

**PROPOSTA TECNOLÓGICA DE REUSO DE GLICERINA
RESIDUAL DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL:
PROCESSO INTEGRADO**

GERALDO FERREIRA DAVID

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO – 2012**

**PROPOSTA TECNOLÓGICA DE REUSO DE GLICERINA
RESIDUAL DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL:
PROCESSO INTEGRADO**

GERALDO FERREIRA DAVID

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Victor Haber Perez

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
AGOSTO – 2012

**PROPOSTA TECNOLÓGICA DE REUSO DE GLICERINA
RESIDUAL DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL:
PROCESSO INTEGRADO**

GERALDO FERREIRA DAVID

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovado em 17 de agosto de 2012.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Maria Priscila Pessanha de Castro (D.Sc., Licenciatura em Física) –
UENF

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre (D.Sc. Engenharia de Alimentos) -UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Ariel Cardona Alzate (D.Sc., Engenharia Química) – UENF
Coorientador

Prof. Dr. Victor Haber Perez (D.Sc., Engenharia Química) – UENF
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a UENF pelo apoio financeiro da Bolsa de Mestrado, assim como, ao CNPq e a FAPERJ pelos auxílios financeiros aos projetos do Grupo de Pesquisa “Biomagnetismo Aplicado à Engenharia de Processos” do Setor de Engenharia de Processos do CCTA – UENF. Ao Prof. Dr. Jordan Hristov pela parceria e colaboração na construção dos sistemas de geração de campos eletromagnéticos. E ao professor Bonzan.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1. Biodiesel.....	11
3.2. Glicerina	16
3.3. Características gerais.....	16
3.4. Metabolismo e conversão do glicerol por micro-organismos.....	17
3.5. <i>Yarrowia lipolytica</i>	19
3.6. Catabolismo do glicerol na célula da <i>Yarrowia lipolytica</i>	22
3.7. Proteína Unicelular	24
3.8. Aplicações de campo magnético em processos biológicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Micro-organismo.....	33
4.2. Meio de manutenção da cultura.....	33
4.3. Preparo do inóculo para a fermentação	33

4.4.	Planejamento experimental e análise estatística	34
4.5.	Fermentações da <i>Yarrowia lipolytica</i> no reator axial-transversal com campo eletromagnético	35
4.6.	Exploração do sistema gerador de campo eletromagnético.....	35
4.7.	Condução dos experimentos de fermentação.....	35
4.8.	Sistemas de fermentação	36
4.9.	Determinação do crescimento microbiano e consumo de glicerol.....	36
4.9.1.	Contagem de células em câmara de Neubauer	36
4.9.2.	Densidade óptica.....	36
4.9.3.	pH do meio	38
4.9.4.	Consumo de glicerol.....	38
4.9.5.	Separação das células do meio de cultura	38
4.10.	Permeabilização das células da <i>Y. lipolytica</i>	38
4.11.	Preparação dos suportes para produção dos biocatalisadores a partir de <i>Yarrowia lipolytica</i>	38
4.11.1.	Suportes de alginato de cálcio.....	38
4.11.2.	Partículas de quitosana	39
4.11.3.	Partículas de poliuretano	40
4.12.	Imobilização das células por diferentes protocolos	40
4.12.1.	Imobilização de células por adsorção física nos suportes de quitosana, alginato de cálcio e poliuretano	40
4.12.2.	Imobilização por aprisionamentos nos suportes de alginato de cálcio.	40
4.13.	Determinação da atividade enzimática	41
4.13.1.	Cálculo do rendimento de imobilização	41
4.14.	Reação de biodiesel	42
4.15.	Análise cromatográfica	43
4.16.	Análise de proteína e energia bruta.....	43

4.17.	Simulações e avaliação técnico-econômica e ambiental	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1.	Cultura da <i>Y. lipolytica</i> usando glicerina como fonte de carbono: avaliações preliminares.....	44
5.1.1.	Morfologia.....	44
5.1.2.	Cinética de crescimento microbiano e produção de metabolito	46
5.1.3.	Imobilização visando à produção de biocatalisadores (“whole cells”) .	51
5.2.	Cultura da <i>Y. lipolytica</i> usando glicerina como fonte de carbono em biorreator assistido por campo eletromagnético	55
5.2.1.	Planejamento experimental: sob campo eletromagnético	59
5.3.	Produção de proteína unicelular de <i>Y. lipolytica</i>	74
5.4.	Reação de biodiesel pela rota enzimática	75
5.5.	Proposta Tecnológica de produção de biodiesel integrada.....	76
6.	CONCLUSÕES	84
7.	RECOMENDAÇÕES	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	APÊNDICE A	102
	APÊNDICE B	118

RESUMO

DAVID, Geraldo Ferreira; M.sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Agosto de 2012. PROPOSTA TECNOLÓGICA DE REUSO DE GLICERINA RESIDUAL DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL: PROCESSO INTEGRADO. Orientador: Prof. Dr. Victor Haber Perez.

Este trabalho apresenta uma alternativa tecnológica visando o reuso da glicerina como fonte de carbono para o crescimento da *Yarrowia lipolytica*, integrando a cadeia produtiva da soja e a produção de biodiesel, por transesterificação enzimática utilizando “whole cell” a partir de células de *Y. lipolytica*. Para verificar o efeito biológico dos campos eletromagnéticos nas fermentações, foi utilizado um sistema definido como Axial-Transversal, avaliando a produção de biomassa celular, tanto para “whole cells” (biocatalisadores com atividade enzimática da lipase intracelular) como para a produção de proteína unicelular (“Single Cell Protein-SCP”). Os resultados revelaram que a *Y. lipolytica* cresce em meio contendo glicerol como fonte de carbono produzindo lipase intracelular, de acordo com as determinações de atividade enzimática, e as condições que favoreceram a produção das enzimas foram diferentes das que afetaram o crescimento celular na aplicação de campos eletromagnéticos de baixa frequência e intensidades com e sem reciclo. De acordo com a análise de impacto ambiental usando Algoritmo WAR estes apontam para o potencial desta tecnologia.

ABSTRACT

DAVID, Geraldo Ferreira; M.sc. Vegetal Production. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August, 2012. TECHNOLOGY PROPOSAL FOR RESIDUAL GLYCERIN REUSE IN BIODIESEL PRODUCTION: INTEGRATED PROCESS. Advisor: Prof. Dr. Victor Haber Perez.

This work presents a technology alternative aimed to glycerin reuse as a carbon source for growth of *Yarrowia lipolytica*, integrating the soybean production chain and biodiesel production by enzymatic transesterification, using "whole cell" from cells of *Y. lipolytica*. To verify the electromagnetic fields effect on biological fermentations, we used a system set as Axial-Transversal, evaluating biomass cell production for "whole cells" (biocatalysts with intracellular enzymatic activity of lipase) and for single-cell protein production. The results revealed that the *Y. lipolytica* growing on medium containing glycerol as a carbon source, producing intracellular lipase, according to enzyme activity determinations, and the conditions that improved the enzymes production were different from those that affect cell growth in the application of low frequency electromagnetic fields and intensities, with and without recycle. The environmental impact assessment using WAR algorithm suggests the potential of this technology.

1. INTRODUÇÃO

A produção de energia é de fundamental importância para a existência humana, e essencial na satisfação das necessidades básicas. A economia mundial está baseada na produção industrial que utiliza como matriz energética os combustíveis fósseis, ameaçando a estabilidade ambiental da terra (Pereira et al., 2003). Neste contexto, surge o biodiesel, como a alternativa provável ao petrodiesel, existindo inúmeras espécies vegetais que podem ser utilizadas como fonte de matérias-primas para a sua produção (Carvalho, 2009).

Dentre as tecnologias utilizadas para a obtenção do biodiesel, o processo de transesterificação utilizando catalisadores químicos é o mais empregado (Knothe *et al.*, 2006). Porém, esse processo traz desvantagens, devido à dificuldade na separação do produto e do subproduto gerando um alto impacto ambiental. O uso de enzimas como biocatalisador, oferece as suas vantagens em relação aos catalisadores químicos, como por exemplo: maior grau de pureza e simplicidade de purificação do produto e do subproduto, capacidade de reutilização, reduzindo o impacto ambiental (Kojima *et al.*, 2004).

Contudo, o uso de enzimas tem suas desvantagens, tais como: longo tempo de reação e elevado custo. Uma alternativa é o uso de “whole cell” que consiste em utilizar como biocatalisador as células íntegras dos micro-organismos produtores de lipase intracelular.

Neste contexto, a *Yarrowia lipolytica* é uma levedura produtora de lipase intracelular, esta enzima tem a capacidade de hidrolisar triglicérides, podendo ser utilizada na produção de biodiesel e na produção de proteína unicelular (“Single Cell Protein”) para o consumo humano ou animal. O uso de proteína microbiana em ração animal, esta sendo estudado devido ao baixo custo de produção (Filho *et al.*, 1994; Togashi *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2002; Chiquieri *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2011).

Entretanto, com o aumento da produção do biodiesel, grandes volumes de glicerol são gerados, aproximadamente 10% da produção de biodiesel corresponde à glicerina (Knothe *et al.*, 2006), mas na prática esse valor alcança a ordem dos 20%. Desta forma, uma grande diversidade de pesquisas está sendo desenvolvida visando diminuir o impacto deste resíduo no ambiente e assim agregar valor à produção de biodiesel. Portanto, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma proposta tecnológica de aproveitamento do glicerol em processos fermentativos integrando a produção de biodiesel não convencional e a cadeia produtiva da soja.

2. OBJETIVOS

Desenvolver uma proposta tecnológica de reuso de glicerina residual da produção de biodiesel visando à implantação de processo integrado com a cadeia produtiva da soja.

Objetivos específicos

- Avaliar o uso de glicerol como fonte de carbono em processos fermentativos para estudar duas alternativas: a) desenvolver um biocatalisador a partir de *Yarrowia lipolytica* (“Whole Cells”), visando à produção de biodiesel pela rota enzimática e b) produzir proteína unicelular (“Single Cell Protein – SCP”) para a formulação de ração animal integrando a cadeia produtiva da soja;
- Estudar o efeito biológico do campo eletromagnético sobre o crescimento e produção do metabolito de interesse, lipase intracelular, durante a fermentação da *Y. lipolytica*;
- Propor e elaborar fluxogramas de processo integrado de produção de biodiesel considerando alternativas de reciclo de glicerol, com base nos resultados experimentais;
- Realizar a avaliação do impacto ambiental dessa tecnologia usando o algoritmo WAR (“Waste Reduction Algorithm”) tomando como referência um processo químico convencional.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biodiesel

É um combustível com baixa viscosidade, não tóxico, biodegradável e amigável com o meio ambiente. Uma vez que, sua combustão gera um número menor de gases poluentes, assim como, reduz as concentrações de determinados gases, tais como: CO₂ e óxido de enxofre, comparado com os combustíveis fósseis (Knothe *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2012; Choi e Oh, 2012).

O biodiesel consiste de uma mistura de ésteres de ácidos graxos que podem ser obtidos a partir de gorduras animais ou óleos vegetais (Ramírez-Verduzco *et al.*, 2012) por diferentes processos, tais como: craqueamento, esterificação ou transesterificação (Fabiano *et al.*, 2007), sendo o último o mais utilizado industrialmente (Ramírez-Verduzco *et al.*, 2012). Segundo Demirbas (2009), existem mais de 350 espécies de oleaginosas conhecidas no mundo que são adequadas para produção de biodiesel, porém, cerca de 90% da matéria-prima utilizada no Brasil é proveniente do óleo de soja (Olinegue *et al.*, 2011).

Uma das grandes preocupações na produção de biodiesel é com a concorrência entre a matéria-prima empregada no processamento com a utilizada na cadeia alimentar, como é o caso da soja (Huynh *et al.*, 2011; Santori *et al.*, 2012; Quintero *et al.*, 2012). Diante disto, diversos estudos têm

sido realizados utilizando oleaginosas que não são adequadas para consumo humano (Leung et al., 2010).

Queiroz et al. (2012), realizaram um balanço energético da produção de biodiesel de óleo de palma na Amazônia, avaliaram o plantio da palma, o processo de extração e a produção de biodiesel (avaliação do ciclo de vida). Os autores relatam que o maior gasto de energia, está na fase da agricultura devido ao uso de fertilizantes, obteve-se 98% de rendimento na reação de transesterificação utilizando etanol, este estudo é importante para desenvolver critérios de decisão na escolha da matéria-prima mais eficiente. A matéria-prima interfere nas propriedades do biodiesel, bem como, a tecnologia ou processo utilizado na sua produção.

O biodiesel geralmente é caracterizado por sua viscosidade, densidade, índice de cetano, faixa de destilação, ponto de fulgor, teor de cinzas, teor de enxofre, resíduos de carbono, valor ácido, corrosão do cobre e valor de aquecimento (Salamatinia et al., 2012). Na **Tabela 1**, apresentam-se as principais características físico-químicas de biodiesel utilizando diversas matérias-primas comparadas com o diesel.

Tabela 1. Características físico-químicas do biodiesel de várias espécies vegetais e do óleo diesel convencional (Costa Neto *et al.*, 2000)

Características	Origem do Biodiesel					Óleo diesel
	Mamona	Babaçu	Dendê	Algodão	Pequi	
Poder Calorífico (kcal/kg)	9046	9440	9530	9520	9590	10824
Ponto de névoa (°C)	-6	-6	6	nd	8	1
Índice de Cetano	nd	65	nd	57,5	60	45,8
Densidade a 20 °C	0,9190	0,8865	0,8597	0,8750	0,8650	0,8497
Viscosidade a 37,8 °C (cSt)	21,6	3,9	6,4	6,0	5,2	3,04
Inflamibilidade (°C)	208	nd	nd	184	186	55
Ponto de fluidez (°C)	-30	nd	nd	-3	5	nd
Teor de cinzas (%)	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,014
Cor (ASTM)	1	0	0,5	1,0	1,0	2,0
Resíduo de Carbono	0,09	0,03	0,02	nd	0,01	0,35

nd= não determinado

Dentre os catalisadores empregados na reação de biodiesel, o uso de enzimas tem atraído a atenção de muitos cientistas (Kojima et al., 2004), devido à ausência de formação de sabão e simplicidade do processo de purificação dos produtos e subprodutos. No entanto, estes biocatalisadores não têm sido empregados industrialmente devido ao grande tempo de conversão e seu alto custo, sendo os catalisadores químicos os mais empregados (Fukuda et al., 2008).

O uso de enzimas lipases (triacilglicerol éster hidrolase, EC. 3.1.1.3) como biocatalisadores tem sido estudada devido à sua conversão e simplicidade de purificação do biodiesel e dos subprodutos. No entanto, os principais obstáculos para sua utilização são: o alto custo, a lenta taxa de conversão e a inativação da enzima pelo álcool e glicerol (Jang et al., 2012; Gog et al., 2012).

Diante disto, o uso de micro-organismos, tais como: bactérias, leveduras e fungos filamentosos que têm a capacidade de ser utilizados como biocatalisadores (“whole cells”) na reação de biodiesel (Fukuda et al., 2008). O uso de micro-organismos produtores de lipase intracelular é uma alternativa devido aos seus menores custos (Gog et al., 2012). A Tabela 2 apresenta alguns estudos utilizando “whole cells” como biocatalisador na reação de biodiesel. Pode-se observar o longo tempo de conversão dos óleos empregados, sendo este, um dos principais problemas encontrados quando se utilizam estes biocatalisadores.

Tabela 2. Diferentes tipos de processos de produção de biodiesel pela rota enzimática

Reação	Biocatalisador	Temperatura de reação	Reatores	Tempo de reação (h)	Observações	% em conversão	Referências
Metanólise com óleos de soja e	Células de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizados em suportes de poliuretano	35°C	Frascos agitados em "shaker" (130 rpm)	24 com solvente e 72 para sistema livre de solvente	Tampão fosfato 0,1 M (pH 6.8), usado para ajustar o conteúdo de água e solvente tert-butanol os autores estudam métodos com e sem adição de solvente.	72	(Li <i>et al.</i> , 2007)
Metanólise com óleo de palma utilizando resíduos da indústria de refino do diesel como solvente	Lípase em pó de <i>Candida cylindracea</i>	37°C	Reator de 2 L com agitador a 250 rpm	3	-	100	(Kojima <i>et al.</i> , 2004)
Metanólise com óleo de soja e água destilada	Células de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizados em suportes de poliuretano	30°C	Frascos agitados em "shaker" (150 rpm)	1	-	90	(Hama <i>et al.</i> , 2007)
Metanólise com óleo de soja com água destilada	Células de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizados em suportes de poliuretano	Temperatura ambiente	reator de leito fixo	1	A mistura foi emulsionada por ultrassom durante 5 min antes da reação	90	(Hama <i>et al.</i> , 2007)

Tabela 3. Cont.

Reação	Biocatalisador	Temperatura de reação	Reatores	Tempo de reação (h)	Observações	% em conversão	Referências
Metanólise, Etanólise, Propanólise e Butanólise todas com óleo de colza	<i>Rhizopus oryzae</i> (w-ROL) e <i>Aspergillus oryzae</i> recombinante expressando <i>Fusarium heterosporum</i> (r-FHL).	30°C	Frascos agitados em "shaker" (150 rpm)	72	Em todas as reações utilizam água destilada com solvente e o álcool correspondente a cada reação foi adicionado em tempos predeterminados	79 (w-ROL) e 94 (r-FHL)	(Koda <i>et al.</i> , 2010)
Metanólise com óleos de soja e tampão fosfato 0,1 M (pH 6.8)	Células de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizados em suportes de poliuretano	30°C	Frascos agitados em "shaker" (150 rpm)	72	Adicionou metanol nos tempos de 24 e 48 h de reação	-	(Oda <i>et al.</i> , 2005)
Metanólise com óleos de soja e tampão fosfato 0,1 M (pH 6.8)	Células integras de <i>R. oryzae</i>	35°C	Frascos agitados em "shaker" (150 rpm)	24	Adicionou metanol durante a reação	94	(Sun <i>et al.</i> , 2010)
Metanólise com óleo de soja, água destilada e líquido iônico (Dioleoylglycerol).	Células de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizados em suportes de poliuretano	30°C	Frascos agitados em "shaker" (250 rpm)	72	Os autores estudam o uso de líquidos iônicos que funcionou como um reservatório de metanol para suprimir a desativação da enzima	-	(Arai <i>et al.</i> , 2010)
Metanólise com óleos de soja e tampão fosfato 0,1 M (pH 6.8)	Células de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizados em suportes de poliuretano	35°C	Frascos agitados em "shaker" (150 rpm)	72	Adicionou metanol três vezes durante a reação	70 a 83	(Ban <i>et al.</i> , 2002)

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de biodiesel, ficando atrás de França e Alemanha, mas a expectativa é que o Brasil lidere o mercado mundial em 2020 (Olinegue *et al.*, 2011).

Desde o início de 2010, o Brasil utiliza uma mistura de 5% de biodiesel no diesel (chamado de B5), através da iniciativa de uma antecipação de três anos da meta estabelecida pelo Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que estabeleceu obrigatoriedade da adição do biodiesel ao óleo diesel comercializado no país (Olinegue *et al.*, 2011). O governo tem o objetivo de lançar o programa B10 em todo o país (Silalertruksa *et al.*, 2011), o que ocasionaria uma demanda brasileira de 5 bilhões de litros de biodiesel por ano, precisando 4,5 toneladas de óleo de soja, correspondente a 70% da produção nacional (Olinegue *et al.*, 2011).

3.2. Glicerina

3.3. Características gerais

O glicerol (1, 2,3 propanotriol), é um líquido oleoso, incolor, viscoso, de sabor doce e solúvel em água, presente em diferentes espécies incluindo protistas unicelulares, em óleos vegetais tais como: coco, dendê, soja, algodão, dentre outras oleaginosas, bem como, em gorduras de animais como a banha de porco e sebo (Arruda *et al.*, 2007). Raramente é encontrado em estado livre, sempre como um triglicerídeo, em combinação com ácidos graxos (Knothe *et al.*, 2006), constituindo cerca de 10% destes materiais (Cardona *et al.*, 2010).

Devido a suas propriedades químicas, o glicerol possui várias aplicações que permitem o uso como umectantes, plastificante, lubrificante, edulcorantes, anticongelantes, dentre outras. Obtido principalmente como coprodutos da indústria oleoquímica, é uma substância muito versátil devido à combinação de suas propriedades físicas e químicas, tendo mais de 1500 aplicações, limitadas somente pela imaginação e criatividade das comunidades científicas e técnicas (Cardona *et al.*, 2010).

Com a crescente demanda de biodiesel no mercado mundial, cresceu também a geração de glicerol, conseqüentemente, empresas foram fechadas e a indústria oleoquímica afetada pelo excesso no mercado, provocando queda

no preço. Contudo, várias estratégias com base em transformações do glicerol em produtos de maior valor agregado têm sido estudadas, como no caso da conversão biológica desse subproduto (Papanikolaou *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007; Zhang e Yang, 2009; Da Silva *et al.*, 2009; Chatzifragkou *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011).

A bioconversão do glicerol em compostos de alto valor através da fermentação microbiana vem sendo amplamente estudada. Segundo Da Silva e colaboradores (2009), o glicerol não só é uma fonte de carbono barata e abundante, mas também apresenta um maior grau de redução comparado com outros açúcares, oferecendo a oportunidade de obter produtos químicos com maior valor agregado, como 1,3-propanodiol (Papanikolaou *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Chatzifragkou *et al.*, 2011), dihidroxiacetona (Hu *et al.*, 2011; Chatzifragkou *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2011), ácido succínico (Sakai *et al.*, 2009; Blankschien *et al.*, 2010; Chatzifragkou *et al.*, 2011), ácido propiônico (Zhang e Yang, 2009; Zhu *et al.*, 2010), ácido cítrico (Da Silva *et al.*, 2009; Chatzifragkou *et al.*, 2011), dentre outros produtos.

3.4. Metabolismo e conversão do glicerol por micro-organismos

A substituição de uma fonte de carbono tradicional, tal como glicose, para fontes menos dispendiosas apresenta um impacto positivo sobre a economia dos bioprocessos. Redução de custos em meios de crescimento com o mínimo de efeitos indesejáveis é crucial para uma implementação do potencial industrial. Neste contexto, o glicerol como um subproduto industrial disponível em grandes quantidades, parece uma alternativa interessante (Da Silva *et al.*, 2009). Sun e colaboradores (2008) realizaram estudos do modelo cinético da fermentação contínua da *Klebsiella pneumoniae* em glicerol, observando o transporte através das membranas, os produtos formados e os inibitórios. A desassimilação do glicerol é a absorção pelas células e eliminação que pode seguir duas rotas: oxidativa ou redutiva.

O transporte do glicerol através da membrana celular pode ser por difusão passiva ou pelo transporte facilitado, variando de acordo com a concentração de glicerol no meio de cultivo. O transporte facilitado ocorre

quando há baixa concentração de glicerol no meio (inferior a 8 mmol L^{-1}) por meio de uma enzima transportadora, a permease, transporte esse semelhante ao da *E. coli* (Sun *et al.*, 2008; Richery e Lin, 1972; Heller *et al.*, 1980).

Na via oxidativa, o glicerol é desidrogenado pela enzima gliceroldesidrogenase (glyDH-I), a dihidroxiacetona é fosforilada pela outra enzima DHAK para formar DHP (dihidroxiacetona fosfato) entrando na glicólise. Na via redutiva, em paralela com a oxidativa, o glicerol é desidratado por uma enzima glicerol desidratase, para formar três hidroxipropionaldeído (3HPA), o 3 HPA é logo reduzido ao principal produto da fermentação 1,3-propanodiol (**Figura 1**), somente poucos micro-organismos possuem as duas enzimas para seguir as duas rotas descritas. A necessidade de uma via ativa para 1,3 PDO resulta do estado altamente reduzido dos carbonos do glicerol que são incorporados na massa celular, gerando prótons que são consumidos na rota redutiva, permitindo um balanço redox na ausência de aceptor de elétrons (Yazdani e Gonzalez, 2007).

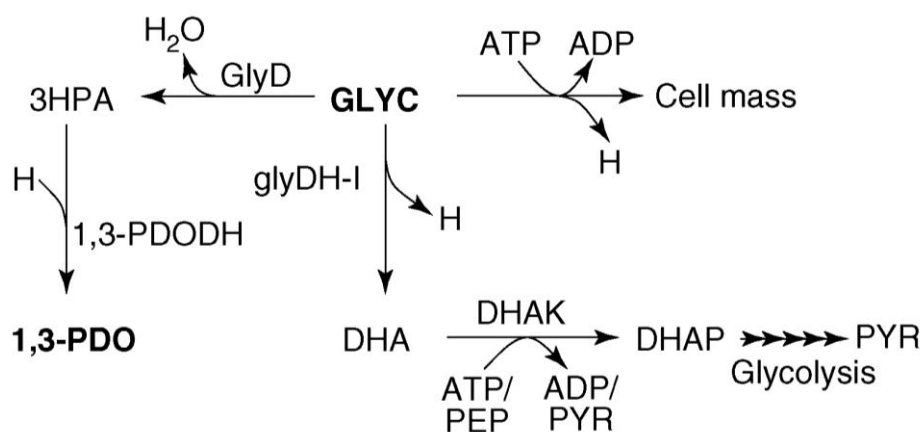


Figura 1. Modelo para o processo fermentativo do glicerol (Yazdani e Gonzalez, 2007).

A maioria dos micro-organismos, que fermentam o glicerol produzindo 1,3 propanodiol, utiliza a via anaeróbica, com receptor de elétrons, fermentando o glicerol a 1,2 propanodiol (Gonzalez *et al.*, 2008). Algumas das estratégias para fermentação do glicerol são: a eletrodialise, estudo de inibidores, manipulação de parâmetros de cultura e modificação genética de micro-

organismos, porém, esses micro-organismos são anaeróbicos estritos e alguns patogênicos, inviabilizando assim o estudo (Gonzalez *et al.*, 2008).

A modificação metabólica da *E. coli*, teoricamente pode produzir 1,2 PDO, ácido propiônico, ácido succínico, ácido fórmico, butanol e etanol como demonstrado na **Figura 2** (Yazdani e Gonzalez, 2007).

