOSA, O., ORTIZ, C., TORRES, R., RODRIGUES, R. C.; Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2013, 93, 34–43.

36. WEI, H., WANG, W., YARBROUGH, J. M., BAKER, J. O., LAURENS, L.; Genomic, Proteomic, and Biochemical Analyses of Oleaginous *Mucor circinelloides*: Evaluating Its Capability in Utilizing Cellulolytic Substrates for Lipid Production. *PLoS ONE*, 2013, 8, 9, 1-12.
37. CSERNETICS, A., NAGY, G., ITURRIAGA, E. A., SZEKERES, A., ESLAVA, A. P.; Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fungal Gen. Biol.*, 2011, 48, 696–703.
38. NYILASI, I., A´CS. K., PAPP, T., NAGY, E., VA´GVOLGYI C.; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Fol. Microbiol.*, 2005, 50: 415–420.
39. GUTIERREZ, A., LOPEZ-GARCIA, S., GARRE, V.; High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J. Microbiol. Meth.*, 2011.
40. PAPP, T., VELAYOS, A., BARTOK, T., ESLAVA, A. P., VAGVOLGYI, C.; Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 69, 526–531.
41. BURDON, K. L.; Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *J. Bacteriol.*, 1946, 52, 665-78.
42. PRASANNA, T., BABU, P. A., LAKSHMI, P. D., CHAKRAPANI, R., RAO, C. S. V. R.; Production of Poly (3-hydroxybutyrates) by *Bacillus* species isolated form Soil. *J. Pharm. Res. Rev.*, 2011, 1, 15-18.
43. NEEMA, P. M.; KUMARI, A.; Isolation Of Lipid Producing Yeast And Fungi From Secondary Sewage Sludge And Soil. *Austral. J. Bas. Appl. Sc.*, 2013, 7, 9, 283-288.
44. MacEACHRAN, D. P., SINSKEY, A. J.; The *Rhodococcus opacus* TadD protein mediates triacylglycerol metabolism by regulating intracellular NAD(P)H pools. *Microb. Cell Fact.*, 2013, 12, 104-115.
45. HARRIS, S.D.; Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 2008, 100, 6, 823–832.
46. ABAD, S., TURON, X., Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.*, 2012, 30, 3, 733-741.

47. TACCARI, M.; Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Biores. Technol.*, 2012, 110, 488-495.
48. SAENGE, C.; Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem.*, 2011, 46, 1, 210-218.
49. KITCHA, S., CHEIRSILP, B.; Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *En. Proc.*, 2011, 9, 274-282.
50. CHATZIFRAGKOU, A.; Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 2011, 36, 2, 1097-1108.
51. ANDRÉ, A.; Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Indust. Crops Product.*, 2010, 31, 2, 407-416.
52. JUSZCZYK, P.; Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Biores. Technol.*, 2013, 137, 124-131.
53. ABU-ELREESH, G., ABD-EL-HALEEM, D.; An effective lipid-producing fungal sp. strain DGB1 and its use for biodiesel production. *African J. Biotechnol.*, 2013, 12, 34, 5347-5353.
54. PAN, L.; Isolation of the Oleaginous Yeasts from the Soil and Studies of Their Lipid-Producing Capacities. *Technol. Biotechnol.*, 2009, 47, 2, 215-220.
55. NICOL, R. W., MARCHAND, K., LUBITZ, W. D.; Bioconversion of crude glycerol by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93, 1865-1875.
56. MARCHAND, K., LUBITZ, W., R.W.NICOL.; Utilization of Biodiesel Derived Crude Glycerol by Fungal Isolates for Biomass and Single Cell Oil Production. *J. Biobased Mat. Bioen.*, 2013, 7, 3, 415-419.
57. FAKAS, S., PAPANIKOLAOU, S., BATSOS, A., GALIOTOU-PANAYOUTOU, M., MALLOUCHOS, A.; Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biom. Bioen.*, 2009, 33, 573-580.

58. XIA, C.; A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnol. Bioph.*, 2011, 15, 4, 1-10.
59. SCHNEIDER, T.; Screening of Industrial Wastewaters as Feedstock for the Microbial Production of Oils for Biodiesel Production and High-Quality Pigments. *J. Combust.*, 2012, 2012, 1-9.
60. KHOT, M.; Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. *Microb. Cell Fact.*, 2012, 11, 71, 1-13.
61. CONTI, E.; STREDANSKY, M.; STREDANSKA, S.; ZANETTI, F. γ -linolenic acid production by solid-state fermentation of mucorales strains on cereals. *Biores. Technol.*, 2001, 76, 283-286, 2001.
62. DU PREEZ, J.C., IMMELMAN, M., KOCK, J.L.C., KILIAN, S.G.; Production of gammalinolenic acid by *Mucor circinelloides* and *Mucor rouxii* with acetic acid as carbon substrate. *Biotechnol. Lett.*, 1995, 17, 9, 933 – 938.
63. DU PREEZ, J.C., IMMELMAN, M., KOCK, J. L. F., KILIAN, S.G.; The effect of acetic acid concentration on the growth and production of gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides* CBS 203.28 in fed-batch culture. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 13, 81-87.
64. HANSSON, L.; DOSTALEK, M. Effect of culture condition on mycelial and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1988, 28, 240-246.
65. IMMELMAN, M.; du PREEZ, J.C.; KILIAN, S.G. Effect of C:N ration on gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* grown on acetic acid. *Syst.. Appl. Microbiol.*, 1997, 20, 158-164.
66. JEFFERY, J., KOCK, J.L.F., BOTHA, A., COETZEE, D.J., BOTES, P.J., NIGAM, S.; Enhanced sunflower oil utilization and gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* CBS 108.16 in presence of acetate. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 13, 357-358.
67. JEENNOR, S., LAOTENG, K., TANTICHAROEN, M., CHEEVADHANARAK, S.; Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. *FEMS Microbiol.* 2006, 259, 60-66.