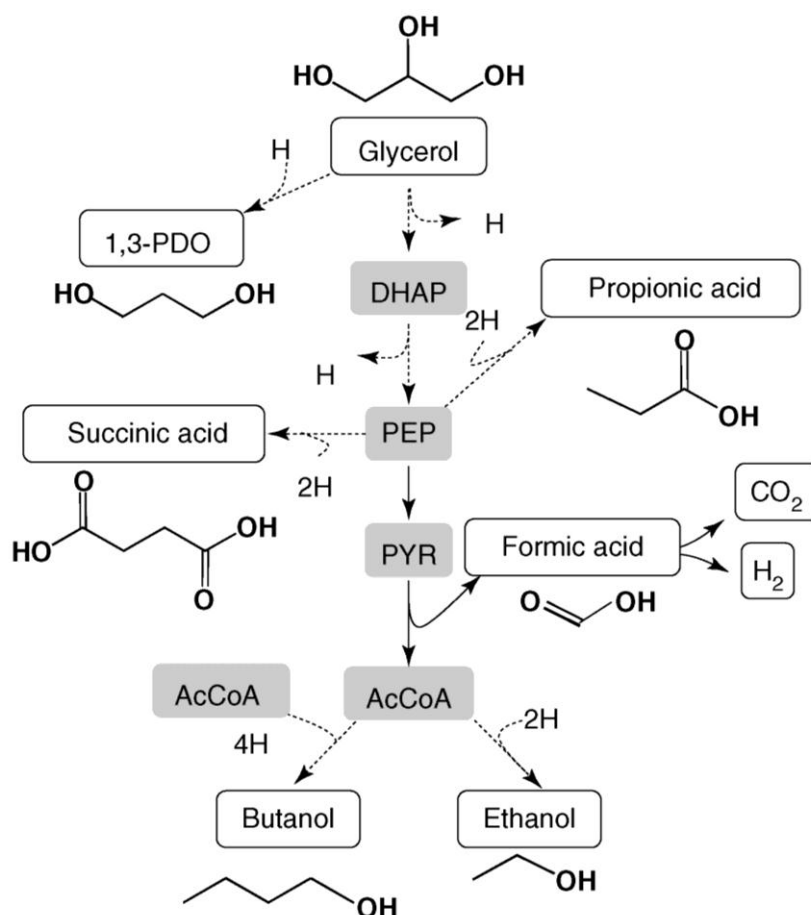


Figura 2. Possíveis produtos da fermentação utilizando o glicerol como substrato (Yazdani e Gonzalez, 2007)

3.5. *Yarrowia lipolytica*

A levedura *Yarrowia lipolytica* é considerada por vários autores como “fungo não convencional”. É um micro-organismo estritamente aeróbio, pertencente ao reino Fungi, foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e por fim *Yarrowia lipolytica* (Barth e Gaillardin,

1997; Amaral *et al.*, 2006; Gomes, 2005). Geralmente é isolada de ambientes ricos em lipídeos e proteínas, como produtos lácteos, carne ou camarão, em aves cruas, no meio ambiente como, por exemplo, a Baía de Guanabara, no estado do Rio de Janeiro, dentre outros (Vasdinyei e Deak, 2003, Amaral *et al.*, 2006).

É capaz de produzir metabólitos importantes como: ácidos orgânicos, lisina, proteases extracelulares, lipases, estereases, fosfatases, dentre outros metabólitos de grande interesse industrial (Szabo e Stofanikova, 2002), justificando assim, os estudos. É considerada pela “American Food and Drug Administration” como um micro-organismo não patogênico podendo ser utilizada em aplicações industriais, como na produção de proteínas de micro-organismos unicelulares, sabor de pêssego e na produção de ácido cítrico (Kawasse *et al.*, 2003, Gomes, 2005, Cervantes-Chávez *et al.*, 2009).

Além disso, esta levedura é considerada um modelo adequado para estudos de dimorfismo, uma vez que tem um sistema eficiente de transformação genética, sendo fácil de distinguir entre as suas formas morfológicas. Estudos revelam que o dimorfismo está relacionado a um mecanismo de defesa para condições adversas, como temperatura e alterações nutricionais (Guevara-Olvera *et al.*, 1993, Gomes, 2005, Cervantes-Chávez *et al.*, 2009)

Um dos mais importantes produtos secretados pela *Yarrowia lipolytica* é a lipase, uma enzima que pode ser explorada para diversas aplicações, tais como: na indústria de detergente, alimentos, farmacêutica, dentre outras (Oda *et al.*, 2005, Fickers *et al.*, 2005, Amaral *et al.*, 2006). A lipase produzida pela *Y. lipolytica* é um dos principais metabólitos de interesse biotecnológico, devido à sua capacidade de hidrolisar lipídios, na interface entre óleo e água em sistemas heterogêneos. A atividade das enzimas é determinada pela relação das condições como o pH, a temperatura e a presença de compostos inibitórios (Amaral, 2007).

Pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de aumentar a produtividade da lipase durante o processo de fermentação, que é de grande importância, uma vez que, os custos mais baixos de produção poderiam promover novas aplicações industriais. Corzo e Revah (1999) estudaram

diferentes condições de cultivo da *Y. lipolytica* para produção de lipase, observa-se que o azeite de oliva reforçou a produção de enzimas quando utilizado como fonte de carbono e indutor. Também estudaram o efeito da ureia como fonte de nitrogênio, na qual apresentou melhor crescimento e produção de enzimas. Observaram a importância dos níveis de aeração, verificaram que em baixos níveis de aeração houve um aumento na atividade de lipase extracelular.

Outra aplicação desta levedura é na produção de ácido cítrico, onde se encontra vários estudos na literatura sobre a síntese deste ácido orgânico (Chatzifragkou *et al.*, 2011). Levinson e colaboradores (2007) estudaram vinte e sete cepas de *Y. lipolytica* e outras cinco cepas, sendo três do gênero *Yarrowia*, para a produção de ácido cítrico utilizando o glicerol puro como fonte de carbono em condições limitantes de nitrogênio. As fermentações em sistemas contínuos foram realizadas em erlenmeyers utilizando 4% de glicerol no meio de cultivo durante 10 dias, a produção de ácido cítrico foi avaliada por cromatografia líquida. Todas as cepas cresceram em meio contendo glicerol produzindo ácido cítrico, chegando a rendimento de 54 % de conversão com a cepa *Y. lipolytica* NRRL YB-423.

Makri e colaboradores (2010) estudaram as três fases de crescimento da *Y. lipolytica* em glicerol (produção de biomassa, lipogênica e produção de ácido cítrico), com caracterização morfológica e bioquímica, eles observaram um aumento no tamanho das células devido à presença de lipídios durante o início da fase estacionária, ou seja, fase lipogênica. Os autores enfatizaram que o glicerol foi convertido em lipídio celular e somente no final da fase estacionária que houve a síntese e secreção de ácido cítrico.

Chatzifragkou, *et al.* (2011), estudaram quinze cepas de micro-organismos eucarióticos em meio contendo glicerol como fonte de carbono, dentre as cepas pesquisadas, a *Y. lipolytica* LFMB 19, foi um dos focos neste estudo, os autores enfatizaram apenas em três cepas (*Y. lipolytica*, *P. membranifaciens* e *T. elegans*), não apresentando dados da produção de metabólitos dos demais micro-organismos pesquisados, somente a produção de lipídios. No caso específico da *Yarrowia*, autores utilizaram três diferentes concentrações de glicerol no meio de crescimento (30, 60 e 90 g/L), em

condição limitante de nitrogênio. Dentre os metabólitos secretados pela *Y. lipolytica* (ácido acético, ácido cítrico e manitol), quantidades significativas de ácido acético (29,2 g / L), bem como, manitol (19,4 g / L) e cerca de 6% de lipídios intracelulares em relação à biomassa produzida. Quando utilizaram uma concentração inicial de 30 g/L de glicerol, em menos de 100 horas de fermentação todo o glicerol foi consumido. Para concentração inicial de 90 g/L, a produção de biomassa foi mais baixa (5,9 g/L), sugerindo inibição pelo substrato. Quanto ao consumo de glicerol durante a fermentação pela *Y. lipolytica*, os autores apresentaram somente a curva com a concentração inicial de 30 g/L.

3.6. Catabolismo do glicerol na célula da *Yarrowia lipolytica*

Em micro-organismos eucarióticos em geral, o glicerol é transformado em compostos intermediários na rota glicolítica, pela fosforilação direta a glicerol-3-fosfato e posterior desidrogenação pela rota oxidativa em dihidroxiacetona fosfato, o qual pode ser transformado em ácido cítrico, na armazenagem de lipídios e vários outros produtos (Makri *et al.*, 2010; Papanikolaou e Aggelis, 2002; Morgunov *et al.*, 2004; Rywin´ Ska *et al.*, 2009).

O glicerol entra na célula da *Y. lipolytica* através da difusão facilitada, sendo metabolizado pela rota de fosforilação, uma vez que, a mesma não apresenta enzimas pela rota oxidativa. Foram identificadas três fases distintas (Figura 3), chamadas de fase de produção de biomassa, fase lipolítica e fase de produção de ácido cítrico (Makri *et al.*, 2010).

Durante a fase de produção de biomassa (Figura 3), observaram micélios e pseudomicélios curtos. No início da fase estacionária, ou fase lipogênica, se formaram células com grandes glóbulos de lipídios, o tamanho dos glóbulos lipídicos diminuiu ao final da fase estacionária, chamada fase de produção de ácido cítrico, pois importantes quantidades foram secretadas para fora das células (Makri *et al.*, 2010).

Na fase de produção de biomassa celular, a atividade da glicerol quinase decresceu devido à transição da fase lipogênica. Durante a rota de produção de biomassa, o glicerol foi convertido principalmente em material celular, no

final dessa fase quando o nitrogênio de amônia foi consumido algumas quantidades de lipídios e de ácido cítrico foram sintetizadas (Makri *et al.*, 2010).

Na fase lipogênica, o glicerol é convertido principalmente em lipídios celulares, com pequenas quantidades de ácidos cítricos secretados no meio de cultivo, especialmente quando a concentração de glicerol é baixa no início da fermentação. Observaram também, que quantidades significativas de lipídios armazenados são degradadas e o glicerol é convertido em ácido cítrico, durante a troca entre a rota lipogênica. Os tamanhos das células foram diferentemente proporcionais à porcentagem de lipídios acumulado no interior das células (Makri *et al.*, 2010).

Em biorreatores, a agitação mecânica deve ser suave para evitar o rompimento das células miceliais, principalmente na fase exponencial de crescimento, para não haver queda na concentração de biomassa no biorreator (Makri *et al.*, 2010).

Outros micro-organismos oleaginosos acumulam reservas lipídicas por falta de nitrogênio e degradam os lipídios em condições de falta de carbono, normalmente a mudança ocorre no final da fase estacionária após o esgotamento da fonte de carbono ou quando a absorção da fonte de carbono não satura as atividades anabólicas dentro das células. A conversão de lipídios foi relacionada com a atividade reduzida da glicerol quinase durante a fase de produção de ácido cítrico, levando a baixas concentrações de glicerol dentro da célula (**Figura 3**). Nestas condições, os triglicerídeos de reserva, foram degradados para a manutenção das células, e não para síntese de biomassa (Makri *et al.*, 2010).

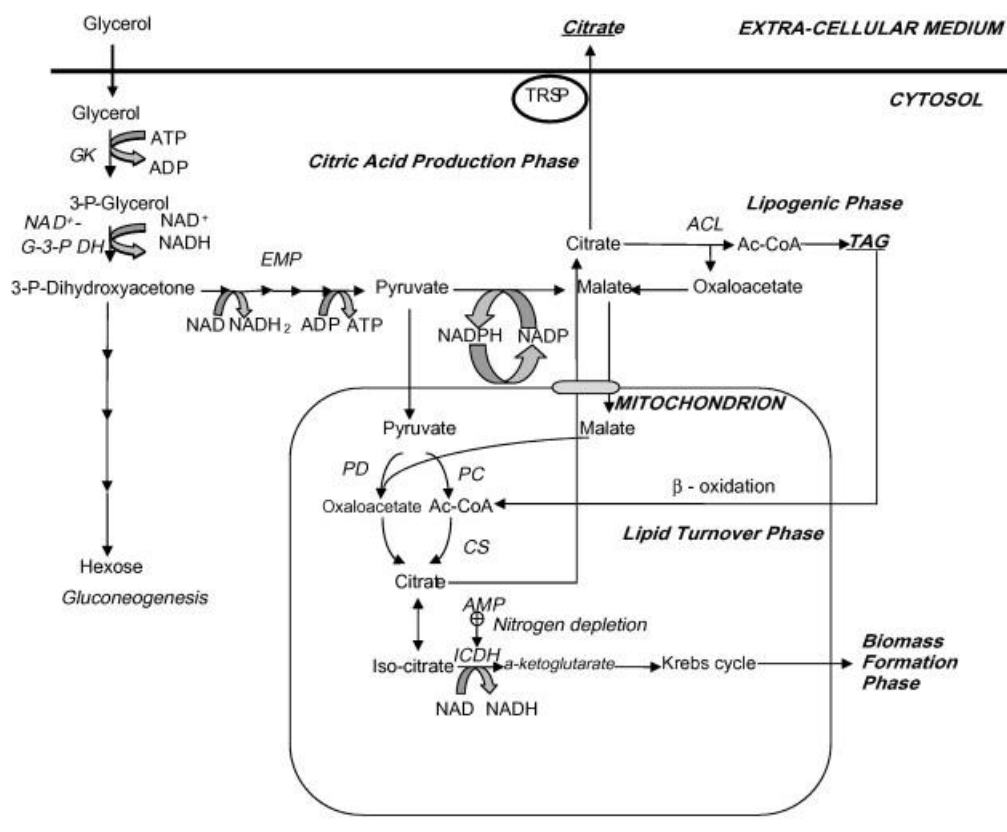


Figura 3. Caminhos envolvidos no catabolismo de glicerol e intermediários, tanto na biossíntese de lipídios intracelular ou extracelular do ácido cítrico pela *Yarrowia lipolytica* (Makri *et al.*, 2010).

3.7. Proteína Unicelular

O cultivo de micro-organismos em grande escala para produção de proteínas microbianas (“single cell protein”) seja para o consumo humano ou animal, se tornou uma alternativa promissora a escassez de alimentos. Depois da 1ª Guerra Mundial, já tinham relatos da incorporação de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* em sopas e salsichas, visando suprir o conteúdo proteico dos alimentos (Sasson, 1989).

Ao final dos anos 50, a British Petroleum (BP) se interessou pela produção de biomassa microbiana a partir de hidrocarbonetos como matéria-prima. O processo utilizava dejetos de petróleo, como substrato para o crescimento da *Y. lipolytica* visando à produção de proteína microbiana (Ward, 1989).

Os micro-organismos utilizados como fonte de proteína unicelular incluem uma variedade de microalgas marinhas, bactérias, leveduras e fungos

(Cui *et al*, 2011) com conteúdo proteico entre 33 e 45%, mas estes devem atender algumas exigências para o seu consumo, tais como: não ser patogênico e conseqüentemente não produzir toxinas, devem ser estáveis geneticamente de tal forma que as cepas mantenham suas características fisiológicas e bioquímicas durante todo o processo de produção e posterior consumo (Ward, 1989).

Por outro lado, a utilização de resíduos de diversas fontes como substrato para o crescimento microbiano é uma excelente matéria-prima, viabilizando economicamente o processo (Sobrinho, 2007).

Vendruscolo e colaboradores (2007) estudaram o uso do bagaço de maçã enriquecido com ureia como substrato para a produção de proteína unicelular a partir do fungo *Gongronella butleri* CCT4274. Os autores reportaram um aumento de 2,5 vezes no conteúdo proteico, chegando a produzir 19,24% de proteína solúvel.

Em estudo similar, Reffatti *et al.* (2007), estudaram o uso de material lignocelulósico no crescimento do fungo *Lentinula edodes*, com o objetivo de produzir proteína unicelular, os experimentos foram realizados em um biorreator, chegando a obter um rendimento biológico de aproximadamente 8 g/L de biomassa, com teor protéico da ordem de 17%.

Cui e colaboradores (2011) clonaram um gene (gene INU1) que codifica exo-inulinase do fungo *K. marxianus* CBS 6556 no plasmídeo de expressão da *Y. lipolytica* para produção de proteína microbiana, chegando a produzir cerca de 47,5% de proteína bruta e 20,1 g/L após 72 h de cultivo em meio contendo 4% de inulina.

As indústrias brasileiras de rações dependem principalmente do crescimento das indústrias produtoras de aves e suínos, sendo que a mesma depende do desempenho das exportações, já que o mercado doméstico apresenta níveis de consumo de carnes semelhantes aos dos países desenvolvidos. A demanda per capita por frango no Brasil atingiu 43,5kg em 2010, com saldo da produção de 12,3 milhões de toneladas. Em 2011, os produtores e exportadores estimaram um crescimento da ordem de 3 a 5%, ou 12,9 milhões de toneladas de frango. A **Figura 4**, apresenta o consumo de

ração por espécie, onde se pode observar a demanda de ração para o crescimento de aves, devido à influência da exportação de carne.

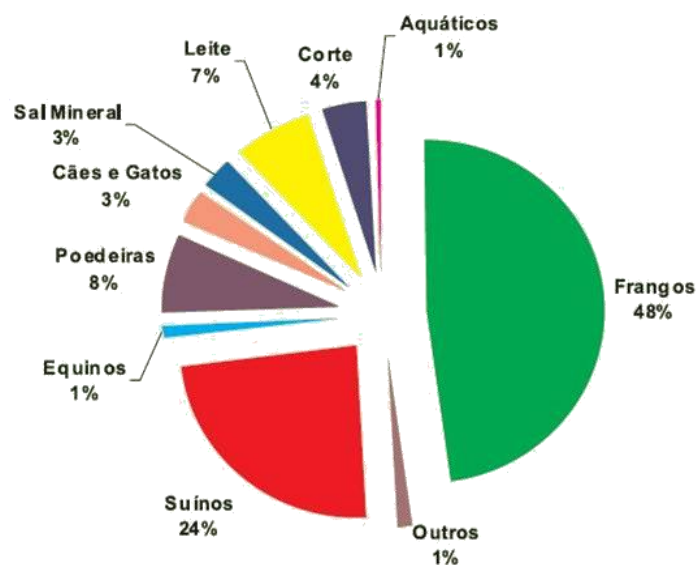


Figura 4. Consumo de ração por espécies em 2010 (Sindirações, 2011).

3.8. Aplicações de campo magnético em processos biológicos

O estudo de campo magnético é de interesse considerável tanto na biologia celular quanto na biotecnologia, não somente para estabelecer mecanismos básicos dessa interação, mas também para determinar seu potencial em aplicações práticas (Lei e Berg, 1998). Uma das razões pela qual a eletroestimulação é raramente aplicada aos processos de fermentação, são os seus mecanismos complicados, bem como, o desconhecimento das condições limitantes em nível molecular da maioria dos processos de fermentação, bem como, na produção de metabólitos (Mitteenzwey *et al.*, 1996).

As aplicações de campo magnético são bem diversificadas, como por exemplo, no melhoramento da germinação de sementes, crescimento de plantas (Sala, 1999; Radhakrishnan e Kumari, 2012; Selim e El-Nady, 2011), aplicação em animais (Rodriguez *et al.*, 2003; Lagroye *et al.*, 2011), sistema nervoso central dos mamíferos (Hong e Shellock, 1990), no crescimento de micro-organismos (Potenza *et al.*, 2004; Iwasaka *et al.*, 2004; Ruiz-Gomez *et*

al., 2004; Novák *et al.*, 2007) e produção de metabólitos (Dini e Abbro, 2005; Alvarez *et al.*, 2006, Santos *et al.*, 2010, Ulbrich *et al.*, 2010).

Em bioprocessos, à aplicação de campos magnéticos ou eletromagnéticos inclui uma ampla gama de fenômenos que vão desde alterações nas taxas de crescimento, inibição, estimulação e até a produção de metabólitos e para tais efeitos, deve considerar a força de campo, a frequência, a forma de impulsos, a intensidade magnética, e tempo de exposição (Hunt *et al.*, 2009). Na **Tabela 4**, encontram-se alguns estudos da aplicação de campo magnético no crescimento microbiano, onde pode observar os fenômenos supracitados.

Os resultados contraditórios e a falta de reprodutibilidade são problemas típicos nas pesquisas com campo magnético, sendo que a diferença entre os resultados obtidos pelos diferentes pesquisadores pode ocorrer por diversos fatores, como o tipo de sistema de gerador de campo, a intensidade do campo, o tipo de orientação do fluxo (oscilatório ou estático), os polos magnéticos, o tempo de contato do micro-organismo com o campo, a densidade de células e meio ambiente da célula (por exemplo, tipo de meio e seus nutrientes) e outras condições físico-químicas que afetam o processo de bioestimulação através de forças eletromagnéticas (Mitteenzwey *et al.*, 1996; Hunt *et al.*, 2009).

Os campos eletromagnéticos servem como mediadores para a interligação do organismo com o meio ambiente, bem como, entre os organismos (Hunt *et al.*, 2009). Para entender um pouco dos mecanismos envolvidos com a presença de campo magnético e eletromagnéticos nas células, é interessante saber um pouco do potencial de membrana. As membranas biológicas são isoladores elétricos, devido à sua estrutura composta por uma bicamada fosfolipídica, são impermeáveis a íons, possui poucos canais iônicos que são temporariamente abertos (Buehler, 1999).

O potencial eletroquímico está disponível para os organismos para ocorrer a biossíntese (fotossíntese e respiração), o transporte de metabólitos (absorção e secreção), o trabalho mecânico (movimentação dos flagelos bacterianos) e processos de sinalização (ações potenciais). Os potenciais de ação, são uma forma de informação utilizada por membranas excitáveis eletricamente para controlar a atividade das células (sinalização de cálcio), a

contratilidade muscular (Neumann, 2000) e para apoiar ou suprimir comunicação entre as células como na liberação de moléculas de sinalização química, como hormônios, neurotransmissores (Buehler, 1999). Segundo Hunt e colaboradores (2009), o efeito do campo magnético pode afetar vários sítios nas moléculas, como:

Membrana Celular

- Oscilações do campo magnético podem aumentar a permeabilidade da membrana;
- O aumento da circulação e valorização seletiva do fluxo de íons pode afetar a taxa de reações bioquímicas;
- Alterar a taxa de ligação de íons de cálcio para enzimas ou receptores;
- Mudança de distribuição de proteínas e lipídios e nas associações proteína-lipídio;
- Alterar a distribuição molecular interna de carga eletrônica dentro de moléculas lipídicas na bicamada da membrana.

Núcleo / DNA

- O campo magnético afeta a expressão de genes específicos;
- Sequências de DNA individuais podem funcionar como antenas;
- Leva a mudanças na conformação do DNA;
- Pode ativar diferentes sequências de DNA, dependendo da intensidade do campo;
- Pode afetar a atividade da enzima.

Outros efeitos fisiológicos nas células em presença de campo magnético têm sido observados, como por exemplo, na absorção de carbono, a síntese de açúcar, carboidratos e proteínas, o acúmulo de metais e aminoácidos essenciais e até mesmo processos genéticos, como a transposição (Hunt *et al.*, 2009).

A literatura mostra que a aplicação de campos eletromagnéticos altera as características morfológicas, síntese do DNA, RNA e proteína, bem como, no crescimento celular e na produção de metabólitos (Binninger e Ungvichian, 1997). Diante disto, são apresentados alguns estudos com cepas de micro-organismos crescidos sob a presença de campo magnético.

Hirano *et al.* (1998), estudaram o efeito do campo magnético no crescimento de uma cianobactéria, a *Spirulina platensis* sobre a sua atividade fotossintética e produção de metabólitos. Utilizando densidades de campo em uma faixa de 50 a 700 Gauss, o crescimento foi acompanhado através da densidade óptica e pelos resultados alcançados os autores verificaram que o campo magnético acelerou o crescimento de *S. platensis* a uma densidade de fluxo magnético de cerca de 100 gauss. Este resultado sugere que o campo magnético acelera a excitação da luz e produção de radical par, a transferência de elétrons e a conversão da energia luminosa em energia química. Quando aplicaram uma densidade de fluxo magnético acima de 400 gauss os autores observaram uma inibição no crescimento e uma diminuição na síntese de açúcar pelo micro-organismo.

Muniz e colaboradores 2007, avaliaram o efeito do crescimento da *S. cerevisiae* sob efeito de campo magnético contínuo durante as 24 horas de fermentação em sistema de batelada. Os experimentos foram conduzidos em um tubo exposto ao campo, com um fluxo de intensidade de 220 mT, produzidos por ímãs de NdFeB fixados opostos diametralmente (N para S) em um tubo do reator de fermentação e em outro tubo sem a presença de ímãs fermentação ocorreu nas mesmas condições (controle). Como fonte de carbono os autores utilizaram glicose. O crescimento da levedura foi monitorado através da densidade óptica e por peso seco. Como resultado, Muniz *et al.* (2007), verificaram que houve uma maior produção de biomassa celular de 2,5 vezes maior comparado com o experimento sem o campo e que a taxa de crescimento foi maior do que a taxa de consumo de glicose, sugerindo um ganho no processo de produção de biomassa com aplicação do campo magnético.

Em estudo com o fungo *Aspergillus niger*, Gao *et al.* (2011) estudaram a influência do campo magnético de baixa frequência na produção de ácido cítrico e celulase. Os experimentos realizados em “shaker” acoplados com um conjunto de 6 bobinas cilíndricas em volta de um material de proteção magnética alimentado por um transformador. Com este sistema, os autores aplicaram uma intensidade de 1 mT na suspensão celular. Como resultados, obtiveram um maior rendimento na produção de ácido cítrico e na atividade de

celulase aumentou com o tempo de exposição ao campo. A **Tabela 3** apresenta alguns estudos de processos biotecnológicos conduzidos sob o efeito de campos magnéticos e eletromagnéticos, onde pode observar diferentes comportamentos no crescimento dos micro-organismos em estudo bem como, a diferença entre os processos de tratamento com o campo eletromagnético.

Tabela 4. Diferentes processos biotecnológicos conduzidos sob o efeito de campos magnéticos

Tipo de micro-organismo	Sistema de Fermentação	Sistema de avaliação	Intensidade do campo	Tempo de exposição	Observações	Referências
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	Reator	Produção de glutatona	25-34,3 mT	72 h	Estimulou o crescimento e produção de lisina pela levedura	(Santos <i>et al.</i> , 2010)
<i>Escherichia coli</i>	Frascos de 50 mL	Crescimento e expressão do gene	300 mT	50 h	Aumento na proliferação das células e alterações na expressão do gene	(Potenza <i>et al.</i> , 2004)
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Fermentador com sistema de reciclo	Produção de Nisina	5-20 mT	4-12 h	Aumento de cinco vezes no rendimento e três vezes na produção de biomassa	(Alvarez <i>et al.</i> , 2006)
Micro-organismos em lodo	Frascos de vidro colocados em um agitador	Consumo de substratos	8,9 a 46,6 mT	24 h	Intensidade de 17,8 mT não teve alteração no crescimento, mas obteve um aumento no consumo de substrato	(Yavuz e Celebi, 2000)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tubos cilíndricos expostos a um imã supercondutor	Proliferação da levedura	9-14 T	21 h	A 14 T houve proliferação lenta da levedura em 16 h , os autores sugerem que houve falta de oxigênio no meio	(Iwasaka <i>et al.</i> , 2004)
<i>Escherichia coli</i> e <i>Paracoccus denitrificans</i>	Placas de Petri com bobina cilíndrica alimentada por um autotransformador	Mudanças na morfologia	10 mT	1 h	Não observaram nenhuma mudança na morfologia	(Fojt <i>et al.</i> , 2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> WS8105-1C	Em frascos ependorf com par de bobinas de Helmholtz	Efeitos de crescimento	0.35 a 2.45 mT	24 e 72 h	Não houve alterações no crescimento	(Ruiz-Gomez <i>et al.</i> , 2004)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 227	Vaso com bobinas Helmholtz	Formação de ATP	3,4 e 4,9 mT	8h	Com 3,4 mT aumentou 20% após 8h e com 4,9 mT aumentou 30% após 6 h	(Lei e Berg, 1998)
<i>Aspergillus niger</i>	“shaker”	Produção de ácido cítrico e celulase	1 mT	4h	Aumento de rendimento na produção de ácido cítrico e celulase	(Gao <i>et al.</i> , 2011)

Tabela 5. Cont.

Tipo de micro-organismo	Sistema de Fermentação	Sistema de avaliação	Intensidade do campo	Tempo de exposição	Observações	Referências
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Em placas no interior de uma bobina cilíndrica alimentado por um transformador	Crescimento da levedura	10 mT	24 min	Matou parte da levedura e a maior parte sobreviveu e continua em seu crescimento.	(Novák <i>et al.</i> , 2007)
<i>Escherichia coli</i> 10032	Placa de Petri entre dois ímãs orientados verticalmente. Pólo sul-fixados na parte inferior e o pólo norte, na superior.	Efeitos biológicos	45 mT a 450 mT	14 h	A presença do campo e aumento da temperatura diminuiu formação de colônias causando danos na superfície da célula	(Ji <i>et al.</i> , 2009)
<i>Fusarium culmorum</i>	Placas de Petri	Alteração morfológica e bioquímica	0,03 T	1 semana	Inibição do crescimento, alterações na germinação de esporos e incapacidade de reter reservas celulares	(Albertini <i>et al.</i> , 2003)
<i>Spirulina platensis</i>	Air-lift (3,5 L)	Crescimento celular	Até 0,55T	7 dias	Campo de até 0,4 T estimulou o crescimento, porém 0,25 foi a melhor intensidade	(Li <i>et al.</i> , 2007)
Micro-organismos de águas residuais	Fermentador de 300 mL	Remoção de substratos	8,9 a 46,6 mT	40 h	Entre 8,9 a 17,8 mT aumento na velocidade de remoção de substrato e acima de 17,8 queda na velocidade de remoção	(Yavuz e Celebi, 2000)
<i>S. cerevisiae</i>	Vaso com bobinas Helmholtz	Crescimento celular	0,2 a 0,5 mT	10 h	0,2 mT inibiu o crescimento em 16% e 0,5 mT estimulou o crescimento celular e produção de ATP	(Mehedintu e Berg, 1997)
<i>S. cerevisiae</i>	Fermentador	Expressão genética	20 μ T	24 h	Não afetou a taxa de crescimento	(Binner e Ungvichian, 1997)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

A levedura utilizada neste estudo foi a *Yarrowia lipolytica* (NRRL-Y 1095), obtida da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, Brasil.

4.2. Meio de manutenção da cultura

Para manutenção da *Yarrowia lipolytica*, foi preparado um meio sólido, constituído com os seguintes nutrientes: Ágar (20,0 g); extrato de levedura (3,0 g); extrato de malte (3,0 g); glicose (10,0 g); peptona (5,0 g) e água destilada (até completar 1L). O pH foi ajustado para 6,5 (HCl 6,0 M). Posteriormente, o meio foi vertido em tubos de ensaio e esterilizado a 120°C por 15 minutos (Ladeira *et al.*, 2011). Após a inoculação os tubos foram mantidos a 28°C por 72 horas em incubadora tipo “shaker”, e finalmente estocadas a 4°C até a sua utilização.

4.3. Preparo do inóculo para a fermentação

A levedura mantida em meio sólido foi ativada em meio líquido com os seguintes nutrientes: óleo de oliva (20,0 g); MgSO₄ (0,5 g); K₂HPO₄ (2,0 g); peptona (60,0 g); glicerol (10,0 g) e água destilada (até completar 1L). O pH do meio foi ajustado para 5,5 (HCl 6 M), o meio foi vertido em erlenmeyers de 250 mL e autoclavado a 120°C por 15 minutos. Em seguida, foram transferidos

asépticamente células da levedura e incubadas em “shaker” rotatório (MARCONI) operando a 200 rpm a 28°C durante 24 horas segundo metodologia modificada de Ladeira e colaboradores (2011).

4.4. Planejamento experimental e análise estatística

Para estudar os efeitos do campo eletromagnético no crescimento da *Y. lipolytica* foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais, como apresentado na **Tabela 4**. As variáveis independentes estudadas foram: X_1 - indução eletromagnética, X_2 - configuração do sistema de fermentação e X_3 - posição do sistema gerador de campo.

A posição axial toma como referência 0° de inclinação, a posição transversal 90° de inclinação e posição inclinado 45° de inclinação **Figura 5**.

Os experimentos foram realizados a 28°C durante 24 horas de fermentação. Foram retiradas amostras em tempos predeterminados para avaliar o crescimento celular e o pH. As variáveis de resposta utilizadas foram: atividade lipolítica intracelular (R_1), segundo o método modificado da hidrólise de azeite de oliva, e as velocidades específicas de crescimento celular (μ) para a 1ª e 2ª fases exponenciais, R_2 e R_3 , respectivamente.

Tabela 6. Matriz experimental do planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais.

Variáveis independentes		Níveis		
Variáveis reais	Variáveis codificadas	-1	0	+1
Indução Magnética	X_1	1 A	3 A	6 A
Sistema de Fermentação	X_2	Reciclo em espiral	Vaso do fermentador*	Reciclo em sistema em U
Posição do reator	X_3	Transversal	Inclinado	Axial

*Experimento conduzido sem reciclo da suspensão celular.

A análise estatística dos resultados experimentais e dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de lipase intracelular e crescimento celular foi realizada através do programa computacional Design Expert versão 8,0. Neste contexto, o teste F foi empregado como critério de validação da significância estatística dos modelos obtidos em nível de confiança de 90% ($p < 0,10$).

4.5. Fermentações da *Yarrowia lipolytica* no reator axial-transversal com campo eletromagnético

Visando verificar o efeito biológico no crescimento da levedura quando se aplica o campo eletromagnético, os experimentos foram conduzidos em um fermentador (2L) assistido por campo eletromagnético. Foi preparado 1 litro do meio de cultura como foi descrito no item 4.3, autoclavado e inoculado com 15% do pré-inóculo (10^6 células/mL) de *Y. lipolytica*. As fermentações ocorreram a 28°C e agitadas por aeração (ar sintético).

4.6. Exploração do sistema gerador de campo eletromagnético

Previamente, o sistema de geração de campo eletromagnético foi calibrado para determinar as faixas de indução magnética e os parâmetros de operação que poderiam ser utilizados no sistema. O Biorreator Assistido por campo eletromagnético sistema Axial-Transversal foi conectado a um VARIAC interligado com um amperímetro (**Figura 5**). Com a variação da tensão (mudança de posição do VARIAC), muda-se a corrente do sistema e conseqüentemente a indução magnética. As medições de indução eletromagnética em função da posição dentro da câmara de tratamento magnético foram realizadas usando um gaussímetro digital da Hirst Magnetic (Reino Unido).

4.7. Condução dos experimentos de fermentação

Foi realizada uma sequência de experimentos com aplicação de campo eletromagnético utilizando diferentes intensidades de campo, sistemas de fermentação, com e sem reciclo do meio. Os experimentos controle foram realizados sem aplicação de campos eletromagnéticos nas mesmas condições dos sistemas das fermentações.

Devido ao aquecimento da câmara de tratamento magnético (60°C), houve a necessidade de se adotar como estratégia operacional, um esquema tipo on/off, ou seja, a cultura de levedura ficou sobre o efeito do campo eletromagnético com intervalos de tempo de exposição de 2h ligado/ desligado (on/ off), durante as 24 horas de cultivo, evitando ultrapassar valores de corrente acima de 6A.

4.8. Sistemas de fermentação

As configurações utilizadas nas fermentações da *Y. lipolytica* em biorreator assistido por campo eletromagnético, foram: reciclo em espiral com linhas de campo na direção axial (**Figura 5a**); reciclo em espiral com linhas de campo na direção transversal (**Figura 5b**); reciclo em U com linhas de campo na direção transversal (**Figura 5c**); reciclo em U com linhas de campo na direção axial (**Figura 5d**); fermentador sem reciclo com linhas de campo na direção inclinada (**Figura 5e**).

Nos sistemas com reciclo, uma bomba peristáltica punçionava o meio de cultura até a câmara de tratamento magnético e depois o meio retornava para o vaso do fermentador. A agitação foi realizada com ar sintético, a temperatura controlada com um banho ultra termostático e verificada através de um termômetro infravermelho.

4.9. Determinação do crescimento microbiano e consumo de glicerol

4.9.1. Contagem de células em câmara de Neubauer

A contagem de células do pré-inóculo, foi realizada pelo método de contagem direta utilizando uma câmara de Neubauer espelhada em um microscópio trilocular Nikon Eclipse E200 acoplado com câmera digital (Moticam 1000). O pré-inóculo foi diluído 15 vezes e utilizado um aumento de 100 vezes.

4.9.2. Densidade óptica

O crescimento da levedura foi determinado pela turbidez do meio de cultura, medindo-se a densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU, modelo UV-mini 1240). Quando necessário, a amostra foi diluída com água destilada na proporção 1:9.

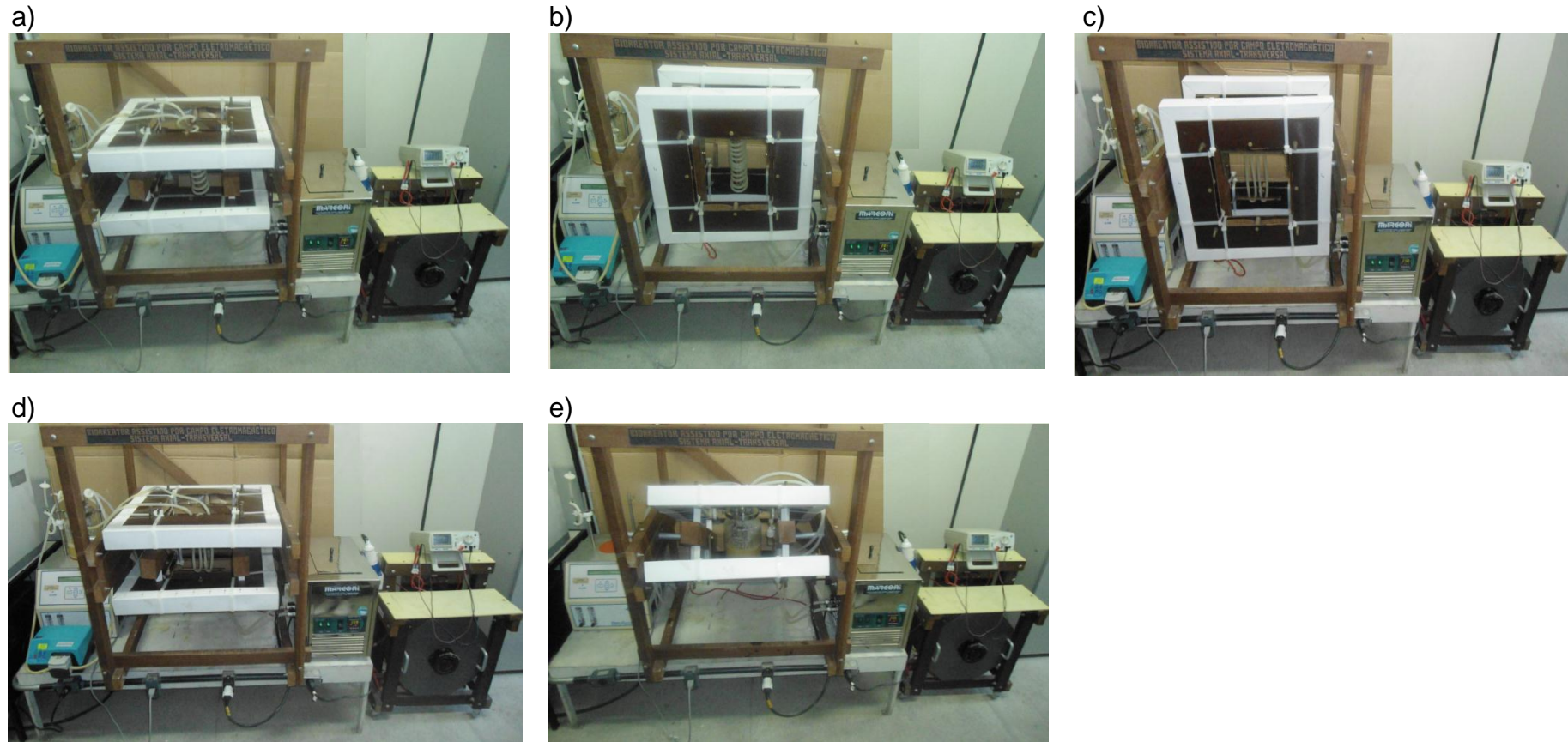


Figura 5. Configurações usadas nas fermentações de *Y. lipolytica* em biorreator assistido por campo eletromagnético: a) reciclo em espiral com linhas de campo na direção axial; b) reciclo em espiral com linhas de campo na direção transversal; c) reciclo em U com linhas de campo na direção transversal; d) reciclo em U com linhas de campo na direção axial; e) fermentador com linhas de campo na direção inclinada.

4.9.3. H do meio

O pH do meio e de cada amostra foi determinado através de um pHmetro de bancada (BEL engineering, Modelo W3B).

4.9.4. Consumo de glicerol

O consumo de glicerol durante a fermentação, foi analisado por cromatografia líquida (HPLC), com detector de índice de refração e utilizando uma coluna Alltech (150mmx4.6 mm, 5_μm particle size; Alltech Associates Inc., Deerfield, IL), com vazão de 0,8 mL.min⁻¹, a 60°C. A fase móvel foi ácido sulfúrico a 0,005 M. A curva de calibração do glicerol foi realizada em diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 e 1,5 g/L).

4.9.5. Separação das células do meio de cultura

Uma vez finalizadas as fermentações, a recuperação das células foi realizada pela filtração sob vácuo, utilizando filtros de papel de diâmetro de poros de 1,5 μm.

4.10. Permeabilização das células da *Y. lipolytica*

Para facilitar a difusão do substrato no interior da célula, a biomassa passou por um pré-tratamento. Inicialmente, nos tubos contendo biomassa foi adicionada água destilada e centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos, em seguida as células foram imersas em acetona por cinco minutos e homogeneizadas em um emulsificador Turratec TE200. A biomassa foi separada da acetona por filtração sob vácuo e seca em estufa a 60°C sob vácuo por 15 minutos (Nakashima *et al.*, 1988).

4.11. Preparação dos suportes para produção dos biocatalisadores a partir de *Yarrowia lipolytica*

4.11.1. Suportes de alginato de cálcio

A preparação de suportes de alginato de cálcio envolve etapas prévias de preparação de duas soluções principais: a) solução de alginato de sódio e b) solução gelificante de CaCl₂. Em béquer de 250 ml, 100 ml de água destilada, e 2,0 g de alginato foram homogeneizados e para a obtenção de suportes com

propriedades magnéticas foram adicionados 0,8 g de magnetita. Enquanto a solução gelificante de CaCl_2 foi preparada em um béquer de 500 mL com 200 mL de água destilada e 2,94 g de CaCl_2 (0,1 M) sob agitação até total dissolução (Teixeira, 2011).

Posteriormente, a solução de alginato de sódio foi gotejada na solução de CaCl_2 0,1 M sob agitação, as partículas esféricas formadas foram mantidas na solução de cloreto de cálcio por 10 minutos antes de sua decantação (**Figura 6**). Após este tempo, as partículas foram peneiradas e os suportes de alginato de cálcio separados e submetidos à secagem em estufa sob vácuo (100°C) até peso constante (Teixeira, 2011).



Figura 6. Esquema geral do sistema usado para preparar os suportes de alginato de cálcio com e sem magnetita e os de quitosana. Símbolos: 1- bico de atomização; 2 - Recipiente contendo a solução cloreto de cálcio 0,1 M; 3- agitador magnético; 4 - bomba peristáltica; 5-solução de alginato de cálcio ou quitosana.

4.11.2. Partículas de quitosana

Os suportes de quitosana foram preparados no mesmo sistema empregado para a preparação de alginato de cálcio (item 4.11.1). Foi utilizada quitosana de alto peso molecular, grau de deacetilação 75,6%. Os suportes foram preparados em forma de esferas, utilizando uma solução de 3% m/v de quitosana com e sem magnetita (0,8%) em uma solução de 1% de ácido

acético. Posteriormente, foram secas em estufa sob vácuo até peso constante (Pan *et al.*, 2009).

4.11.3. Partículas de poliuretano

Os suportes de poliuretano foram preparados a partir de uma espuma expansiva de marca WORKER (Estônia). Foram preparadas partículas de poliuretano com geometria cúbica de aproximadamente 6 mm, com e sem adição de magnetita. As partículas de ferro foram incorporadas e dispersas na espuma antes do processo de polimerização.

4.12. Imobilização das células por diferentes protocolos

4.12.1. Imobilização de células por adsorção física nos suportes de quitosana, alginato de cálcio e poliuretano

Em erlenmeyers de 250 mL foram colocados 10 gramas das respectivas partículas (quitosana, alginato ou poliuretano) com 100 mL de meio de cultura, como descrito no item 4.4, e esterilizados a 120°C por 15 min. Adicionou 10% do inóculo (10^6 células/mL de *Y. lipolytica*), em seguida foram incubados a 28°C durante 24 horas em “shaker” operando a 200 rpm. Os suportes foram separados do caldo de cultura por filtração sob vácuo e lavados com água destilada, em seguida foram imersos em acetona por 5 minutos e secos à temperatura de 60°C em estufa sob vácuo por 15 minutos. Posteriormente, foi determinada a atividade enzimática de cada biocatalisador.

4.12.2. Imobilização por aprisionamento nos suportes de alginato de cálcio.

Após terem sido permeabilizadas, as células de *Y. lipolytica* foram misturadas a uma solução de alginato de sódio a 2% (m/v) com e sem magnetita (0,8% m/v), utilizando 10 g de células para 100 mL de solução de alginato. Os biocatalisadores foram preparados de acordo com o procedimento descrito no item 4.8.1. Em seguida, os biocatalisadores foram lavados com água destilada e secos em estufa sob vácuo a 60°C durante 6 horas e após a secagem, determinou a atividade enzimática.

4.13. Determinação da atividade enzimática

A análise de atividade enzimática nas células livres e imobilizadas foi determinada pelo método de hidrólise de azeite de oliva de acordo com a metodologia adaptada de Soares *et al.* (1999).

Em erlenmeyers de 250 mL foram colocados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva e água destilada (3:7), 2,5% de goma arábica e 2 mL de tampão fosfato (pH 7,0). A mistura reacional foi mantida sob agitação (200 rpm) por 10 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 0,25 gramas de células livres ou imobilizadas ou 1 mL de sobrenadante, em cada erlenmeyer e mantidos na mesma condição anterior. Após o período de incubação (30 min), a reação foi paralisada pela adição de 20 mL de etanol. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,1 M utilizando um agitador magnético e fenolftaleína como indicador. O cálculo de atividade lipolítica foi realizado de acordo com a **Equação 1**, onde, uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera 1mmol de ácido graxo por minuto de reação nas condições de ensaio. Em paralelo, foi realizado um controle sem adição de amostra. As atividades foram expressas em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

$$A = \frac{(V_a - V_b) \times M}{t \times m} \quad (1)$$

Onde: V_a é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL); V_b é o volume de NaOH gasto na titulação do controle (mL); M é a concentração molar da solução de NaOH (mol/ L); t é o tempo de reação (min); m é a massa de biomassa livre ou imobilizada em gramas ou volume em mL do sobrenadante.

4.13.1. Cálculo do rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização (Γ) foi calculado com base na atividade enzimática oferecida e a atividade enzimática residual presente no meio após o processo de imobilização das células nos suportes preparados previamente, como mostra a **Equação 2**.

$$n(\%) = \frac{U_o - U_f}{U_o} \times 100 \quad (2)$$

Onde: U_o é a atividade oferecida no início da imobilização ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$) e U_f é a atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização (Soares et al., 2002).

4.14. Reação de biodiesel

As reações de transesterificação catalisadas pela biomassa celular livre e imobilizada em suporte de quitosana, alginato e poliuretano, respectivamente foram realizadas em balão de 100 mL contendo óleo de soja refinado e etanol anidro em diferentes condições de reação como apresentado na **Tabela 7**.

Tabela 7. Condições das reações conduzidas em “shaker” orbital a 200rpm durante 72 horas de reação

Temperatura (°C)	Condições	Balão1	Balão 2	Balão 3
30	Razão molar	1:6	1:12	1:16
	Biocatalisador (%)	20	35	50
	Tampão fosfato (%)	1	3	4
35	Razão molar	1:6	1:12	1:16
	Biocatalisador (%)	20	35	50
	Tampão fosfato (%)	1	3	4
40	Razão molar	1:6	1:12	1:16
	Biocatalisador (%)	20	35	50
	Tampão fosfato (%)	1	3	4

Após 72 horas de reação, a mistura reacional foi filtrada sob vácuo para recuperar o biocatalisador e transferido o filtrado para um funil de decantação visando à separação do biodiesel da glicerina formada. Após a decantação, foi evaporado o etanol da parte superior com rota-evaporador a 100°C para posterior análise de conversão do óleo de soja pelo método de cromatografia gasosa.

4.15. Análise cromatográfica

Para a determinação da formação de ésteres de ácidos graxos pelos biocatalisadores, utilizou um cromatógrafo a gás, modelo GERAÇÃO 8000 (Intecrom, São Paulo) equipado com detector de ionização de chama e coluna DB1 de 30m x 0,25 mm ID x 0,25 µm (J & W Scientific). As temperaturas do detector e injetor foram ajustadas para 250 e 245°C, respectivamente. Enquanto que para separação dos componentes das amostras foi programada uma rampa de temperatura: 90°C durante 3 min, 12,3°C/min até 275°C durante 15 minutos, 0,4°C/min até 180°C durante 2 minutos, 2,5°C/min até 300°C durante 5 minutos e finalmente 300°C por 2 minutos. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste. Inicialmente, realizou uma curva de calibração com padrões referentes à composição em ésteres de ácidos graxos presentes no óleo de soja, para posterior identificação dos tempos de retenção, dos produtos formados durante a reação de biodiesel comparativamente.

4.16. Análise de proteína e energia bruta

As análises de proteína foram realizadas através do determinador de Nitrogênio/Proteínas FP-528 e a energia bruta foi quantificada através de uma bomba calorimétrica. As análises foram realizadas no Laboratório do Setor de Avicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal. Todas as análises foram realizadas com base na matéria seca, determinada de acordo com Horwits (1997).

4.17. Simulações e avaliação técnico-econômica e ambiental

As simulações realizadas foram comparadas com o processo convencional de produção de biodiesel através de simulações computacionais do processo em estudo visando discriminar aquele que resulta em melhores benefícios econômicos e em menores impactos ambientais usando WAR (Algoritmo de redução de resíduos - waste reduction algorithm, EPA-USA) (Young *et al.*, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultura da *Y. lipolytica* usando glicerina como fonte de carbono: avaliações preliminares

5.1.1. Morfologia

Embora este trabalho não tivesse inicialmente como foco estudar a morfologia do micro-organismo empregado nas fermentações, foram realizados experimentos preliminares para avaliar o desempenho da *Y. lipolytica*, em termos de sua capacidade de crescimento celular e produção de metabolitos (lípase intra e extracelular), em meio de cultura contendo glicerol como fonte de carbono. Durante as culturas a levedura apresentou características evidentes de dimorfismo celular (**Figura 7**), tanto em frascos erlenmeyers em “shaker” como em fermentador tipo tanque agitado. Dimorfismo, é uma forma de crescimento celular conhecida, é a capacidade de certas leveduras de alternar, reversivelmente, entre formas morfológicas distintas, isto é, células ovoides e hifas ou pseudo-hifas, porém considerado como um fenômeno complexo que envolve modificações extensivas da célula em resposta a diferentes perturbações do ambiente (Morin et al., 2007). Tem sido estudado em função dos fatores que o favorecem ou inibem esse comportamento (Kaur et al., 1988; Guevara-Olvera et al., 1993; Barth e Gaillardin, 1997; Dominguez et al., 2000; Cervantes-Chávez e Ruiz-Herrera, 2007; Morin et al., 2007). Estudos afirmam que a *Y. lipolytica* apresenta dimorfismo naturalmente, formando células de

leveduras, pseudo-hifas e mesmo hifas septadas em virtude das condições de estresse durante a fase de crescimento, tais como, aeração, pH, fonte de carbono e nitrogênio (Barth e Gaillardin, 1997).