68. FARAG, R. S.; Effects of .Various Carbon and Nitrogen Sources on Fungal Lipid Production. *Jaocs*, 1983, 80, 4, 795-800.
69. WORKMAN, M., HOLT, P., THYKAER, J.; Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *Amb Express*, 2013, 58, 3, 1-9.
70. NEVOIGT, E., STAHL, U.; Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, 21, 3, 231-241.
71. WU, J., GAO, S., WAN, J., ZENG, Y., MA, F. ; Thermogravimetric kinetics of corn stalk pretreated by oleaginous fungi *Cunninghamella echinulata*. *Biores. Technol.*, 2011,102, 5255–5258.
72. GESSLER, N., N., AVER'YANOV, A. A., BELOZERSKAYA, T. A.; Reactive oxygen species in regulation of fungal development, *Biochem.*, 2007, 72, 1091-1109.
73. BARBĂNEAGRĂ, T., MANOLIU, A., CRISTICA, M., CIORNEA, E., TUTU, E.; researches regarding catalase and peroxidase activity in fungus *Rhizopus nigricans* grown on medium with different concentration of grinded wheat caryopsis. *Lucrări științifice*, 2011, 54, 234-254.
74. ANDO, K. M., HONMA, S., CHIBA, S., TAHARA, J., MIZUTANI; Glutathione transferase from *Mucor javanicus*. *Agric. Biol. Chem.* 1988, 52, 135-139.
75. DOWD, C., SHEEHAN, D.; Variable expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the fungus *Mucor circinelloides*. *FEMS Microbiol.* 1999, 170, 13-17.
76. SHEEHAN, D., CASEY, J. P.; Microbial glutathione Stransferases. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993, 104B, 1-6.
77. DOWD, C. A., BUCKLEY, C. M., SHEEHAN, D.; Glutathione S-transferases from the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. J.* 1997, 324, 243-248.
78. FOLEY, V., SHEEHAN, D.; Glutathione S-transferases of the yeast *Yarrowia lipolytica* have unusually large molecular mass. *Biochem. J.* 1998, 333, 839-845.
79. AYAR-KAYALI, H., TARHAN, L. The Effect of cultural conditions on the variations of SOD, CAT and GSH-Px activities and LPO levels in the filamentous fungus *Fusarium equiseti*. *Turk J Chem.*, 2004, 28, 213-222.

80. AYAR-KAYALI, H., Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. *Academic Press, Turkey*, 2002, 400, 265-272.
81. KAYALI, H. A., TARHAN, L., The effect of glucose and maltose concentrations on pyruvate and ascorbate production, antioxidant enzyme activities and LPO levels in *Fusarium equiseti*. *Proc. Biochem.*, 2004, 39, 1, 1519-1524.
82. TOM, G. D., VISWANATH-REDDY, M.; Effect of carbon source on enzymes involved in glycerol metabolism in *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.*, 1978, 3, 117, 259-263.
83. AYAR-KAYALI, H.; TARHAN, L.; The variation of antioxidant defense system of *Streptomyces sp.* M4018 with respect to carbon sources. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2012, 42, 4, 472-480.
84. TAMARA, B., MIHAELA, C., CIORNEA, E., TUTU, E., MANOLIU, A.; Influence of carbon sources on the activity of biochemical indicators of oxidative stress in saprophytic fungus *Rhizopus nigrican*. *Lucrări Științifice*, 2012, 55, 2-17.
85. AYAR-KAYALI, H., OZER, N., TARHAN, L.; Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. *Arch. Biochem, Biophys.*, 2002, 400, 2, 265-272.
86. WANG, Z. S., GU, Y. X., YUAN, Q. S.; Effect of nutrition factors on the synthesis of superoxide dismutase, catalase, and membrane lipid peroxide levels in *Cordyceps militaris* mycelium. *Curr. Microbiol.*, 2006, 52, 1, 74-79.
87. MANOCHA, M.S., SAN-BLAS, G., CENTENO, S.; Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *J. Gen. Microbiol.*, 1980, 117, 147-154.
88. DUNLAP, K. R., PERRY, J. J.; Effect of substrate on the fatty acid composition of hydrocarbon-utilizing microorganisms. *J. Bacteriol.*, 1967, 94, 1919-1923.
89. AEBI, H.; Catalase *in Vitro*. *Meth. Enzym.*, 1984, 105: 121-126.

90. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
91. HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B.; Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 7130-7139.
92. BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I.; Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.*, 1971, 44, 276-287.
93. DRAPER, H. H., HADLEY, M.; Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 1990, 186, 421-431.