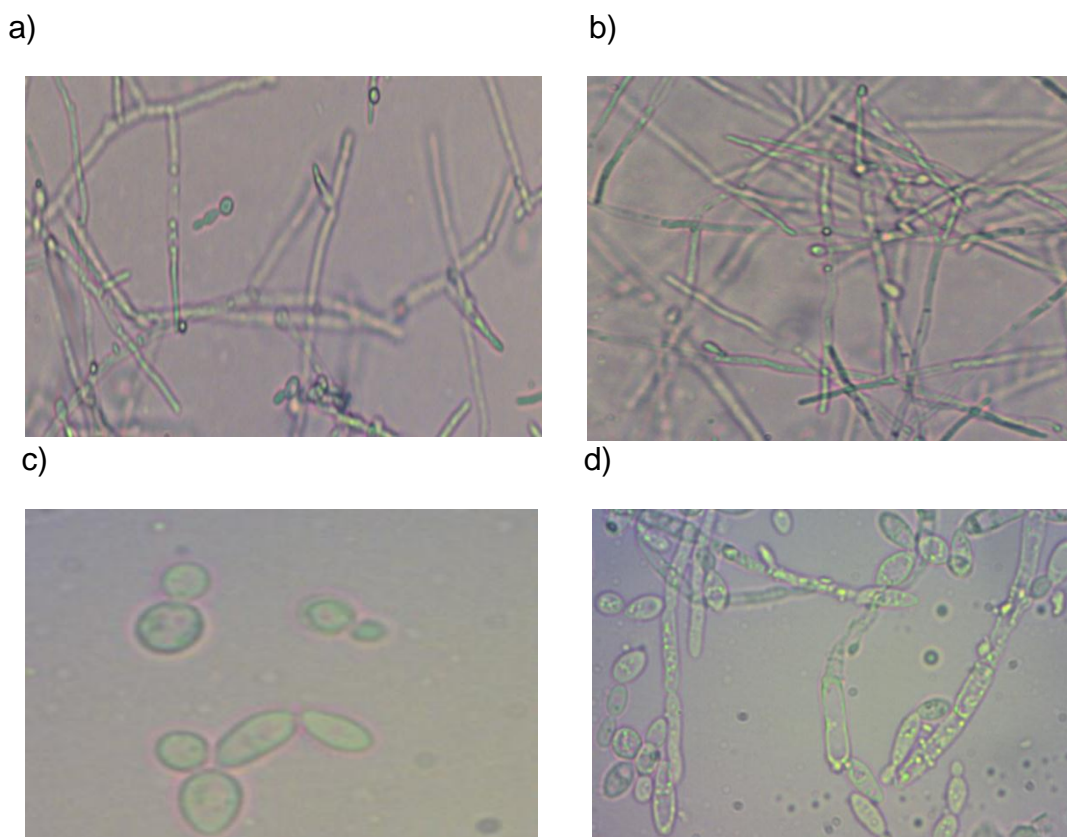


Figura 7. Crescimento da *Y. lipolytica* monitorado por microscopia ótica em microscópio Nikom E200 com câmera digital MOTIC 1300 acoplada (aumento de 100×). Culturas em “shaker” modelo Marconi MA832: a) crescimento na forma leveduriforme e hifal ao cabo de 4 h; b) crescimento praticamente na forma de pseudo-hifas ao cabo de 12 h. Culturas em fermentador tipo tanque agitado modelo OMMI-Culture plus usando uma vazão de ar de 2 L/min: c) crescimento na forma leveduriforme ao cabo de 4 h; d) crescimento na forma leveduriforme e de pseudo-hifas ao cabo de 12 h.

Particularmente nos experimentos realizados neste trabalho observaram diferenças importantes em relação ao crescimento dimórfico da levedura crescida em “shaker” e em fermentador. Ao cabo de 4 h em “shaker”, já era evidente a mistura de células na forma leveduriforme com a formação de pseudo-hifas (**Figura 7a**), a qual se acentuava às 12 h de crescimento (**Figura 7b**). Enquanto que, no fermentador às 4 h observaram-se apenas células na

forma leveduriforme (**Figura 7c**), sendo que, ao cabo de 12 h é que aparece a mistura entre células na forma leveduriforme com a formação de pseudo-hifas (**Figura 7d**). Em ambos os casos este comportamento se manteve até o final da fermentação.

Uma provável explicação para este comportamento é o estresse pela limitação de oxigênio quando crescida em “shaker” orbital, uma vez que, a *Y. lipolytica* é um micro-organismo estritamente aeróbio. Segundo Coelho *et al.* (2010), o crescimento e a secreção de metabolitos pela *Y. lipolytica* são afetados por diferentes fatores ambientais e conseqüentemente a quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura deve ser visto como um parâmetro importante. Isto se corrobora pelos resultados reportados por Kamzolova *et al.* (2003), que ao estudar o efeito da concentração de oxigênio dissolvido no crescimento de *Y. lipolytica*, verificaram um aumento 2,5 vezes na concentração celular (biomassa) com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Resultados similares foram descritos por Corzo e Revah (1999), quando estudaram a produção de lipase extracelular de uma linhagem de *Y. lipolytica* identificada como 681, alcançando maiores percentuais de células simples. Quando foram empregados altos níveis de aeração, observaram incrementos na concentração de pseudo-hifas quando usaram frascos erlenmeyers em “shaker” com baixos níveis de aeração.

5.1.2. Cinética de crescimento microbiano e produção de metabolito

A **Figura 8**, apresenta a curva típica de crescimento da *Y. lipolytica*, com a variação de pH do meio de cultura e a produção lípase intracelular em função do tempo de fermentação. Particularmente, a produção de metabolito de interesse, ou seja, lípase intracelular foi medida indiretamente através da determinação de atividade enzimática das células livres (biomassa) pelo método da hidrólise de azeite de oliva, conforme descrito nos materiais e métodos.

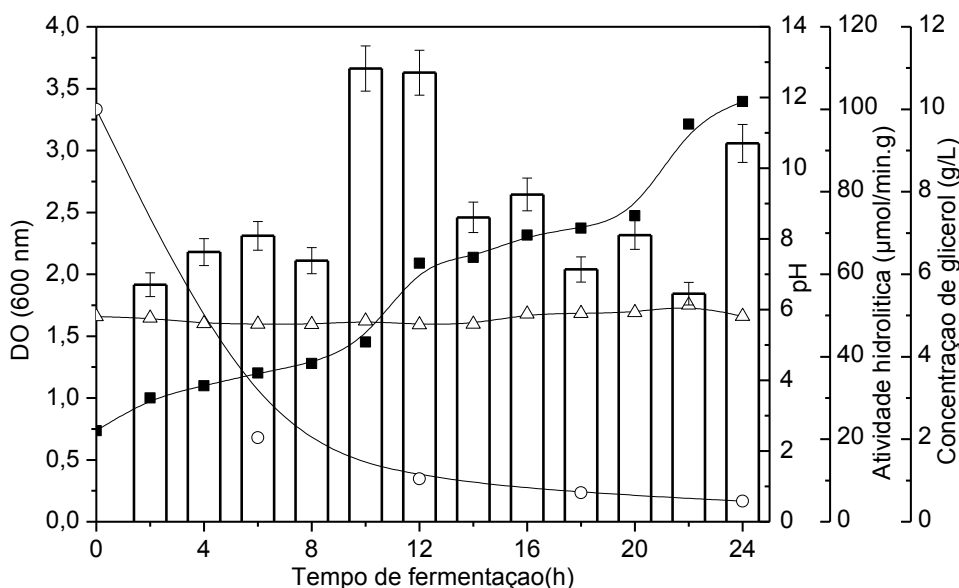


Figura 8. Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* em fermentação submersa realizada em “shaker” à temperatura de 28°C e 200 rpm. Símbolos: ■ DO, Δ pH, □ atividade enzimática da biomassa livre e impermeabilizada com acetona, ○ concentração de glicerol.

Conforme pode ser verificado na **Figura 8**, a levedura apresentou um crescimento característico de um comportamento diáuxico, que segundo Bailey e Ollis (1986) é um fenômeno que revela a presença de múltiplas fases de crescimento “lag” (fase de adaptação) quando o meio de cultura contém múltiplas fontes de carbono. Neste caso, especificamente, tem no meio de cultura duas fontes de carbono, a glicerina que é a fonte de carbono principal e o azeite de oliva, que é usado como indutor para a produção de lipase intracelular. Entretanto, estudos de crescimento celular em misturas de diferentes tipos de substratos têm mostrado que os micro-organismos consomem preferencialmente aquele substrato que providencia um crescimento mais rápido, sendo que as bases moleculares que permitem explicar este tipo de comportamento cinético são a indução, repressão, inibição e processos de ativação (Bailey e Ollis, 1986). Estes são mecanismos de controle intrínsecos da célula, por exemplo, a indução e a repressão são dispositivos de controle celular que produzem mudanças nas taxas de síntese de proteínas e conseqüentemente, na quantidade de enzima presente, atuando

em nível de genes. Enquanto que, a ativação e a inibição afetam a atividade catalítica de uma enzima já presente na célula, mas não alteram a quantidade presente. Desta forma, no primeiro caso os mecanismos atuam em nível de genes e no segundo em nível enzimático.

Em relação à produção de metabolito de interesse, evidentemente esta levedura mostrou ter a capacidade de metabolizar glicerina e de produzir lipase intracelular (**Figura 8**). A concentração em termos de atividade enzimática aumentou gradativamente ao longo da fermentação, alcançando valor máximo em torno de 12 h. A partir desse instante e acompanhando a transição de fases, a atividade de lipase intracelular apresentou uma leve queda sugerindo um aumento no nível de excreção de lipase (produção de lipase extracelular). Contudo, de acordo com Corzo e Revah (1999), o glicerol é um produto que pode reprimir a indução de lipase intracelular, talvez explicando o porquê a maior quantidade de lipase intracelular, quando esse substrato se esgota no meio de cultura. Por outro lado, segundo Pereira-Meirelles *et al.* (2000), as lipases produzidas por leveduras permanecem dentro da célula, ligadas à parede celular, e somente são secretadas ao meio de cultura quando uma fonte de carbono fica escassa, por exemplo, em uma transição diaúxica, quando mais de uma fonte de carbono é usada, ou mesmo na fase estacionária.

De acordo com o comportamento da curva de consumo de glicerol na fermentação (**Figura 8**), é possível verificar que nas primeiras horas de fermentação a primeira fonte de carbono a ser consumida é o glicerol, para depois a levedura passar a consumir o azeite de oliva, que é o indutor para a produção de lipase intracelular, fenômeno que ocorre até o período final da fermentação. Coincidentemente, no ponto em que se esgota o glicerol, é onde se observa um maior índice de atividade enzimática, sugerindo que ao ser esgotada a primeira fonte de carbono (glicerina), o micro-organismo requer de lipase para degradar o segundo substrato, iniciando assim, o consumo da segunda fonte de carbono.

Entretanto, é desconhecido se a levedura está consumindo azeite de oliva simultaneamente com o glicerol, uma vez que os níveis de atividade lipase intracelular vão aumentando gradativamente durante toda a

fermentação. Contudo, essa taxa de consumo de óleo é menor comparativamente com a de consumo de glicerol, supostamente devido à presença da glicerol quinase, enzima chave no metabolismo da glicerina.

Neste caso, como explicar à cinética se esta se apresenta como um comportamento tipicamente diaúxico, sendo que o glicerol não reprime catabolicamente o consumo de azeite de oliva?. Um caso atípico de repressão catabólica foi reportado com *Y. lipolytica* em uma mistura de diferentes substratos, incluindo de glicerol e ácido oleico, entre outros, evidenciando-se que, o consumo de ambos substratos começou a concorrer desde as primeiras horas de cultivo, sendo o glicerol consumido mais rapidamente. Os autores atribuíram esse comportamento à facilidade de utilização do glicerol ser um substrato mais facilmente utilizável que ácido oleico e provavelmente com outros ácidos graxos, mas, que nesse caso não exerceu repressão catabólica no metabolismo destes ácidos (Morgunov e Kamzolova, 2011).

De qualquer maneira, de acordo com Fickers *et al.* (2005), a *Y. lipolytica* é a única levedura, estritamente aeróbica, que tem a capacidade de degradar eficientemente substratos hidrofóbicos, tais como, n-alcanos, ácidos graxos e óleos e gorduras para os quais têm rotas metabólicas específicas. Além disso, é capaz de produzir diversas lipases extracelulares e em diferentes subníveis intracelulares, isto é, ligadas à parede celular e à membrana citoplasmática, sendo que, sua produção depende, entre outros fatores da composição e das condições do meio de cultura.

Deve-se salientar que foi necessário desenvolver estratégias de pré-tratamento da biomassa para obter melhorias na atividade enzimática, uma vez que a biomassa aglomerava-se na superfície do caldo de fermentação. Estas estratégias foram: 1- redução de tamanho e 2- impermeabilização das células com acetona. Neste contexto, a **Figura 9** apresenta a título ilustrativo, o aspecto da biomassa ao cabo de 16 horas de fermentação em “shaker” e após a separação da cultura por filtração (**Figura 9 a**). Posteriormente, foi submetida a uma redução de tamanho por picagem do aglomerado inicial (**Figura 9b**), e outra etapa de redução de tamanho usando um triturador modelo Turratec 102 (Tecnol., Brasil), tratada com acetona por imersão (**Figura 9c**) e finalmente seca (**Figura 9d**) para evaporação do solvente.

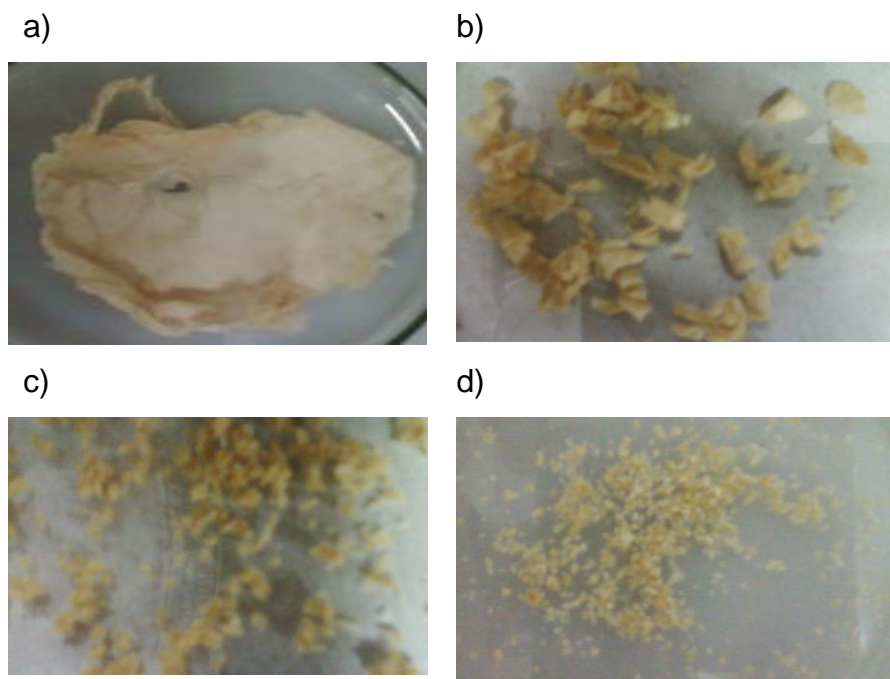


Figura 9. Células de *Y. lipolytica* permeabilizadas com acetona e com posterior fragmentação: **a)** biomassa após a filtragem; **b)** biomassa cortada com espátulas; **c)** biomassa após a trituração em triturador (Turrtec TE-102); **d)** biomassa após a secagem à temperatura de 60°C por 15 min.

Os resultados de atividade hidrolítica para cada caso se apresentam na **Tabela 8**, corroborando que, tanto a redução de tamanho como a imersão em acetona favoreceram a atividade enzimática. Certamente isto pode ser explicado pelo aumento da permeabilização da parede celular da levedura, associado com um aumento da área superficial do biocatalizador, isto é, um aglomerado com menor tamanho de biomassa.

Os resultados observados na **Tabela 8**, corroboram reportes de Nakashima *et al.* (1988), que usaram acetona durante a preparação de biocatalisadores tipo “whole cells” e observaram alterações na produção de lipase intracelular e na reação de interesterificação de óleos e gorduras. E mais recentemente Liu, *et al.* (2000) mostraram que a permeabilização de leveduras produtoras de lipase intracelular, com álcool isopropílico incrementou a eficiência biocatalítica de células íntegras (“whole-cell”).

Tabela 8. Efeito da redução de tamanho e impermeabilização da biomassa de *Y. lipolytica* na atividade hidrolítica em azeite de oliva à temperatura de 37°C e 200 rpm a pH 7.

Tipo de biomassa[†]	Tipo de tratamento	Atividade enzimática (μmol/min g)
a	In natura filtrada	13,64
b	In natura picada	26,28
c	Triturada e permeabilizada	-
d	Triturada, permeabilizada e seca	57,29‡

[†]Referente aos tipos de biomassa da **Figura 9** [‡]Valor de atividade correspondente a 16 h de fermentação em “shaker” referente à **Figura 7**

5.1.3. Imobilização visando produção de biocatalisadores (“whole cells”)

Após os estudos com células de *Y. lipolytica* livres, foram realizados testes de imobilização avaliando o potencial da produção de biocatalisadores tipo “whole cells”. Neste contexto, foram preparados diferentes suportes e avaliada a imobilização por aprisionamento e adsorção física. Os aspectos morfológicos e os resultados do comportamento cinético estão apresentados nas **Figuras 10 e 11** e nas **Tabelas 9 e 10**, respectivamente. Como se sabe o trabalho com células íntegras de micro-organismos já resulta em valores relativamente baixos de atividade e de fato na tentativa de imobilização há perda notável de atividade a despeito do ganho em estabilidade que se espera quando da imobilização das células. Entretanto, embora não tenha sido realizado um estudo cinético completo dos derivados imobilizados preparados, comparativamente pode-se observar de acordo com os resultados que os sistemas obtidos por aprisionamento apresentaram uma melhor eficiência de imobilização, exceto quando se usou poliuretano como suporte para a imobilização da levedura por adsorção.

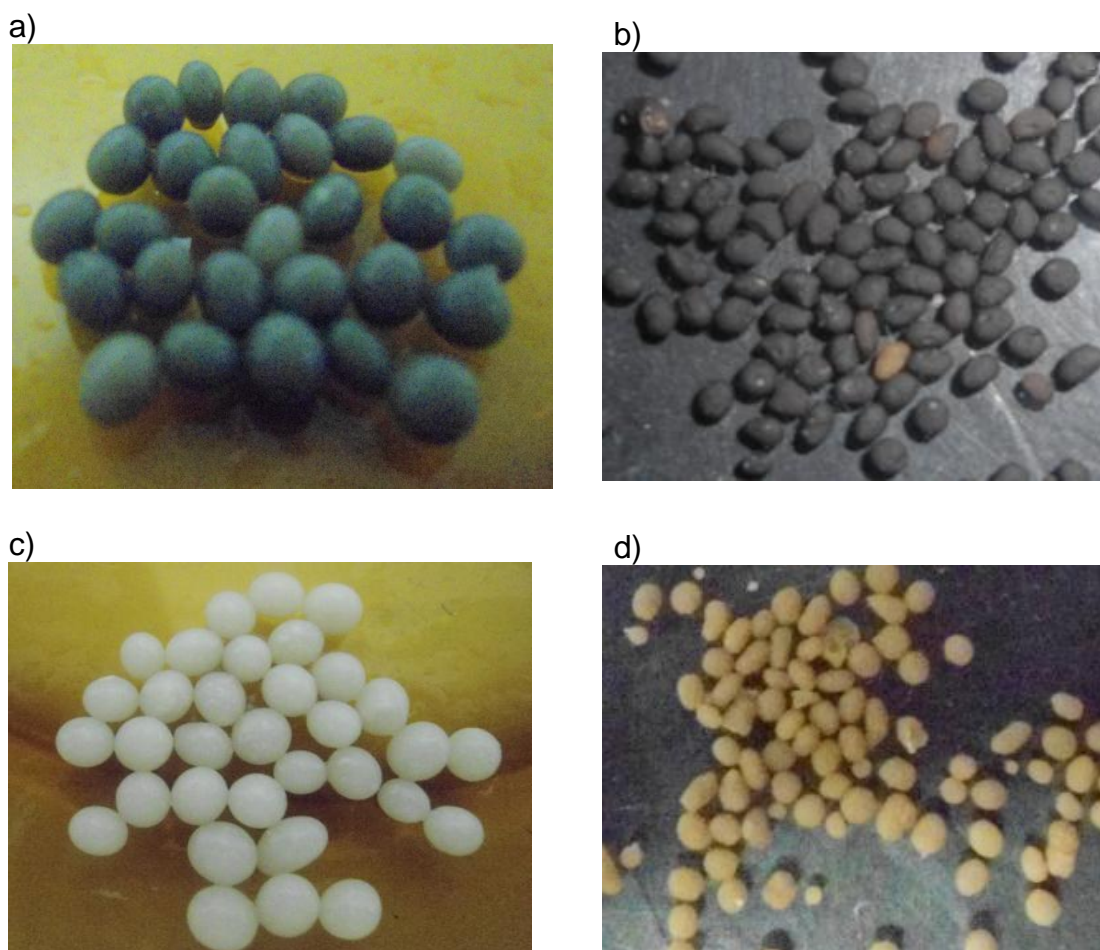


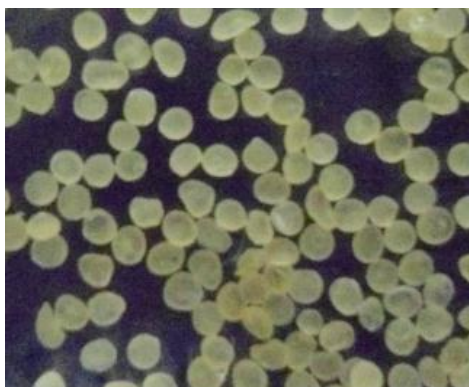
Figura 10. Fotografias dos biocatalisadores preparados pelo método de aprisionamento de células da *Y. lipolytica* imobilizadas em alginato de cálcio (Ca) úmidos e secos à temperatura de 60°C sob vácuo em estufa, respectivamente. Sistema enzimático formado por partículas de alginato Ca + magnetita + células: a) biocatalisador úmido; b) biocatalisador seco. Sistema enzimático formado por partículas de alginato Ca + células: c) biocatalisador úmido; d) biocatalisador seco.

Tabela 9. Atividade enzimática de biocatalisador de *Y. lipolytica* preparado pelo método de aprisionamento.

Biocatalisador	Atividade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$)	η (%)*
Alginato + biomassa	17,30	27,03
Alginato + biomassa + magnetita	16,92	26,43

* Atividade oferecida para a imobilização foi de 64,0 $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ (obtida da biomassa com reciclo em U).

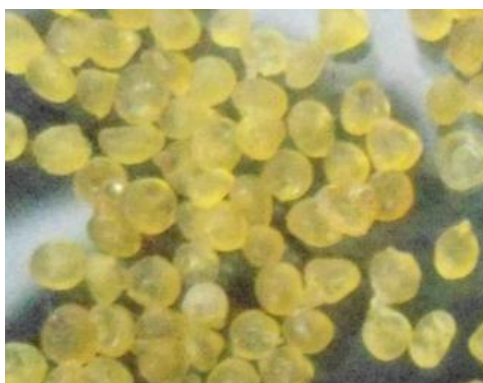
Alginato de cálcio



Alginato de calcio +magnetita



Quitosana



Quitosana +magnetita



Poliuretano



Poliuretano +magnetita



Figura 11. Fotografias dos biocatalisadores preparados pelo método de adsorção física de células da *Y. lipolytica* immobilizadas em diferentes suportes secos à temperatura de 60°C sob vácuo em estufa.

Tabela 10. Atividade enzimática das partículas imobilizadas com *Y. lipolytica* pelo método de adsorção.

Tipo de suporte + células	Atividade enzimática* ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$)	η (%)
Alginato Ca +biomassa	1,58	1,73
Alginato Ca + magnetita +biomassa	1,10	1,2
Quitosana+biomassa	1,50	1,09
Quitosana + magnetita +biomassa	1,9	2,08
Poliuretano +biomassa	60,70	35,9
Poliuretano + magnética +biomassa	24,90	20,0

*Atividade obtida com base na massa de biocatalisador total.

A ideia de se avaliar biocatalisadores com a presença de magnetita, surge da necessidade do grupo de pesquisa “Biomagnetismo aplicado à Engenharia de Processos” da UENF em avaliar sua aplicação futura em biorreatores assistidos por campo eletromagnético na produção, de bicompostíveis (etanol e biodiesel). Estudos prévios (Teixeira, 2011), já tinham revelado o potencial e as dificuldades de preparar biopolímeros com propriedades magnéticas, e neste caso em particular, os resultados indicam que a inclusão de magnetita no suporte não afetou a atividade enzimática dos biocatalisadores, pois as atividades comparativamente na presença ou não da mesma resultaram em valores muito próximos.

Tudo parece indicar que *Yarrowia* sp. é um bom micro-organismo para ser usado como “whole cells”, em sistemas de fermentação, para a produção de lipase intracelular. Assim, por exemplo, Adamczak, e Bednarski (2004) mostraram que *Y. lipolytica* tratada com acetona e imobilizada em poliuretano tinha a capacidade de hidrolisar gordura residual, de forma similar Wu *et al.* (2009) mostraram que *Y. lipolytica* livre e imobilizada em alginato de cálcio também apresentou bons resultados na degradação de resíduos lipídicos, sugerindo evidentemente sua capacidade de produzir lipase intracelular. Neste contexto, também verificou-se o benefício de permeabilizar as células com solvente encontrando melhorias na atividade celular (**Tabela 11**). Entretanto,

como este trabalho não prevê a otimização da preparação destes derivados enzimáticos, estudos futuros deverão ter como propósito estudar o desenvolvimento e otimização da preparação.

Tabela 11. Efeito do tratamento com acetona das células de *Y. lipolytica* visando à permeabilização da parede celular.

Biomassa	Atividade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$)
Biocatalisador in natura (úmido)	13,64
Biocatalisador in-natura e seco	38,69
Biocatalisador tratado com acetona e seco	54,00

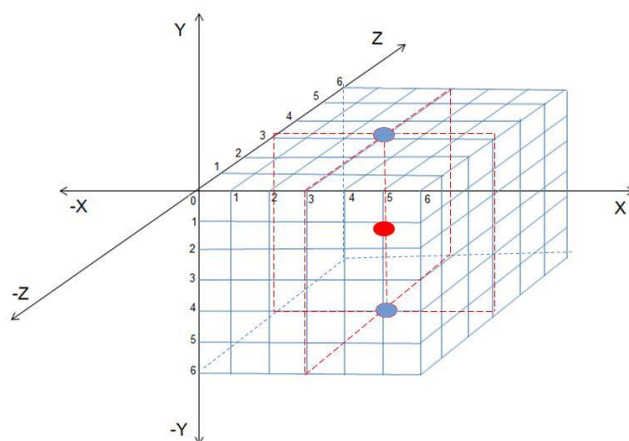
5.2. Cultura da *Y. lipolytica* usando glicerina como fonte de carbono em biorreator assistido por campo eletromagnético

Este tópico apresenta os resultados das avaliações de alternativas tecnológicas procurando melhorias na etapa de fermentação. Optou-se por estudar o desempenho da *Y. lipolytica* sob o efeito de campos eletromagnéticos de baixa frequência, com base em reportes bibliográficos que relatam efeitos benéficos de campos eletromagnéticos em processos fermentativos (Hristov e Perez, 2011; Hristov, 2010).

O sistema de fermentação, acoplado a um gerador de campo magnético, faz parte de um conjunto de protótipos desenhados e construídos no Setor de Engenharia de Processos do LTA/ CCTA/ UENF, a partir de estudos prévios de configuração de fermentadores acoplados a geradores de campos eletromagnéticos (Justo *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2007; Justo *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2006). Trata-se de um sistema versátil que permite estudar o efeito de campo eletromagnético sob diferentes configurações de indução eletromagnética e direção das linhas de campo, isto é, variando as linhas de campo desde a direção axial, inclinadas até transversal. Inicialmente, foi necessário conduzir experimentos preliminares para a determinação das faixas de operação, em termos da distribuição de indução eletromagnética e do sistema de geração de campo magnético integrado ao sistema de fermentação.

Neste contexto, os resultados da distribuição de campo eletromagnético no interior das bobinas são apresentados nas **Tabelas A-I a A-XV** do **anexo A**. A **Figura 12a** apresenta um esquema da configuração espacial predefinida para explorar o sistema de geração de campo eletromagnético, enquanto que a **Figura 12b** mostra, a título ilustrativo, o perfil dessa distribuição de campo eletromagnético para o centro geométrico entre bobinas, que corresponde à posição de localização do biorreator.

a)



b)

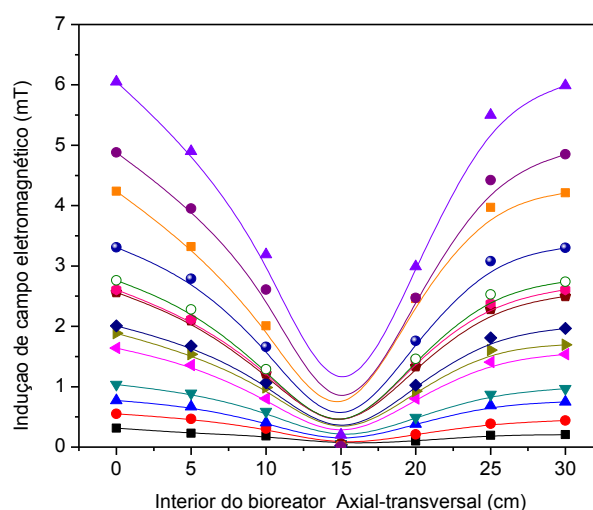


Figura 12. Perfis de indução eletromagnética do sistema gerador de campo magnético axial-transversal: a) Esquema da disposição espacial definido para a medição de distribuição de indução de campo eletromagnético (B) no interior das bobinas; b) Distribuição de indução de campo eletromagnético no centro do sistema gerador de campo na direção axial utilizando diferentes intensidades de corrente (A). Símbolos: ■ 0,400; ● 0,802; ▲ 1,235; ▼ 1,600; ◀ 2,640; ▶ 3,020; ◆ 3,350; ⬢ 4,165; ◈ 4,345; ○ 4,525; ● 4,715; ◻ 7,270; ● 8,0; ▲ 10,0.

Uma análise sobre o comportamento desta distribuição indica que no centro há uma evidente diminuição da força do campo, em virtude da distância entre as duas bobinas e o diâmetro interno delas. Entretanto, este sistema permite a colocação do vaso de fermentação em seu interior para o tratamento integral da suspensão celular.

Inicialmente foi necessário realizar experimentos controle usando diferentes configurações dos biorreatores e estratégias de operação, a fim de estabelecer parâmetros comparativos com as culturas sob o efeito do campo eletromagnético, conforme ilustrado na Figura 13.



Figura 13. Estratégia de cultura de *Y. lipolytica* em diferentes configurações de sistemas sob o efeito ou não do campo magnético.

Os resultados apresentados na Figura 14 e na Tabela 12, revelam comparativamente diferenças importantes na cinética de crescimento da levedura (produção de biomassa), e na produção de lípase intracelular, entre a cultura realizada em “shaker”, e fermentador com e sem reciclo. Como pode ser observado, o uso de um sistema de reciclo resultou em rendimentos

menores quando comparado com a fermentação sem reciclo. Resultados similares já têm sido reportados em estudos prévios por Perez et al. (2006), quando estudaram um sistema com reciclo para a produção de nisina por fermentação submersa sob o efeito de campos magnéticos. Apontando para necessidade de se adotar como controle, experimentos conduzidos nas mesmas condições de reciclo que quando submetido ao campo. Por este motivo todos os experimentos, conduzidos sob efeito de campo eletromagnético em cada configuração do biorreator, são comparados com seu respectivo controle.

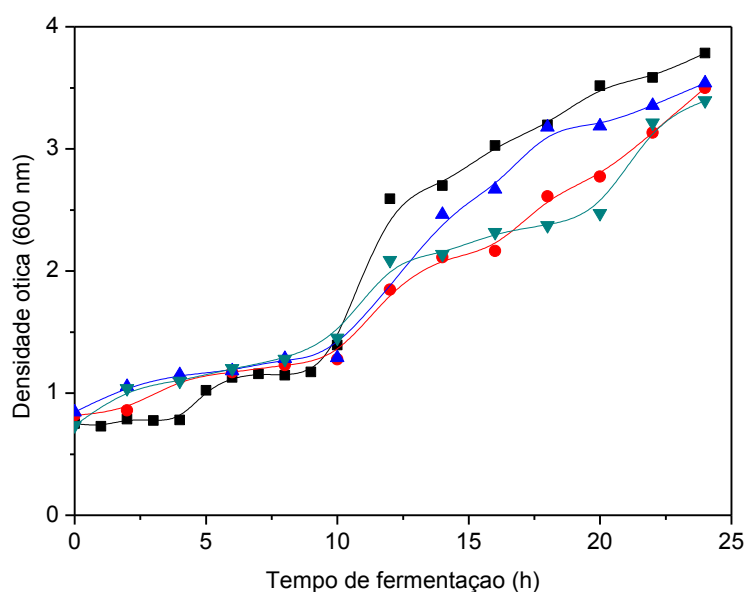


Figura 14. Resultados da cinética de crescimento para experimentos de crescimento de *Y. lipolytica* medido em termos de densidade ótica, sem campo magnético (experimentos controle. Símbolos: ■ cultura em vaso de fermentação sem reciclo; ▲ cultura em vaso de fermentação com reciclo da suspensão celular através de sistema em espiral; ● cultura em vaso de fermentação com reciclo da suspensão celular através de sistema em U; ▼ cultura em "shaker".

Tabela 12. Resultados de atividade de lipase intracelular expressa em $\mu\text{mol}/\text{min g}$, referente a cada experimento controle ao cabo de 24h de fermentação.

	Tipo de sistema usado no experimento controle do crescimento de <i>Y. lipolytica</i>			
	Vaso de fermentação sem reciclo	Vaso de fermentação com reciclo espiral	Vaso de fermentação com reciclo U	Cultura em "shaker"
Atividade enzimática	76,00	43,06	52,14	91,74

5.2.1. Planejamento experimental: sob campo eletromagnético

Na **Tabela 13** são apresentados os resultados da matriz experimental das atividades enzimáticas de lipase intracelular, e das velocidades específicas de crescimento (μ) de ambas as fases exponenciais em que foi observado o crescimento diaúxico. Enquanto que, na **Figura 15** são ilustrados os resultados da cinética de crescimento microbiano, correspondentes a cada estratégia de configuração definida no planejamento experimental.

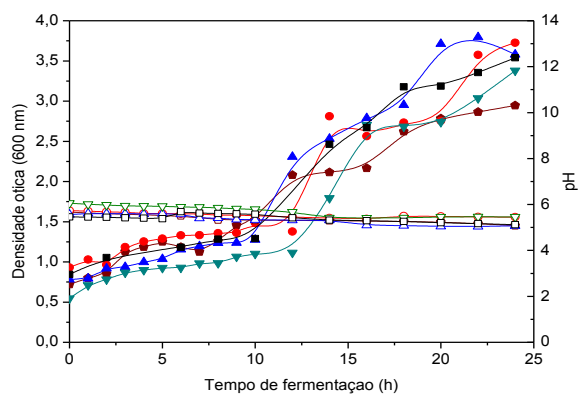
Como pode ser observado na **Tabela 13**, os valores de atividade enzimática de lipase intracelular, expressos em μmol de ácidos graxos formados por massa de biomassa por minuto, variaram entre 29 e 67 U/g aproximadamente. Neste caso, o melhor resultado (ensaio 4), foi alcançado para os níveis mais elevados de campo eletromagnético (6 A), quando a fermentação foi conduzida com reciclo usando sistema em U e sob o efeito de campos eletromagnéticos com linhas transversais. Já no caso, dos resultados obtidos para o crescimento celular, avaliado em função das velocidades específicas de crescimento, verificou-se que os valores mais elevados corresponderam ao ensaio 7 e 4, para a 1ª e 2ª fases exponenciais de crescimentos, respectivamente, conforme o crescimento diaúxico (**Figura 15**).

Tabela 13. Resultados do planejamento central composto 2^3 com pontos estrela, para a produção de protease e crescimento microbiano de *Y. lipolytica* à temperatura de 28°C durante 24 h.

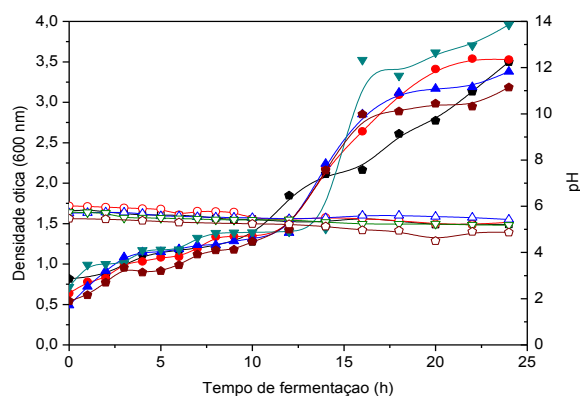
Nº	Variáveis codificadas			Atividade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$)	Velocidades específicas de crescimento - μ (h^{-1})	
	X_1	X_2	X_3		1ª fase exp.	2ª fase exp.
1	-1	-1	-1	29,41	0,142	0,125
2	1	-1	-1	38,66	0,123	0,101
3	-1	1	-1	43,90	0,080	0,128
4	1	1	-1	66,80	0,086	0,143
5	-1	-1	1	55,19	0,078	0,899
6	1	-1	1	59,70	0,150	0,052
7	-1	1	1	54,38	0,210	0,090
8	1	1	1	53,00	0,101	0,078
9	0	0	0	58,30	0,072	0,066
10	0	0	0	51,45	0,055	0,052
11	0	0	0	49,53	0,164	0,074
12	0	0	0	54,40	0,073	0,089

Para analisar a significância dos efeitos das variáveis independentes estudadas, inicialmente foram feitas análises estatísticas visando verificar alterações, em ambas variáveis resposta: produção de lipase intracelular, e no crescimento celular. Assim sendo, os resultados ilustrados no gráfico de Pareto (**Figura 16**) revelaram que as condições que favoreceram o crescimento celular foram diferentes daquelas que estimularam a produção da lipase intracelular, sugerindo que o processo em estudo não acontece através de fenômenos bioquimicamente simples. Particularmente, para a produção de lipase intracelular, verificou-se uma influência positiva e estaticamente significativa das três variáveis independentes estudadas, sendo a de maior peso, aquela que representa a direção das linhas de campo eletromagnético sobre os sistemas tratados eletromagneticamente (variável X_3). Enquanto que, as interações entre elas foram negativas para o intervalo de confiança estudado (90%), porém estatisticamente significativas, exceto para o caso da interação entre a força do campo e o emprego de sistema com e sem reciclo (X_1X_2) que mostrou nenhuma significância.

a)



b)



c)

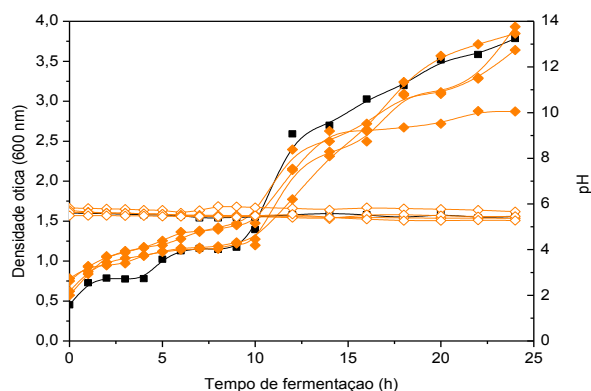
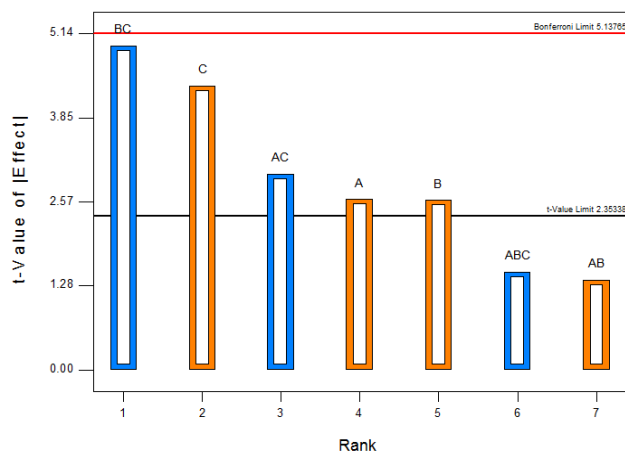
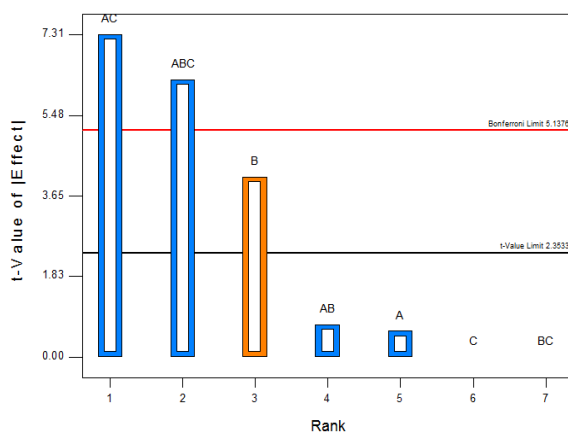


Figura 15. Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* à temperatura de 28°C durante 24h para cada estratégias experimentais definidas na **Tabela 6**: **a)** sistema de reciclo em espiral com linhas de campo na direção axial/transversal; **b)** sistema de reciclo em U com linhas de campo na direção axial/transversal; **c)** fermentador com linhas de campo na direção inclinada. Símbolos DO (600 nm): ■ controle, ◆ 1A-transversal; ● 6A-transversal; ▲ 1A-axial; ▼ 1A-axial; ◆ 3A inclinado. pH: □ Controle, ◇ 1A-transversal; ○ 6A-transversal; △ 1A-axial; ▽ 1A-axial; ◇ 3 A inclinado.

a)



b)



c)

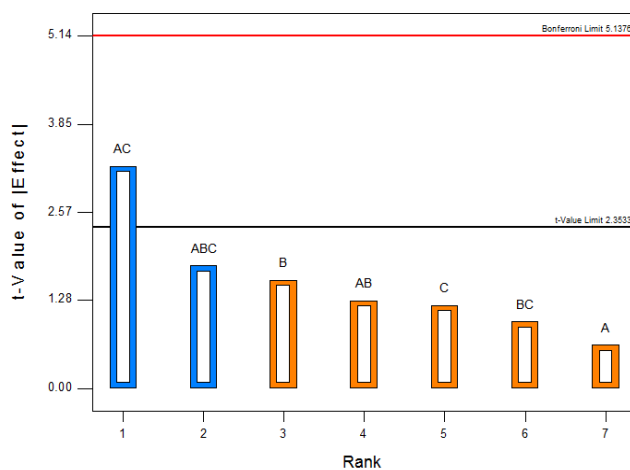


Figura 16. Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre as variáveis resposta para a um nível de confiança de 90% ($p < 0,10$): a) produção de lipase intracelular medida em função de atividade enzimática; b) velocidade específica de crescimento da 1ª fase exponencial; c) velocidade específica de crescimento da 2ª fase exponencial. Nomenclatura: A- X1; B – X2; C – X3. Símbolos: ■ – efeitos positivos; ■ – efeitos negativos.

No caso da velocidade específica de crescimento, apenas o sistema de reciclo favoreceu o crescimento celular na 1ª curva de crescimento, enquanto que os efeitos das interações observados foram negativos, mas estatisticamente significativos (**Figura 16b e c**). O problema parece ser mais crítico para a interação entre a força do campo e a direção de suas linhas de força (interação X_1X_3), que em todos os casos se apresenta como uma combinação negativa.

Entretanto, o Gráfico de Pareto correspondente à **Figura 16b** é o que chama mais a atenção, porque no Gráfico Pareto há dois diferentes limites representados por linhas contínuas, identificados como limite “*t* de Bonferroni” e o limite “*t* standard”. Desta forma, efeitos acima do limite “*t* standard” são possivelmente significativos, mas aqueles que estão acima do limite “*t* de Bonferroni” são certamente significativos, que o caso das interações representadas por AC (X_1X_3) e ABC ($X_1X_2X_3$).

Nas **Tabela 14**, e **Tabela 16** são apresentados os resultados da análise da variância (ANOVA) em nível de confiança de 90% ($p < 0.10$) para ambas as variáveis resposta, revelando que os modelos ajustados foram significantes, apenas para a atividade enzimática de lípase intracelular, de acordo com a análise do teste *F*, desde que o valor de probabilidade seja menor do que o valor de “*F* calculado” ($\text{Prob} > F_{\text{cal}}$).

Quando o valor de *F* calculado for maior que o tabelado para o nível de confiança adotado, há evidência estatística suficiente para supor a existência de uma relação entre as variáveis. Neste caso, o coeficiente de correlação $R^2 = 0,945$ que indica que 94% da variabilidade da resposta pode ser explicada pelo modelo, permitiu corroborar também a qualidade do ajuste.

Deve-se, salientar que estes modelos são de natureza empírica e apenas ajudam a compreender melhor a interação entre as variáveis em estudo, não sendo úteis neste caso para estabelecer relações quantitativas.

Tabela 14. Resultados da análise de variância (ANOVA) usando o programa *Design Expert* referente à variável dependente Atividade enzimática de lipase intracelular, em nível de confiança de 90% ($P < 0,10$).

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de $F_{calculado}$	$Prob > F$
Model	1022,44	7	146,06	9,86	0,0215*
A-A	99,62	1	99,62	6,72	0,0605*
B-B	98,49	1	98,49	6,65	0,0614*
C-C	274,83	1	274,83	18,55	0,0126*
AB	27,42	1	27,42	1,85	0,2453
AC	131,30	1	131,30	8,86	0,0409*
BC	358,18	1	358,18	24,18	0,0079*
ABC	32,60	1	32,60	2,20	0,2121
Residuo	59,26	4	14,82		
Falta de ajuste	15,47	1	15,47	1,06	0,3790
Erro puro	43,79	3	14,60		
Total	1081,70	11			

*Estatisticamente significativo em nível de 95% de confiança.

Nomenclatura: A- X_1 ; B - X_2 ; C - X_3 .

No entanto, ainda que a análise ANOVA para velocidade específica de crescimento celular referente a 1ª curva de crescimento tenha revelado um modelo significativo, a significância estatística também para a curvatura revela a complexidade deste processo e sugere estudos mais rigorosos. Assim sendo, em geral, a falta de ajuste para ambos os modelos que representam as velocidades específicas de crescimento se dá pelo fato das curvaturas serem significativas, estatisticamente para 90% de confiança (**Tabela 15** e **Tabela 16**) e há, portanto a necessidade de se pesquisar modelos matemáticos que sejam mais apropriados para prever ou explicar o efeito do campo no crescimento celular e sua correspondente produção de metabolitos de forma integrada.

Tabela 15. Resultados da análise de variância (ANOVA) usando o programa Design Expert referente à variável dependente Velocidade específica da 1ª fase exponencial, em nível de confiança de 90% ($P < 0,10$).

Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de $F_{calculado}$	$Prob > F$
Model	0,010	7	1,478E-003	15,78	0,0224*
A-A	3,200E-005	1	3,200E-005	0,34	0,5999
B-B	1,568E-003	1	1,568E-003	16,74	0,0264*
C-C	0,000	1	0,000	0,000	1,0000
AB	5,000E-005	1	5,000E-005	0,53	0,5179
AC	5,000E-003	1	5,000E-003	53,38	0,0053*
BC	0,000	1	0,000	0,000	1,0000
ABC	3,698E-003	1	3,698E-003	39,48	0,0081*
Curvatura	2,321E-003	1	2,321E-003	24,78	0,0156*
Erro puro	2,810E-004	3	9,367E-005		
Total	0,013	11			

*Estatisticamente significativo em nível de 95% de confiança.
Nomenclatura: A- X_1 ; B - X_2 ; C - X_3 .

Os gráficos de superfície de resposta ilustrados nas **Figura 16, 17 e 18**, apenas para a produção de lipase mostram a interação entre os três fatores em estudo, sendo que em todos os casos os perfis destas superfícies foram diferentes. A região de máximos valores preditos, em torno de 68,00 U/g, foi alcançada para os níveis mais altos das variáveis independentes X_1 e X_2 e mais baixo para a variável X_3 em nível de 90% de confiança (**Figura 19a, b e c**). Finalmente, visando estabelecer as condições mais favoráveis para alcançar os máximos níveis de produção de lipase intracelular e do crescimento celular, foi realizado um procedimento de otimização numérica e gráfica (**Figura 20**) usando as ferramentas de otimização do programa computacional "Design Expert".

Tabela 16. Resultados da análise de variância (ANOVA) usando o programa *Design Expert* referente à variável dependente Velocidade específica da 2ª fase exponencial, em nível de confiança de 90% ($P < 0,10$).

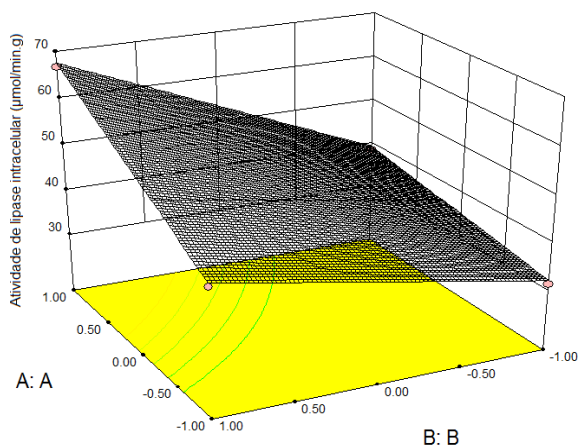
Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de $F_{calculado}$	$Prob > F$
Model	8,930E-003	7	1,276E-003	2,93	0,2032
A-A	1,711E-004	1	1,711E-004	0,39	0,5750
B-B	1,081E-003	1	1,081E-003	2,49	0,2130
C-C	6,301E-004	1	6,301E-004	1,45	0,3150
AB	7,031E-004	1	7,031E-004	1,62	0,2932
AC	4,560E-003	1	4,560E-003	10,49	0,0479
BC	4,061E-004	1	4,061E-004	0,93	0,4052
ABC	1,378E-003	1	1,378E-003	3,17	0,1731
Curvatura	3,626E-003	1	3,626E-003	8,34	0,0631
Erro puro	1,305E-003	3	4,349E-004		
Total	0,014	11			

*Estatisticamente significativo em nível de 95% de confiança.**Não significativo estatisticamente. Nomenclatura: A- X_1 ; B - X_2 ; C - X_3 .

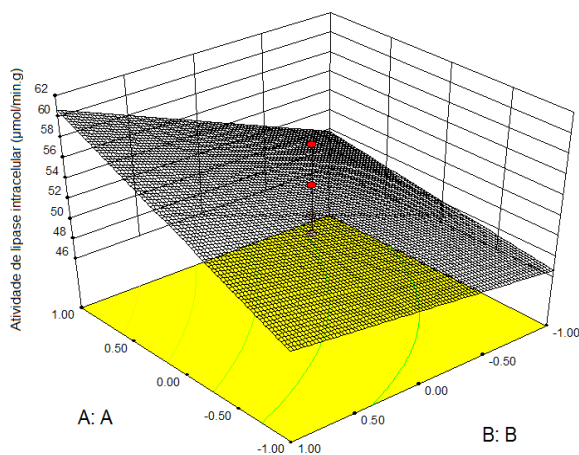
Neste contexto, a **Figura 20b** representa os resultados de otimização numérica, e a melhor solução para a produção máxima de lipase dentro de faixa de parâmetros estudados. Enquanto que a otimização gráfica realizada a partir de uma função objetiva definida como “desejabilidade” (Myers e Montgomery, 1999), na qual permite definir uma região de trabalho; área sombreada de cinza (**Figura 20b**), na qual podem ser alcançados simultaneamente valores de lipase intracelular produzida acima de 60 U/g e velocidades específicas de crescimento celular maiores de $0,10 \text{ h}^{-1}$.

Ressalta-se, ainda, que esta região gráfica de trabalho basicamente é formada pela superposição das curvas dos modelos matemáticos de acordo com os critérios impostos para as variáveis dependentes: R_1 - atividade lipolítica intracelular segundo o método modificado da hidrólise de azeite de oliva; R_2 e R_3 - velocidades específicas de crescimento celular (μ) para a 1ª e 2ª fases exponenciais, respectivamente. Os critérios impostos foram: obtenção de alto rendimento de lipase intracelular produzida e máximo crescimento da *Yarrowia sp.*

a)



b)



c)

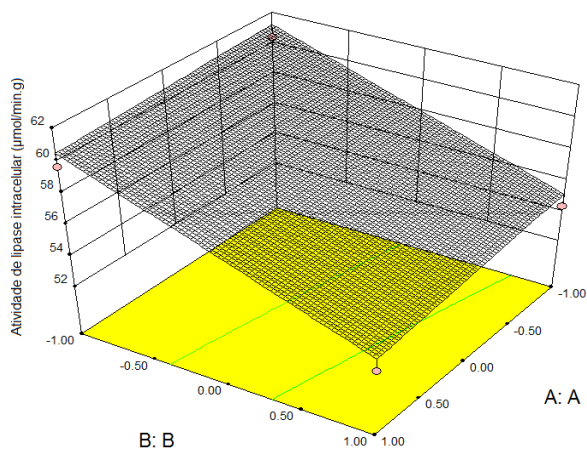
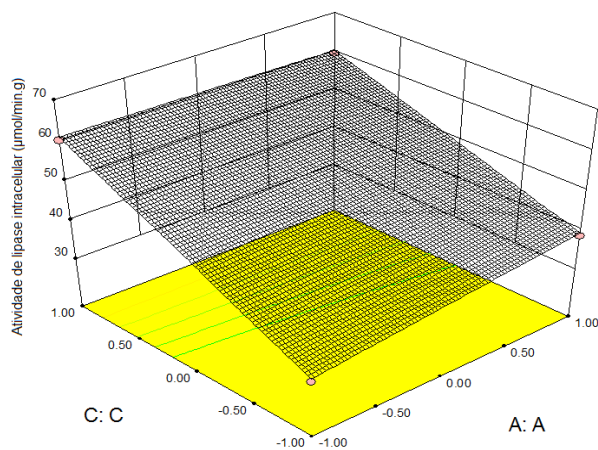
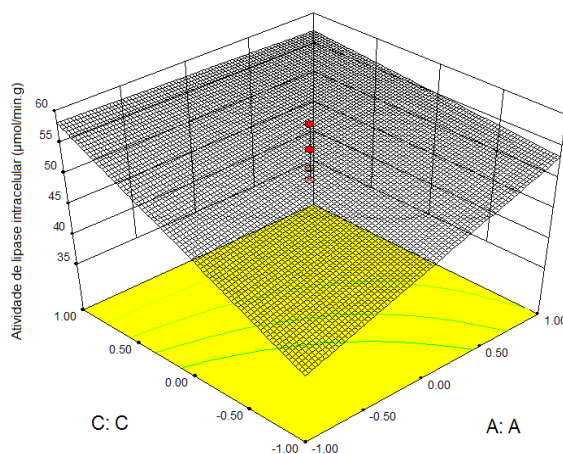


Figura 17. Gráfico tridimensional da superfície de resposta sobre a atividade de lipase intracelular para o planejamento experimental 2^3 realizado ao nível de confiança de 90% mostrando o efeito da interação entre as variáveis: X_1 - Intensidade de campo magnético e X_2 - sistema de reciclo para valores de X_3 – posição do sistema de geração de campo com linhas na direção axial/transversal ou inclinada.: a) $C=-1$; b) $C=0$; c) $C=+1$. **Nomenclatura: A- X_1 ; B – X_2 ; C – X_3 .**

a)



b)



c)

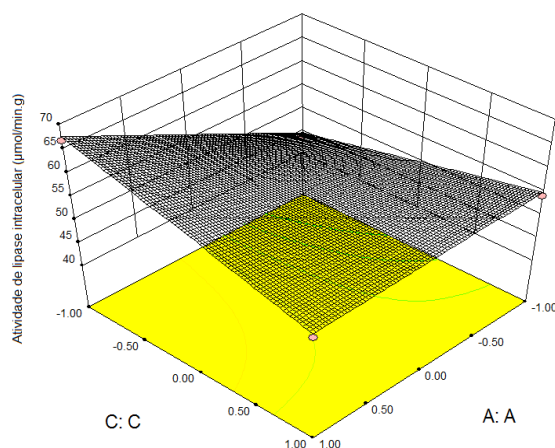
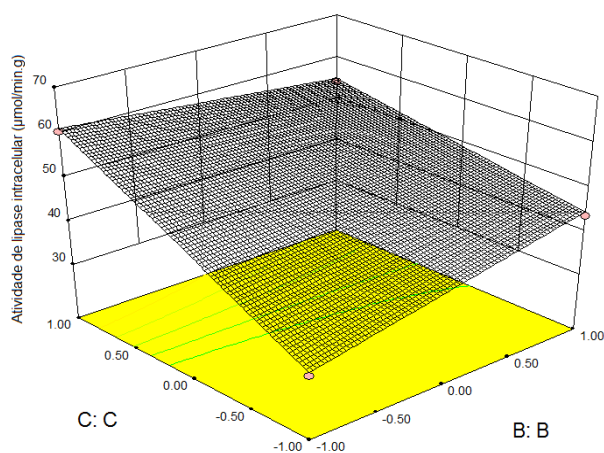
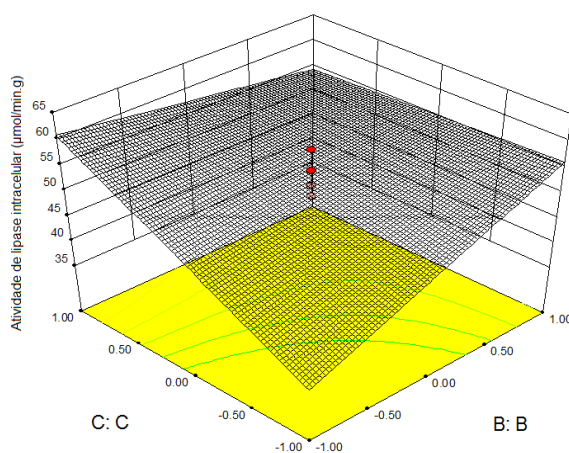


Figura 18. Gráfico tridimensional da superfície de resposta sobre a atividade de lipase intracelular para o planejamento experimental 2^3 realizado ao nível de confiança de 90% mostrando o efeito da interação entre as variáveis: X_1 - Intensidade de campo magnético e X_3 - posição do sistema de geração de campo com linhas na direção axial/ transversal ou inclinada para valores de X_2 - sistema de reciclo para valores de: a) $B=-1$; b) $B=0$; c) $B=+1$. **Nomenclatura:** **A-** X_1 ; **B -** X_2 ; **C -** X_3 .

a)



b)



c)

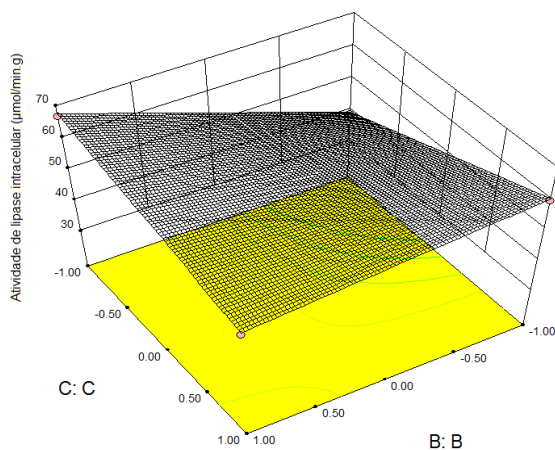
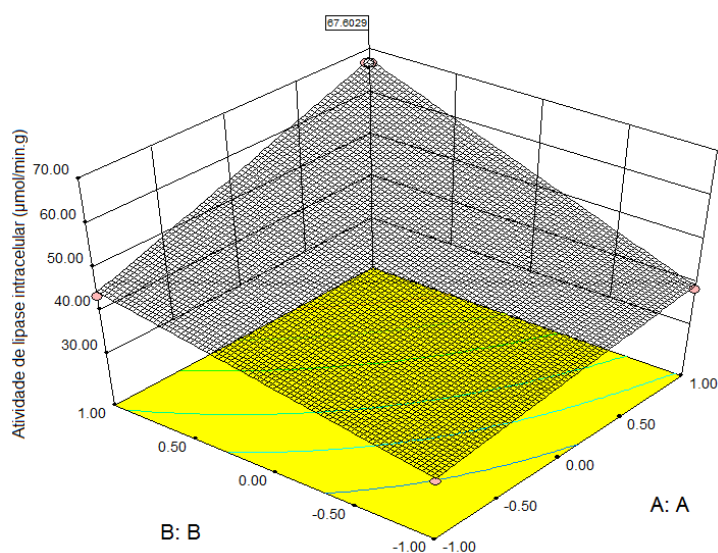


Figura 19. Gráfico tridimensional da superfície de resposta sobre a atividade de lipase intracelular para o planejamento experimental 2^3 realizado ao nível de confiança de 90% mostrando o efeito da interação entre as variáveis: X_2 - sistema de reciclo e X_3 - posição do sistema de geração de campo com linhas na direção axial/ transversal ou inclinada para valores de X_1 - Intensidade de campo magnético e para valores de: a) $A=-1$; b) $A=0$; c) $A=+1$. **Nomenclatura:** **A- X_1 ; B - X_2 ; C - X_3 .**

a)



b)

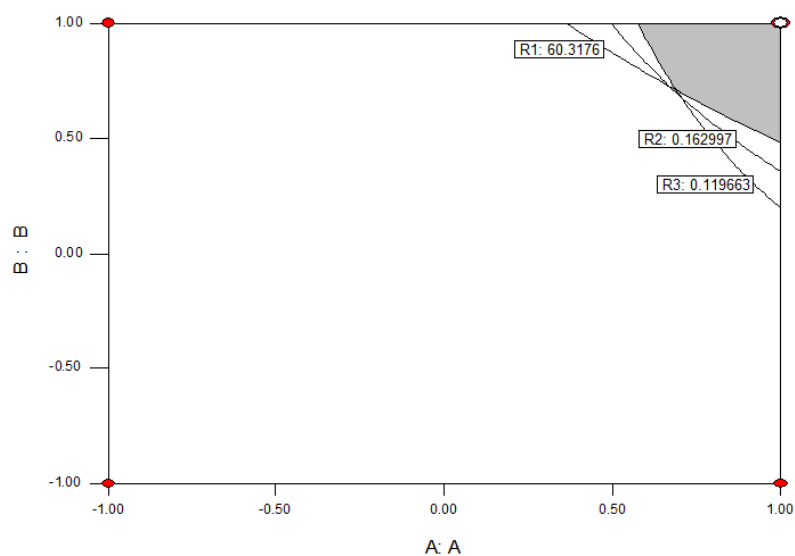


Figura 20. Resultados de otimização dentro da região em estudo para a produção de lipase e crescimento de *Y. lipolytica* por fermentação submersa: a) superfície de resposta obtida por otimização numérica para a produção de lipase intracelular; b) otimização gráfica simultânea para a produção de lipase intracelular e o crescimento celular da levedura para as fases exponenciais do comportamento diaúxico. (Observação: para ambas figuras o valor de C (X3 - posição das linhas de campo) corresponde ao nível mais baixo, ou seja, -1).

Com o propósito de validar as condições otimizadas, novos experimentos para avaliar a cinética da fermentação foram conduzidos de acordo com os critérios das variáveis independentes de 6A com sistema de reciclo em U e linhas de campo na direção transversal (**Figura 21**). Conforme observado, o crescimento da levedura iniciou imediatamente após sua incubação, alcançando velocidades específicas da ordem de $0,10 \text{ h}^{-1}$, porém a secreção da enzima foi medida ao cabo de 24 h com resultados semelhantes às condições definidas pela otimização numérica e gráfica (**Tabela 17**).

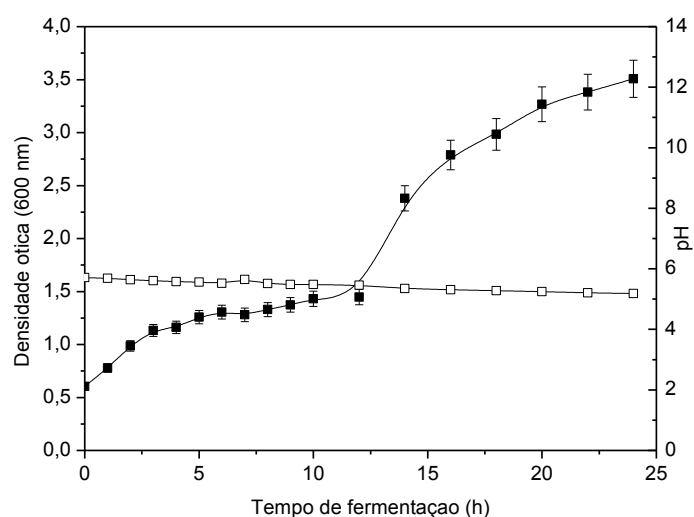


Figura 21. Resultados da cinética de crescimento da *Y. lipolytica* medidos em termos de densidade ótica, utilizando o sistema de reciclo em U, com corrente de 6A, com linhas de campo na posição transversal. Símbolos: ■ densidade ótica a 600 nm, □ pH.

De forma geral, apesar da diversidade de trabalhos publicados e as controvérsias sobre efeitos biológicos negativos ou positivos dos campos eletromagnéticos, estes resultados, mesmo que preliminares, despertam uma grande curiosidade (Hristov e Perez, 2011; Hristov, 2010; Hunt *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2007; Santos., 2008; Santos *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2010).

Tabela 17. Resultados da validação da otimização da produção de lipase intracelular e da velocidade específica de crescimento da *Y. lipolytica*.

Condição experimental	Velocidade específica de crescimento - μ (h^{-1})		Atividade de lipase intracelular (U/g)
	1ª fase exp.	2ª fase exp.	
6A com sistema de reciclo em U e linhas de campo transversais	0,095	0,117	66,36

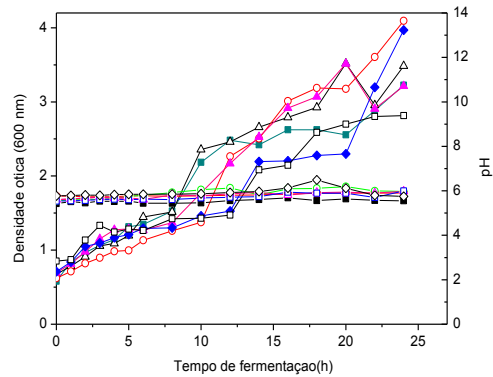
Deve-se salientar que estudos prévios de produção de lipase intracelular usando glicerina como substrato, revelaram efeitos positivos e negativos do campo eletromagnético sobre o crescimento celular, comparativamente ao experimento controle, embora, usando biorreator acoplado a um gerador de campo eletromagnético constituído basicamente por um solenoide **Figura 22** (Inocêncio, 2011).

Da mesma forma, que os resultados apresentados neste trabalho, as condições que favoreceram o crescimento foram distintas daquelas que influenciaram a produção de lipase intracelular. De qualquer maneira, uma diferença evidente entre estes dois sistemas se dá pela magnitude das forças de campo, cerca de 3,5 vezes maior no sistema axial/ transversal deste trabalho (até 14,136 mT) comparado com os 3 a 4 mT no sistema de solenoide.

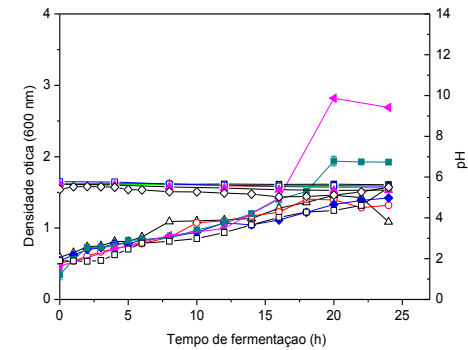
Assim sendo, as diferenças entre os resultados encontrados pode ser devido à uniformidade do campo em regiões internas próximas ao centro axial de um solenoide em módulo, direção e sentido. Diferente do sistema axial transversal em estudo, onde existe distribuição de indução magnética variável em função do diâmetro das bobinas e da distância entre elas.

Difícil também resulta explicar, neste momento, os mecanismos biofísicos que constituem o fundamento da interação destes campos magnéticos com a levedura. No entanto, trabalhos precursores de nosso grupo de pesquisa “Biomagnetismo Aplicado à Engenharia de Processos” têm postulado que um dos efeitos biológicos mais prováveis seja devido à alteração da permeabilidade das membranas celulares e conseqüentemente a alterações no metabolismo celular (Alvarez *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007).

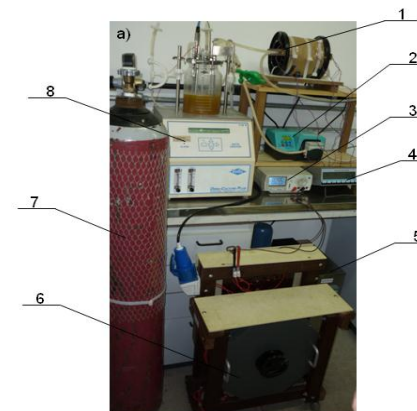
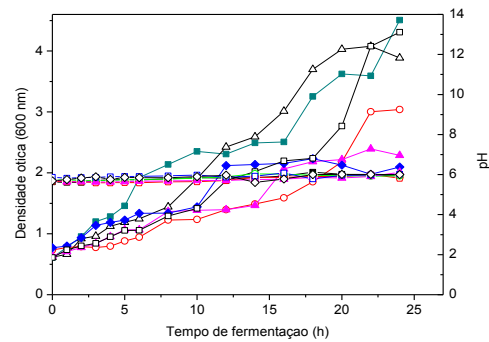
a)



b)



c)



Biorreator assistido por campo magnético: 1- solenoide, 2- bomba peristáltica de reciclagem, 3- multímetro, 4- datalogger de temperatura, 5- banho ultratermostático para controle de temperatura da fermentação, 6- fonte de variação de tensão (VARIAC), 7- fornecedor de ar, 8- fermentador modelo VIRTIS.

Figura 22. Cinética de crescimento de *Y. lipolytica* em fermentação submersa durante 24 h a 28°C sob o efeito de campos eletromagnéticos. a) sistema interno com 1 voltagem; b) sistema interno com 4 voltagens e c) sistema interno em espiral. Símbolos D.O- ■ Controle, △ 2,35 mT, ○ 9,42 mT, ▲ 14,13 mT, ◆ 18,84, □ 23,53 mT. pH- ■ Controle, △ 2,35 mT, ○ 9,42 mT, ▲ 14,13 mT, □ 18,84mT, ◇ 23,56 mT. **Nomenclatura:** 1 A equivale a 2,356 mT (Inocência, 2011).

Os resultados observados em termos de efeito de campo eletromagnético sobre o processo de crescimento e produção de lipase intracelular, por um lado impõem restrições à aplicação destes campos em processos fermentativos, e sugerem aprimoramentos e/ ou desenvolvimento de novas tecnologias de biorreatores que permitam a exploração de parâmetros com flexibilidade de condições de operação.

5.3. Produção de proteína unicelular de *Y. lipolytica*

Estudos utilizando proteína unicelular em ração animal têm sido feitos, principalmente o uso da *Saccharomyces cerevisiae*, proveniente da fermentação alcoólica (Filho *et al.*, 1994; Togashi *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2002; Chiquieri *et al.*, 2007). A biomassa da *Yarrowia sp.* em estudo tem um conteúdo médio proteico de 23,04% na matéria natural, e uma média de energia bruta de 2257,035. Valores baixos em relação ao encontrado na literatura para fungos e levedura, entre 33 a 45 % (Ward, 1989).

Cui *et al.* (2011) clonaram um gene (INU1) na *Y. lipolytica* para a produção de proteína em meio contendo inulina, chegando a produzir 47,5% de proteína bruta e 20,1 g/L após 72 h de cultivo. Zanuto e colaboradores (1999) incluíram *S. cerevisiae* na ração de leitões e não encontraram diferenças em relação ao consumo e no ganho de peso diário, entretanto, o nível de 7% de inclusão proporcionou melhoria na conversão alimentar e reduções nos custos da ração por quilograma de peso vivo.

Devido ao aumento da produção nas indústrias processadoras de ração, ocasionado pelo crescimento das indústrias produtoras de aves e suínos influenciadas pelo desempenho das exportações (Sindirações, 2011), a alternativa de utilizar a *Y. lipolytica* como complemento proteico no farelo de soja é interessante para diminuir o custo da ração, o que acaba sendo mais rentável tanto para a indústria quanto para o produtor de suínos e aves. Na **Figura 23**, mostra as projeções no crescimento na produção de carne suína, bovina e de frango.

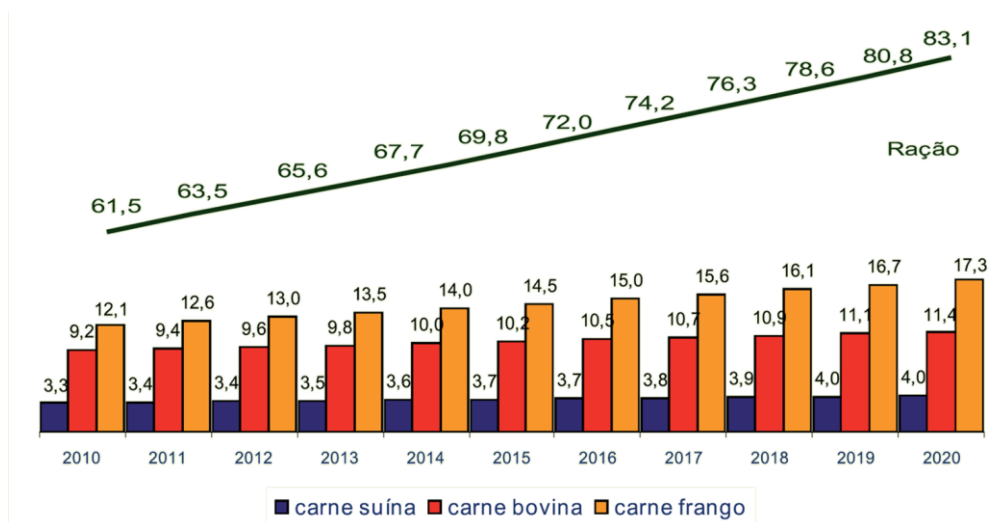


Figura 23. Projeções de crescimento para a produção de carne e ração (Sindirações, 2011).

5.4. Reação de biodiesel pela rota enzimática

Para avaliar o potencial das enzimas como biocatalisador na reação de transesterificação foram utilizadas diferentes porcentagens em peso de biomassa (20, 35 e 50 %) em relação à massa de óleo. As razões molares de óleo e álcool também foram avaliadas (1:6; 1:12; 1:16). Embora a relação estequiométrica da reação de biodiesel seja 3 moles de etanol por cada mol de óleo, sempre se recomenda utilizar um excesso de álcool para compensar a perda por evaporação, porém, o excesso do álcool na reação pode ocasionar desativação das enzimas e afetar a polaridade do meio dentre outras desvantagens (Freitas et al., 2009).

As três temperaturas avaliadas foram: 30, 35 e 40°C, escolhidas pelas faixas de termo estabilidade das enzimas e dos estudos prévios reportados no Erro! Fonte de referência não encontrada. As três relações de tampão 0,1 M (pH 7.0) foram usadas para ajustar o conteúdo de água de acordo com os estudos reportados na literatura (Ban, et al., 2002; Oda, et al., 2005; Li, Du, & Liu, 2007; Arai, et al., 2010).

Os resultados apresentados na **Figura 24**, mostram que, a temperatura de 40°C, independente das outras variáveis, teve uma menor conversão de ésteres etílicos (mg/mL) e isso pode ser explicado por uma possível perda de

atividade das enzimas. A maior concentração de biodiesel formado foi encontrada a uma temperatura de 30°C.

Em qualquer temperatura as melhores condições sempre foram a uma razão molar de óleo: álcool 1:12, 35% de biocatalisador e 3% de tampão fosfato, sendo estes resultados um bom ponto de partida para posteriores e mais profundos estudos, uma vez que neste trabalho se pretendia apenas verificar a formação de etil ésteres e não aperfeiçoar as condições para obter as melhores conversões e rendimentos.

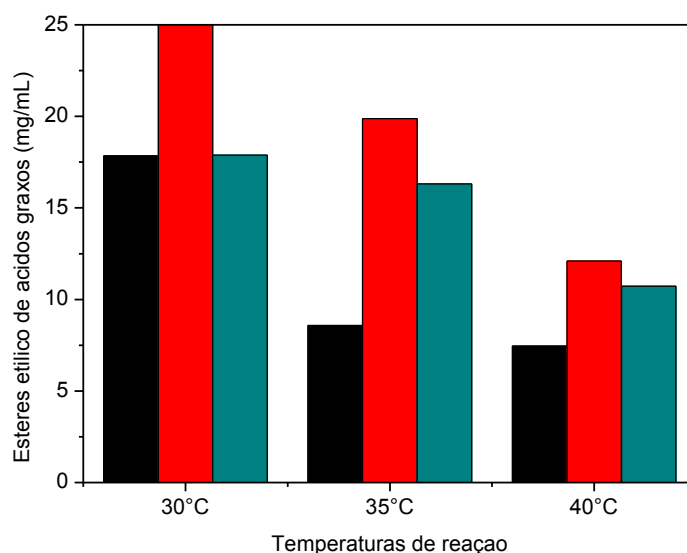


Figura 24. Reação de biodiesel com células livres de *Y. lipolytica* em diferentes condições de reação e a diferentes temperaturas. Símbolos: ■ Razão molar óleo:alcool (1:6), 20% de biocatalisador, 1% de tampão fosfato pH7; ■ razão molar óleo:alcool (1:12), 35% de biocatalisador, 3% de tampão fosfato pH7; ■ razão molar óleo:alcool (1:16), 50% de biocatalisador, 5% de tampão fosfato pH7.

5.5. Proposta Tecnológica de produção de biodiesel integrada

Com base nos resultados anteriores, que evidenciam o potencial do glicerol como fonte de carbono para o crescimento da *Y. lipolytica* surge então uma proposta tecnológica para a integração da produção de biodiesel pela rota enzimática e o reuso da glicerina resultante para a produção de “whole cell” e/ou proteína unicelular, convenientemente.

Neste contexto, o fluxograma geral dessa tecnologia está ilustrado na **Figura 25**, considerando um processo que se inicia pela rota química, e logo gera um volume de glicerol refinado suficiente para a produção de “whole cells”, adota a rota enzimática. É formado por duas etapas de transesterificação enzimática que recicla continuamente a glicerina formada para produzir a própria “whole cell”. Parte da biomassa celular pode ser empregada como proteína unicelular (“Single cell protein – SCP”) na formulação de ração animal. Salienta-se, que a escolha pela produção de “whole cells” ou da proteína unicelular dependa da demanda de biocatalisador e da possibilidade de reuso do mesmo durante as etapas de transesterificação enzimática.

Diante disso, com o propósito de realizar uma avaliação técnico-econômica da viabilidade desta tecnologia, foram feitos balanços de massa e energia, bem como, uma estimativa econômica preliminar do processo, tomando como base uma usina de biodiesel com uma produção de 100000,00 ton/ano. De forma geral, no Apêndice B se apresentam detalhes dos balanços de calor e massa. Entretanto, na **Tabela 16** se apresentam os resultados de todas as correntes do processo.

Finalmente, para realizar uma análise do impacto ambiental desta tecnologia foi conduzido um estudo comparativo com um processo químico convencional (**Figura 26**), cujos balanços de massa globais estão apresentados na **Tabela 20**. Este estudo foi realizado com auxílio de um programa computacional conhecido como Algoritmo WAR (“Waste Reduction Algoritm”).

O algoritmo WAR foi desenvolvido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency - USEPA) e permite a comparação de processos medindo índices de poluição, potencial de aquecimento global, potencial de impacto em camada de ozônio, toxicidade, entre outras, das substâncias que são geradas e consumidas. Este método é flexível, o que permite dar maior a menor ênfase a categoria de impacto individual entre os índices de poluição de acordo com as necessidades específicas. Estes índices podem ser usados para o desenho e o redesenho de processos ambientalmente mais amigáveis (Young *et al.*, 2000). De fato, os resultados observados desta análise estão ilustrados na **Figura 26**, os quais

revelaram que os impactos gerados pela tecnologia enzimática em forma geral são menores. Embora estes resultados não sejam conclusivos, são animadores vislumbrando o potencial desta tecnologia não convencional. Contudo, ainda há muito por ser estudado, principalmente no aprimoramento do “whole cells”, no sentido de aumentar a sua atividade catalítica e assim melhorar a eficiência de conversão e a produtividade do processo. Estudos futuros deverão ser desenvolvidos com foco na avaliação econômica com vistas a verificar possíveis benefícios que podem ser gerados com a implantação desta alternativa tecnológica.

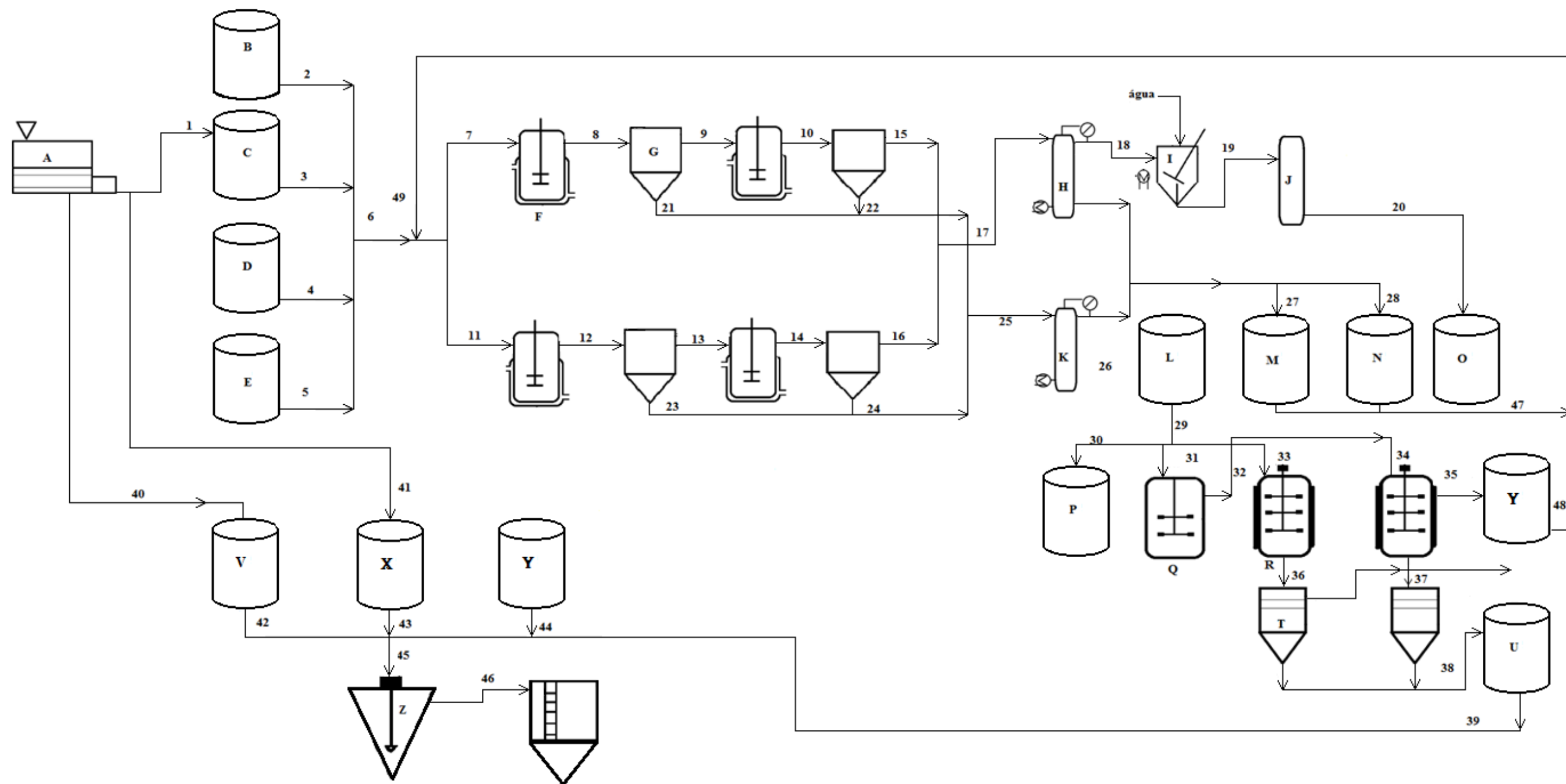


Figura 25. Proposta tecnológica de produção de biodiesel pela rota enzimática com reuso do glicerol em processo fermentativo: Equipamentos (A) extrator de óleo de soja, (B) tanque de etanol, (C) tanque de óleo, (D) tanque de t-butanol, (E) tanque de biocatalisador, (F) reator de biodiesel, (G) centrífuga, (H) coluna de recuperação do etanol, (I) tanque de lavagem de biodiesel, (J) coluna para secagem do biodiesel, (K) coluna de recuperação do etanol, t-butanol e refino da glicerina, (L) tanque de glicerol, (M) tanque de etanol, (N) tanque de t-butanol, (O) tanque de biodiesel, (P) tanque de sais minerais para fermentação, (Q) reator de pré-inóculo, (R) fermentador, (S) tanque de biocatalisador, (T) centrífuga, (U) tanque de biomassa, (V) tanque de farelo de soja, (X) tanque de óleo de soja para ração, (Y) tanque de nutrientes para ração, (Z) tanque misturador de ração. Reagentes (1) óleo de soja, (2) etanol, (3) óleo de soja, (4) t-butanol, (5) biocatalisador, (6) mistura para reação de biodiesel, (7) mistura para reação de biodiesel, (8) mistura para reação de biodiesel, (9) biodiesel, glicerina e óleo, (10) biodiesel e óleo, (11) mistura para reação de biodiesel, (12) biodiesel, glicerina e óleo, (13) biodiesel e óleo, (14) biodiesel, glicerina e óleo, (15) biodiesel e etanol, (16) biodiesel e etanol, (17) biodiesel e etanol, (18) biodiesel, (19) biodiesel e água, (20) biodiesel refinado, (21) glicerina e etanol, (22) glicerina e etanol, (23) glicerina e etanol, (24) glicerina e etanol, (25) glicerol e etanol, (26) glicerol purificado, (27) etanol, (28) t-butanol, (29) glicerol, (30) nutrientes para a fermentação, (31) meio de cultura, (32) pré-inóculo, (34) meio de cultura e pré-inóculo, (35) meio de cultura e pré-inóculo, (36) meio de cultura mais células, (37) meio de cultura mais células, (38) biomassa, (39) biomassa, (40) farelo de soja, (41) óleo de soja, (42) farelo de soja, (43) óleo de soja, (44) nutrientes para ração animal, (45) mistura para formulação da ração animal, (46) ração animal, (47) ter-butanol e etanol, (48) biocatalisador, (49) mistura de reagentes e biocatalisador para reação de biodiesel pela rota enzimática.

Tabela 18. Balanços de massa para produção de biodiesel pela rota enzimática, com o sistema cíclico de reciclo da glicerina.

Componentes	Correntes do fluxograma															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15-16 e 17	18
Óleo (m ³)	463,00		463,00			463,00	231,500	231,500	219,95	219,95	231,500	231,500	231,500	219,95		
Etanol (m ³)		170,0				170,00	85,000	85,000	85,000	85,000	85,000	85,000	85,000	85,000	85,000	
Ter-butanol				138,90		138,90	69,450	69,450	69,450	69,450	69,450	69,450	69,450	69,450	69,450	
Biocatalisador					266,00	266,0	133,000	133,000	133,000	133,000	133,000	133,000	133,000	133,000	133,000	
Glicerina (m ³)								8,45		8,45		8,450		8,45	33,8	
Biodiesel (m ³)															374,88	374,88

Tabela 20. Balanços de massa para produção de biodiesel pela rota enzimática, com o sistema cíclico de reciclo da glicerina.

Componentes	Correntes no fluxograma																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	13	17-20	21-24	25	27
Água (m ³)																345,0			
Óleo (m ³)	1278		1278		1278	639	639	607,05			639	639	607,05						
Etanol (m ³)		510			510	255	255	255	255	255	255	255	255	255	255				510
NaOH (m ³ /dia)				23,15	23,15	11,50	11,50	11,50	11,50		11,50	11,50	11,50	11,50					
Glicerina (m ³)																	31,0	63,9	
Biodiesel (m ³)										576,65					576,6	1153			
Ácido fosfórico																1,17			

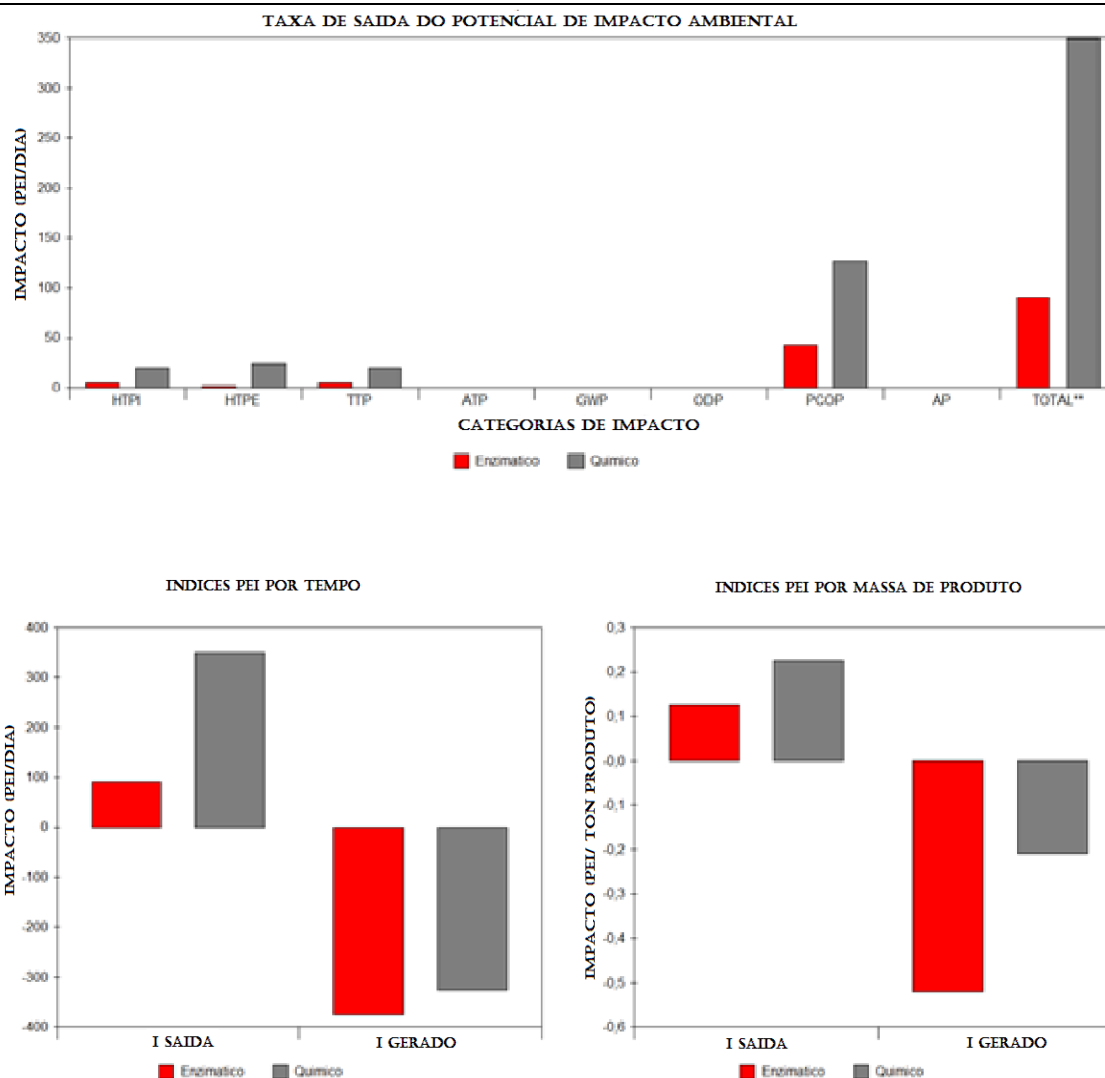


Figura 26. Resultados da análise do impacto ambiental usando Algoritmo WAR. Nomenclatura para definir as categorias de impactos: HTPI - potencial de toxicidade humana por ingestão; HTPE - potencial de toxicidade humana por exposição; TTP - potencial de toxicidade terrestre; ATP - potencial de toxicidade aquática; GWP - potencial de aquecimento global; ODP - potencial de destruição do ozônio; PCOP - potencial de oxidação fotoquímica; AP - potencial de acidificação.

6. CONCLUSÕES

De forma geral, os objetivos propostos foram alcançados, e embora os resultados observados não sejam totalmente conclusivos, são animadores para o desenvolvimento de uma nova tecnologia não convencional que integra a produção de biodiesel com o reuso de glicerol residual à cadeia produtiva da soja. Neste contexto, as seguintes conclusões podem ser formuladas em correspondência com os objetivos propostos:

1. Este trabalho evidencia que a *Y. lipolytica* cresce em meio contendo glicerol como fonte de carbono, e de acordo a atividade lipolítica observada, foi verificado que produz lipase intracelular. Portanto, tem potencial para produção de biodiesel pela rota enzimática;
2. A avaliação dos campos eletromagnéticos de baixa frequência e intensidade acoplados a biorreator, com e sem reciclo, revelou que as condições que favoreceram a produção de lipase intracelular foram diferentes a aquelas que afetaram o crescimento celular. Há, portanto, necessidade de aprofundar estes estudos;
3. Em virtude das estratégias tecnológicas predefinidas, parte da biomassa produzida usando glicerol como fonte de carbono poderá ser destinada para produzir “whole cells”, ou para a produção de proteína unicelular (“single cell

protein”) visando à formulação de ração animal, e agregando valor à cadeia produtiva da soja;

4. A análise de impacto ambiental usando Algoritmo WAR revelou que os impactos gerados pela tecnologia proposta foram menores comparativamente com o processo químico convencional, reforçando o potencial desta tecnologia.

7. RECOMENDAÇÕES

- Realizar estudos de melhorias e otimização, de processo de obtenção de biodiesel pela via enzimática, usando células integras de micro-organismos (whole cells) livres e imobilizadas;
- Aprimorar os biorreatores assistidos por campo magnético, de forma tal que permitam uma maior exploração de parâmetros, com flexibilidade nas condições de operação. Exemplo: sistemas com ajuste variável de espaçamento entre as bobinas, implantação de sistemas de resfriamento das bobinas para operar em condições de campo mais elevadas;
- Conduzir estudos de análise técnico-econômica para verificar os benefícios econômicos que podem ser gerados com a implantação desta tecnologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczak, M., & Bednarski, W. (2004). Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. *Process Biochemistry*, *39*, 1347-1361.
- Albertini, M., Accorsi, A., Citterio, B., Burattini, S., Piacentini, M., Uguccioni, F. et al. (2003). Morphological and biochemical modifications induced by a static magnetic field on *Fusarium culmorum*. *Biochimie*, *85*, 963-970.
- Alvarez, D. C., Pérez, V. H., Justo, O. R., Alegre, R. M. (2006). Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using cheese whey permeate. *Process Biochemistry*, *41*, 1967-1973.
- Amaral, P. F., Lehocky, M., Barros-Timmons, A. M., Rocha-Leao, M. H., Coelho, M. A., Coutinho, J. A. (2006). Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ50682. *Yeast*, *23*, 867–877.
- Amaral, P.F.F. (2007). Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Tese de doutorado. Rio de Janeiro, 221 p.
- Arai, S., Nakashima, K., Tanino, T., Ogino, C., Kondo, A., & H., F. (2010). Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-

- cell biocatalysts in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 51-55.
- Arruda, P., Rodrigues, R., Felipe, M. (2007). Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Revista Analytica*, 26, 56-63.
- Bailey, J., e Ollis, D. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. (2^a ed.). McGraw- Hill Book Company.
- Ban, K., Hama, S., Nishizuka, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A. et al. (2002). Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17, 157–165.
- Ban, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., & Fukuda, H. (2001). Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, 8, 39-43.
- Barth, G., & Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev*, 19, 219-237.
- Binnering, D., & Ungvichian, V. (1997). Effect of 60 Hz AC magnetic field on gene expression following exposure over multiple cell generations using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43, 83-89.
- Blankschien, M., Clomburg, J., Gonzalez, R. (2010). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol. *Metabolic Engineering*, 12, 409-419.
- Buehler, L. (1999). *What is life. Bioelectricity of Cell Membranes*.
- Cardona, C., Posada, J., & Quintero, J. (2010). *Aprovechamiento de subproductos y residuos agroindustriales: glicerina y lignocelulosicos*. ISBN 978-95-44-7611-1.
- Carvalho, R. (1 de 2009). *Vantagens e riscos do cultivo do Pinhão Manso*. Acesso em 7 de 8 de 2010, disponível em <http://www.iica.org.br/Agronegocio>.
- Cervantes-Chávez, J., & Ruiz-Herrera, J. (2007). The regulatory subunit of protein kinase A promotes hyphal growth and plays an essential role in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*, 7, 929-940.

- Cervantes-Chávez, J., Kronberg, F., Passeron, S., & Ruiz-Herrera, J. (2009). Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 390–399.
- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M. et al. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36(2), 1097–1108.
- Chen, X., Xiu, Z., Wang, J., Zhang, D., Xu, P. (2003). Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 386-394.
- Chemical Engineering (2012) Draining Process Vessels. Editora Achema. 80p. circle 56.
- Chiquieri, J., Soares, R.T.R.N., Nery, V.L.H., Carvalho, E.C.Q., Costa, A.P.D. (2007). Bioquímica sanguínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* v.8, n.2, p. 97-104.
- Choi, S., e Oh, Y. (2012). The spray characteristics of unrefined biodiesel. *Renewable Energy*, 42, 136-139.
- Coelho, M., Amaral, P., Belo, I. (2010). *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. In: M. Vilas. (Ed.). Formatex.
- Corzo, G., e Revah, S. (1999). Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology*, 70, 173-180.
- Costa Neto, P. R., Rossi, L. F., Zagonel, G. F., & Ramos, L. P. (2000). Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, 23(4), 531-537.
- Cui, W., Wang, Q., Zhang, F., Zhang, S., Chi, Z., Madzak, Z. (2011). Direct conversion of inulin into single cell protein by the engineered *Yarrowia lipolytica* carrying inulinase gene. *Process Biochemistry*, 46, 1442–1448.
- Da Silva, G., Mack, M., Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27, 30-39.

- Demirbas, A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50, 14–34.
- Dini, L., Abbro, L. (2005). Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron*, 36, 195-217.
- Dominguez, A., Ferminan, E., Gaillardin, C. (2000). *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. *Contrib. Microbiol.*, 5, 151-172.
- Easterling, E. R., French, W. T., Hernandez, R., Licha, M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, , 100, 356-361.
- Fabiano, D. P., Rosa, C. A., Marciniuk, L. L., Cardoso, D. (2007). *Simulação da Reação de Esterificação para Obtenção do Biodiesel*. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP.
- Fickers, P., Benetti, P., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M., et al. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research.*, 5, 527-543.
- Filho, L. de C.L., Kronka, R.D., Thomaz, M.C., Curtarelli, S.M. (1994). Utilização da levedura de centrifugação da vinhaça (*Saccharomyces cerevisiae*), como fonte protéica para leitões na fase inicial (10 a 30 Kg PV). *Rev. soc. bras. zoot.* 2, vol. 23.
- Fojt, L., Klapetek, P., Stras, L., (2009). 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. *Micron*, 40, 918–922.
- Fukuda, H., Hama, S., Tamalampudi, S., Noda, H. (2008). Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production . *Trends in Biotechnology*, 26, 668-673.
- Gao, F., Zhang, S., Su, Z., Ma, G., Wan, P. (2011). Simultaneous production of 1,3- dihydroxyacetone and xylitol from glycerol and xylose using a nanoparticle-supported multi-enzyme system with in situ cofactor regeneration. *Bioresource Technology*, 102, 1837-1843.

- Gao, M., Zhang, J., Feng, H. (2011). Extremely Low Frequency Magnetic Field Effects on Metabolite of *Aspergillus niger*. *Bioelectromagnetics*, 32, 73-78.
- Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C., Irimie, F. D. (2012). Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renewable Energy*, 39, 10-16.
- Gomes, N. C. (2005). *Efeito do oxigênio na biotransformação de lípidos em aromas pela levedura Yarrowia lipolytica*. Universidade do Minho.
- Gonzalez, R., Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. (2008). A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*, 10, 234–245.
- Guevara-Olvera, L., Calvo-Mendez, C., Luiz-Herrera, J. (1993). The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of General Microbiology*, 193, 485-493.
- Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, D., Numatab, T., Tamalampudi, S., Kondo, A., (2007). Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, 34, 273–278.
- Heller, K., Lin, E., Wilson, T. (1980). Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 144, 274–278.
- Helwani, Z., Othman, M., Aziz, N., Kim, J., Fernando, W. (2009). Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: a review. *Appl. Catal. A- Gen.*, 363, 1–10.
- Hirano, M., Ohta, A., Abe, K. (1998). Magnetic Field Effects on Photosynthesis and Growth of the *Cyanobacterium spirulina platensis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(3), 313-316.
- Hong, C., Shellock, F. (1990). short-term exposure to a 1.5 tesla static magnetic field does not affect somato-sensory-evoked potentials in man. *Mognnic Resonance Imaging*, 8, 65-69.
- Horwitz, W.(1997) Official methods of analysis of AOAC Internacional. Maryland: Gaithersburg, 16, 1298.

- Hristov, J. (2010). Magnetic field assisted fluidization – a unified approach. Part 8. Mass transfer: magnetically assisted bioprocesses. *Reviews in Chemical Engineering*, 26(3-4), 55-128.
- Hristov, J., Perez, V. (2011). Critical analysis of data concerning *Saccharomyces cerevisiae* free-cell proliferations and fermentations assisted by magnetic and electromagnetic fields. *International Review of Chemical Engineering*, 3, 1-18.
- Hu, Z., Zheng, Y., Shen, Y. (2011). Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, 102, 7177-7182.
- Hunt, R., Zavalin, A., Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Das, K. C. (2009). Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy Applications. *International Journal of molecular science*, 10, 4515–4558.
- Huynh, L., Kasim, N., Ju, Y. (2011). Biodiesel Production from Waste Oils Chapter 16. *Biofuels*, 375–396.
- Inocência, E.J. (2011). *alternativas para o uso do glicerol como substrato em processos fermentativos visando tecnologia integrada de produção de biodiesel*. Monografia de Conclusão do Curso de Licenciatura em Biologia. Centro de Biociências e Biotecnologia. UENF, Campos dos Goytacazes.
- Iwasaka, W., Ikehata, M., Miyakoshi, J., Ueno, S. (2004). Strong static magnetic field effects on yeast proliferation and distribution. *Bioelectrochemistry*, 65, 59-68.
- Jang, M. G., Kim, D. K., Park, S. C., Lee, J. S., Kim, S. W. (2012). Biodiesel production from crude canola oil by two-step enzymatic processes. *Renewable Energy*, 42, 99-104.
- Ji, W., Huang, H., Deng, A., Pan, C. (2009). Effects of static magnetic fields on *Escherichia coli*. *Micron*, 40, 894-898.
- Justo, O. R., Perez, V., Alvarez, D. C. (2007). gp-41 protein production by *E. coli* in unconventional bioreactor coupled with magnetic field generator. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 738-744.

- Justo, O. R., Perez, V., Alvarez, D. C., Alegre, R. M. (2006). Growth of the *Escherichia coli* under Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134, 155-164.
- Kamzolova, S., Shishkanova, N., Morgunov, I., Finogenova, T. (2003). Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, 15 28, 1-6.
- Kaneko, H., Hosohara, M., Tanaka, M., Itoh, T. (1976). Lipid composition of 30 species of yeast. *Lipids*, 11(12), 837-844.
- Kaur, S., Mishra, P., Prasad, R. (1988). Dimorphism-associated changes in intracellular pH of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*, 972, 277–282.
- Kawasse, F. M., F., A. P., Rocha-Leão, M. H., Amaral, A. L., Ferreira, E. C., Coelho, M. A. (2003). Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 25, 371-375.
- Knothe, G., Gerpen, J., Krahl, J., Ramos, L. (2006). *Manual do Biodiesel*. (E. Blucher, Ed.) São Paulo.
- Koda, R., Numata, K., Hama, S., Tamalampudi, S., Nakashima, K., Tanaka, T., (2010). Ethanolysis of rapeseed oil to produce biodiesel fuel catalyzed by *Fusarium heterosporum* lipase-expressing fungus immobilized whole-cell biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66, 101-104.
- Kojima, S., Du, D., Sato, M., Park, E. (2004). Efficient Production of Fatty Acid Methyl Ester from Waste Activated Bleaching Earth Using Diesel Oil as Organic Solvent. *Journal of Bioscience e Bioengineering.*, 98(6), 420-424.
- Ladeira, B. L., Mallmann, C., Burkert, C. A. V. (2011). Uso de glicerina residual no cultivo de diferentes leveduras. XIII ENPOS. Universidade Federal do Rio Grande.
- Lagroye, I., Percherancier, Y., Juutilainen, J., Gannes, F. P., Veyret, B. (2011). ELF magnetic fields: Animal studies, mechanisms of action. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 107, 369–373.

- Lei, Y. e Berg, H. (1998). Eletromagnetic window wffwcts on proliferation rate of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 45, 261-265.
- Leung, D., Wu, X., Leung., M. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl. Energ.*, 87, 1083–1095.
- Levinson, W. E., Kurtzman, C. P., Kuo, T. M. (2007). Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol . *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 292-295.
- Li, Q., Du, W., Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 749-756.
- Li, W., Du, W., Liu, D. (2007). Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45, 122-127.
- Li, z., Guo, S., Li, L., Cai, M. (2007). Effect of eletromagnétic field on the bacht cultivation and nutrional composition of *Spirulina platensis* in an air-lifth photobioreactor. *Bioresource Tecnology*,, 98, 700-705.
- Liu, Y. (2000). Preparation of high-activity whole-cell biocatalyst by permeabilization of recombinant yeasts with alcohol. *J. Biosci. Bioeng.*, 89, 554–558.
- Lopes, P., Borzani, W., Rodrigues, J., Ratusznei, S. (2010). Influência de campo magnético na fermentação alcoólica descontínua. *Braz. J. Food Technol.*, 13(1), 38-51.
- Maia, E. L. (1992). *Otimização de metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição em ácidos graxos e aminoácidos de peixes de água doce*. UNICAMP.
- Makri, A., Fakas, S. E., Aggelis, G. (2010). Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology*, 101, 2351–2358.
- Mehedintu, M., Berg, H. (1997). Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on eletromagnetic field parameters. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43, 67-70.

- Mitteenzwey, R., Submuth, R., Mei, W. (1996). Effect of extremely low-frequency electromagnetic field on bacteria – the question of a co-stressing factor. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40, 21-27.
- Morgunov, I., Kamzolova, S. (2011). *Yarrowia Lipolytica* Yeast Possesses An Atypical Catabolite expression. Book Abstract: Albany 2011 Conversation, 17, June 14-18 2011 Adenine Press (2010).
- Morgunov, I., Kamzolova, S., Perevoznikova, O., Shishkanova, N., Finogenova, T. (2004). Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.*, 39, 1469–1474.
- Morin, M., Monteoliva, L., Insenser, M., Gil, C., Dominguez, A. (2007). Proteomic analysis reveals metabolic changes during yeast to hypha transition in *Yarrowia lipolytica*. *J Mass Spectrom.*, 42(11), 1453–1462.
- Moreira, I., Júnior, M.M., Marcos, M., Furlan, A.C., Patricio, V.M.I., Oliveira, G.C. (2002). Uso da Levedura Seca por “Spray-Dry” como Fonte de Proteína para Suínos em Crescimento e Terminação. *R. Bras. Zootec.*, v.31, n.2, p.962-969.
- Muniz, J., Marcelino, M., Da Motta, M., Schuler, A., Da Motta, M. (2007). Influence of Static Magnetic Fields on *S. cerevisiae* Biomass Growth. *Brazilian Archives of Biology and Technology.*, 50(3), 515-520.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C. (1999). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (2nd ed.). Wiley-Interscience.
- Nakashima, T., Fukuda, H., Kyotani, S., Morikawa, H. (1988). Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. *J. Ferment. Technol.* 66, 441–448.
- Neumann, E. (2000). Digression on chemical electromagnetic field effects in membrane signal transduction — cooperativity paradigm of the acetylcholine receptor. *Bioelectrochemistry*, 52, 43–49.
- Novák, J., Strasák, L., Fojt, L., Slaninová, I., Vetterl, V. (2007). Effects of low-frequency magnetic fields on the viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*, 70, 115-121.

- Oda, M., Kaieda, M., Hama, S., Yamaji, H., Kondo, A., Izumoto, E., (2005). Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 23, 45–51.
- Oliveira, L., Costa, A. (2001). Biodiesel: uma experiência de desenvolvimento sustentável. IVIG/COPPE/UFRJ.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour. Technol.*, 82, 43–49.
- Papanikolaou, S., Ruiz-Sanchez, P., Pariset, B., Blanchard, F., Fick, M. (2000). High production of 1,3-propanediol from industrial by glycerol a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *J Biotechnol*, 77, 191-208.
- Parente, E. J. (2003). *Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado*. Unigráfica,, Fortaleza.
- Patrignani, F., Vannini, L., Gardini, F., Guerzoni, M., Lanciotti, R. (2011). Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* strains in pork fat. *Meat. Science*, 88, 689–693.
- Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Ye, H., Zeng, X. (2009). Novel and efficient method for immobilization and stabilization of d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 61(3–4), 208–215.
- Pereira, E. B., Zanin, G. M., Castro, H. F. (2003). Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20, 343 - 355.
- Pereira-Meirelles, F., Rocha-Leao, M., Sant'Anna, G. (2000). Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol Lett.*, 22, 71-75.
- Perez, V., Alvarez, D. C., Alegre, R. M., Justo, O. R. (2006). Effect of magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry*, 41, 967-1973.
- Perez, V., Reyes, A. F., Justo, O. R., Alvarez, D. C., Alegre, R. M. (2007). Bioreactor Coupled with Electromagnetic Field Generator: Effects of Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields on Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 23, 1091-1094.

- Perry R. H. Chilton, C.H. (1953) Chemical Engineers Handbook 5 ed. Editora Mcgraw-HILL Book Company.
- Potenza, L., Ubaldi, L., De Sanctis, R., De Bellis, R., Cucchiari, L., Dachà, M. (2004). Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 561, 53–62.
- Peters, M.S., Timmerhaus, K.D., West, R.E. (2003). Plant Design and Economics for Chemical Engineers, 5ed. 988 p.
- Queiroz, A., França, L., Ponte, M. (2012). The life cycle assessment of biodiesel from palm oil (“dendê”) in the Amazon. *Biomass and Bioenergy*, 36, 50–59.
- Quintero, J. A., Felix, E. R., Rincón, L. E., Crispín, M., Fernandez Baca, J., Khwaja, Y., (2012). Social and techno-economical analysis of biodiesel production in Peru. *Energy Policy*, 43, 427–435.
- Radhakrishnan, R., Kumari, B. (2012). Pulsed magnetic field: A contemporary approach offers to enhance plant growth and yield of soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 139-144.
- Ramírez-Verduzco, L. F., Rodríguez-Rodríguez, J., Jaramillo-Jacob, A. D. (2012). Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. *Fuel*, 91, 102-111.
- Reffatti, P., de Aguiar, C., & Barreto-Rodrigues, M. (2007). Estudo da bioconversão de resíduos agroindustriais lignocelulósicos por leveduras: produção e caracterização de proteína unicelular. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 1(1), 1-8.
- Richery, D., Lin, E. (1972). Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 12, 784–790.
- Rodriguez, M., Petitclerc, D., Burchard, J., Nguyen, D., Block, E., Downey, B. (2003). Responses of the estrous cycle in dairy cows exposed to electric and magnetic fields (60 Hz) during 8-h photoperiods. *Animal Reproduction Science*, 77, 11–20.
- Rostagno, O.S. (2011) Tabelas brasileira para aves e suínos – composição de alimentos e exigências nutricionais, 3ªed. Viçosa – MG.

- Ruiz-Gomez, M., Prieto-Barcia, M., Ristori-Bogajo, E., Martínez-Morillo, M. (2004). Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*, *64*, 151–155.
- Rywin´ Ska, A., Rymowicz, W., Z., Arowska, B., Wojtatowicz, M. (2009). Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* in fed-batch fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, *47*, 1-6.
- Sakai, S., Arai, H., Ishii, M., Igarashi, Y. (2009). Succinate production from glycerol with acetate as an electron sink. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *108*(1), 46.
- Sala, F. (1999). Magnetic fluids effect upon growth processes in plants. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* , *201*, 440-442.
- Salamatinia, B., Abdullah, A. Z., Bhatia, S. (2012). Quality evaluation of biodiesel produced through ultrasound-assisted heterogeneous catalytic system. *Fuel Processing Technology*, *97*, 1-8.
- Sanchez Toro, O., Cardona Alzate, C., Gutierrez Mosquera, L. (2007). Process integration possibilities for biodiesel production from palm oil using ethanol obtained from lignocellulosic residues of oil palm industry (Vol. v.100 fasc.3). Elsevier Applied Science.
- Santori, G., Di Nicola, G., Moglie, M., Polonara, F. (2012). A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. *Applied Energy.*, *9*, 109–132.
- Santos, J. C., Santos, I. M., Souza, A. G. (2005). Effect of heating and cooling on rheological parameters of edible vegetable oils. *Journal of Food Engineering*, , *67*(4), 401-405.
- Santos, L. O., Alegre, R., Garcia-Diego, C., Cuellar, J. (2010). Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, *45*(8), 1362–1367.
- Santos, L., Alegre, R., Garcia-Diego, C., Cuellar, J. (2010). Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry.*, *45*, 1362-1367.
- Santos., L. O. (2008). *Estudo da produção de glutatona a partir de Saccharomyces cerevisiae e avaliação da aplicação de campos*

- magnéticos durante as fermentações*. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.
- Sasson, A. (1989). *Las Biotecnologías: desafíos y promesas*.
- Selim, A.-F. H., & El-Nady, M. F. (2011). Physio-anatomical responses of drought stressed tomato plants to magnetic field. *Acta Astronautica*, 69, 387–396.
- Shreve R.N. Brink, J.A.J. (1977) *Industrias de Processos Químicos*. 4 ed. Editora Guanabara.
- Silalertruksa, T., Bonnet, S., Gheewala, S. (2011). Life cycle costing and externalities of palm oil biodiesel in Thailand. *Journal of Cleaner Production*.
- Sindirações. (2011). http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Aves_e_suinis/16RO/Boletim_Sindira%C3%A7%C3%B5es.pdf
- Soares, C. M., Castro, H. F., Moraes, F. F., Zanin, G. M. (1999). Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77/79, 745-757.
- Soares, C. M. F. de Castro, H. F. Santana, M. H. A. Zanin, G. M. (2002). Intensification of lipase performance for long term operation by immobilization on controlled pore silica in the presence of polyethylene glycol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Humana Press, v. 98/100, p. 863-874.
- Sobrinho, H.B. de S. (2007). Utilização de resíduos agroindustriais como substrato de baixo custo para a produção de biossurfactantes por *Candida sphaerica*. Dissertação de mestrado. Universidade Católica de Pernambuco. Recife.
- Sun, T., Du, W., & Liu, D. (2010). Lingmei DailImproved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production. *Process Biochemistry*, 45, 1192–1195.
- Sun, Y. Q., Qi, W. T., Teng, H., Xiu, Z. L., Zeng, A. P. (2008). Mathematical modeling of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Concerning enzyme-catalytic reductive pathway and transport of glycerol and 1,3-

- propanediol across cell membrane. *Biochemical Engineering Journal*, 38, 22-32.
- Szabo, R., Stofanikova, V. (2002). Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Lett*, 206, 45-50. .
- Teixeira, V. F. (2011). *Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel*. Universidade Estadual do Norte Fluminense,, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.
- Togashi, C.K., Fonseca, J.B., Soares, R. da T.R.N. Souza, C.L.M. (2002). Determinação de Níveis de Metionina+Cistina para Poedeiras Semi-pesadas Alimentadas com Rações contendo Levedura Seca (*Saccharomyces cerevisiae*). *R. Bras. Zootec.*, v.31, n.3, p.1426-1433
- Ulbrich, L., Tomazinho, P., Rupollo, M., Françoso, M., Netzel, A., Pontarolli, C., (2010). Prototype development to expose bacterial cultures to magnetic fields. *Perspect. Oral Sci*, 2.
- Vasdinyei, R., Deak, T. (2003). Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 123–130.
- Vendruscolo, F., Koch, F., Pitol, L., Ninow, L. (2007). Produção de proteína unicelular a partir do bagaço de maçã utilizando fermentação em estado sólido. *1(1)*, 53-57.
- Ward, O. (1989). *Biotecnologia de la fermentacion*. Zaragoza- España: Acribia S.A. pag. 112-121.
- Wu, L., Ge, G., e Wan, J. (2009). Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. *Journal of Environmental Sciences*, 21, 237-242.
- Yavuz, H., Celebi, S. (2000). Effects of magnetic field on activity of activated sludge in wastewater treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 22-27.
- Yazdani, S. S., Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry . *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 213-219.

- Young, D., Scharp, R., Cabezas, H. (2000). The waste reduction (WAR) algorithm: environmental impacts, energy consumption, and engineering economics. *Waste Management*, 20(8), 605–615.
- Zanutto, C.A., Moreira, I., Furlan, A.C., Scapinello, C., Murakami A.E. (1999). Utilização da levedura de recuperação (*Saccharomyces* sp.), seca por rolo rotativo ou por spray-dry, na alimentação de leitões na fase inicial. *Acta Scientiarum*, 21(3):705-710.
- Zhang, A., Yang, S. (2009). Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. *Biochemistry*, 44, 1346-1351.
- Zhang, G., Ma, B., Xu, X., Li, C., Wang, L. (2007). Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 256-260.
- Zhu, Y., Li, J., Tan, M., Liu, L., Jiang, L., Sun, J., (2010). Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. *Bioresource Technology*, 101, 8902-8906.

APÊNDICE A

APÊNDICE A I-XV. Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 0,4; 0,820; 1,235; 1,60; 1,97; 2,32; 2,64; 3,02; 3,35; 4,16; 4,34; 4,52; 5,71; 6,06; 7,05; 7,27; 8,00; 10,00, 12,00 A.

Tabela A-I. Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 0,4 A (posição do variac 1- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	0,397	0,451	0,456	0,452	0,437	0,397	0,446
	0,490	0,468	0,534	0,507	0,431	0,488	0,588
	0,227	0,261	0,474	0,568	0,347	0,259	0,287
	0,017	0,079	0,141	0,064	0,037	0,082	0,114
	0,198	0,102	0,305	0,592	0,228	0,115	0,068
	0,486	0,411	0,273	0,400	0,364	0,346	0,360
	0,406	0,370	0,436	0,367	0,369	0,313	0,289
1	0,435	0,413	0,389	0,384	0,369	0,373	0,408
	0,429	0,394	0,376	0,292	0,381	0,406	0,501
	0,177	0,208	0,303	0,355	0,262	0,234	0,280
	0,019	0,028	0,065	0,056	0,033	0,067	0,091
	0,214	0,177	0,232	0,254	0,161	0,106	0,115
	0,393	0,329	0,324	0,282	0,279	0,259	0,316
	0,460	0,325	0,298	0,288	0,280	0,285	0,331
2	0,402	0,365	0,331	0,322	0,344	0,336	0,370
	0,339	0,316	0,244	0,309	0,329	0,395	0,395
	0,131	0,174	0,180	0,201	0,221	0,230	0,240
	0,012	0,010	0,026	0,020	0,035	0,068	0,071
	0,171	0,165	0,138	0,123	0,116	0,087	0,093
	0,307	0,275	0,240	0,219	0,215	0,232	0,281
	0,286	0,288	0,253	0,220	0,242	0,234	0,269
3	0,401	0,352	0,325	0,314	0,293	0,336	0,256
	0,301	0,276	0,280	0,228	0,293	0,326	0,408
	0,138	0,142	0,162	0,183	0,195	0,231	0,248
	0,012	0,011	0,026	0,041	0,057	0,077	0,080
	0,141	0,153	0,106	0,100	0,088	0,076	0,072
	0,249	0,242	0,216	0,194	0,204	0,215	0,276
	0,279	0,276	0,229	0,205	0,207	0,227	0,258
4	0,389	0,358	0,326	0,321	0,331	0,338	0,361
	0,348	0,317	0,300	0,307	0,318	0,336	0,403
	0,153	0,156	0,210	0,214	0,212	0,231	0,252
	0,026	0,005	0,030	0,039	0,064	0,077	0,078
	0,146	0,151	0,150	0,102	0,095	0,099	0,076
	0,200	0,237	0,237	0,204	0,195	0,242	0,297
	0,299	0,311	0,236	0,230	0,215	0,240	0,296
5	0,381	0,407	0,354	0,361	0,333	0,384	0,387
	0,397	0,358	0,364	0,340	0,328	0,374	0,452
	0,179	0,222	0,281	0,288	0,236	0,251	0,253
	0,015	0,049	0,066	0,068	0,070	0,073	0,060
	0,136	0,187	0,084	0,168	0,121	0,108	0,106
	0,322	0,263	0,245	0,278	0,236	0,272	0,327
	0,337	0,357	0,277	0,280	0,237	0,249	0,316
6	0,339	0,378	0,424	0,415	0,402	0,421	0,450
	0,387	0,453	0,407	0,436	0,409	0,432	0,384
	0,237	0,317	0,325	0,467	0,195	0,212	0,222
	0,042	0,066	0,100	0,121	0,019	0,036	0,056
	0,116	0,180	0,197	0,383	0,221	0,153	0,127
	0,351	0,309	0,376	0,385	0,324	0,362	0,370
	0,409	0,320	0,363	0,317	0,244	0,282	0,275

Tabela A-II. Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 0,820 A (posição do variac 2- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	0,801	0,790	0,748	0,804	0,792	0,854	0,840
	0,927	0,937	0,840	0,889	0,864	0,976	1,216
	0,502	0,546	0,639	0,927	0,567	0,577	0,353
	0,076	0,103	0,114	0,116	0,157	0,139	0,072
	0,282	0,363	0,571	0,600	0,324	0,319	0,278
	0,772	0,774	0,826	0,702	0,629	0,764	0,793
	0,671	0,392	0,721	0,704	0,702	0,787	0,659
1	0,918	0,735	0,714	0,671	0,646	0,747	0,747
	0,801	0,689	0,716	0,666	0,672	0,817	1,046
	0,327	0,389	0,483	0,532	0,476	0,493	0,563
	0,018	0,046	0,061	0,074	0,086	0,113	0,108
	0,320	0,334	0,344	0,339	0,310	0,219	0,289
	0,649	0,663	0,509	0,538	0,563	0,574	0,772
	0,696	0,615	0,568	0,548	0,556	0,637	0,719
2	0,809	0,659	0,598	0,594	0,584	0,624	0,684
	0,671	0,549	0,528	0,502	0,558	0,725	0,811
	0,254	0,328	0,343	0,357	0,364	0,415	0,303
	0,024	0,002	0,014	0,053	0,075	0,109	0,136
	0,310	0,325	0,246	0,230	0,224	0,222	0,206
	0,578	0,536	0,424	0,435	0,460	0,540	0,681
	0,607	0,550	0,476	0,450	0,485	0,573	0,643
3	0,754	0,622	0,579	0,550	0,589	0,635	0,672
	0,465	0,504	0,465	0,468	0,509	0,654	0,802
	0,311	0,303	0,259	0,307	0,337	0,371	0,467
	0,010	0,021	0,016	0,008	0,064	0,084	0,108
	0,298	0,281	0,239	0,212	0,246	0,235	0,229
	0,486	0,491	0,398	0,387	0,452	0,531	0,596
	0,571	0,524	0,450	0,438	0,433	0,558	0,635
4	0,802	0,637	0,559	0,582	0,603	0,623	0,660
	0,489	0,514	0,506	0,502	0,538	0,655	0,807
	0,248	0,289	0,293	0,334	0,347	0,439	0,485
	0,024	0,005	0,053	0,046	0,055	0,078	0,123
	0,302	0,284	0,286	0,283	0,271	0,245	0,242
	0,540	0,531	0,476	0,460	0,485	0,568	0,681
	0,609	0,536	0,484	0,483	0,482	0,597	0,667
5	0,855	0,719	0,674	0,634	0,659	0,721	0,710
	0,550	0,660	0,553	0,605	0,632	0,710	0,954
	0,276	0,374	0,399	0,432	0,423	0,489	0,431
	0,012	0,047	0,028	0,036	0,050	0,095	0,066
	0,281	0,295	0,414	0,355	0,300	0,322	0,338
	0,614	0,623	0,576	0,596	0,585	0,665	0,794
	0,691	0,603	0,551	0,475	0,563	0,649	0,686
6	0,584	0,802	0,765	0,757	0,723	0,801	0,914
	0,334	0,699	0,719	0,710	0,716	0,761	1,186
	0,312	0,310	0,536	0,647	0,430	0,380	0,363
	0,064	0,056	0,059	0,073	0,088	0,035	0,124
	0,308	0,454	0,556	0,648	0,363	0,324	0,359
	0,771	0,852	0,857	0,790	0,762	0,881	0,804
	0,605	0,740	0,631	0,666	0,641	0,691	0,558

Tabela A-III. Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 1,235 A (posição do variac 3- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	1,257	1,122	1,165	1,126	1,049	1,262	1,350
	1,161	1,345	1,289	1,335	1,297	1,481	1,832
	0,552	0,722	1,043	1,509	1,002	0,765	0,320
	0,031	0,078	0,272	1,333	0,354	0,224	0,322
	0,527	0,641	0,820	0,921	0,446	0,369	0,235
	1,523	1,344	1,196	1,210	1,093	0,162	1,124
	1,210	1,077	1,209	1,223	1,223	1,330	1,025
1	1,327	1,070	1,001	0,924	0,953	1,103	1,147
	1,068	0,975	0,947	0,984	0,995	1,161	1,533
	0,464	0,559	0,710	0,808	0,765	0,643	0,754
	0,014	0,045	0,231	0,251	0,207	0,208	0,126
	0,715	0,669	0,572	0,553	0,416	0,412	0,264
	1,075	1,044	0,931	0,902	0,889	0,970	1,011
	1,165	0,956	0,928	0,900	0,966	1,051	1,167
2	1,172	0,937	0,857	0,836	0,870	0,914	1,076
	0,758	0,786	0,757	0,722	0,790	0,981	1,295
	0,264	0,400	0,464	0,502	0,567	0,632	0,666
	0,178	0,057	0,022	0,074	0,095	0,129	0,124
	0,576	0,495	0,451	0,403	0,386	0,371	0,367
	0,878	0,866	0,734	0,729	0,746	0,855	1,057
	0,909	0,854	0,799	0,777	0,830	0,962	1,093
3	1,042	0,904	0,800	0,772	0,810	0,905	1,036
	0,811	0,743	0,658	0,671	0,761	0,942	1,034
	0,355	0,427	0,380	0,406	0,467	0,545	0,660
	0,076	0,011	0,012	0,032	0,066	0,123	0,123
	0,607	0,411	0,425	0,381	0,373	0,351	0,331
	0,786	0,843	0,718	0,689	0,720	0,858	1,007
	0,858	0,839	0,764	0,749	0,808	0,939	1,153
4	1,195	0,957	0,844	0,802	0,857	0,933	1,054
	0,940	0,475	0,706	0,691	0,798	0,972	1,360
	0,412	0,490	0,446	0,444	0,534	0,588	0,671
	0,042	0,023	0,014	0,021	0,067	0,123	0,110
	0,649	0,481	0,497	0,482	0,458	0,437	0,425
	0,909	0,891	0,773	0,706	0,768	0,917	1,133
	0,967	0,878	0,807	0,753	0,833	0,993	1,218
5	1,226	1,052	0,959	0,910	0,956	1,030	1,180
	1,146	0,908	0,858	0,851	0,985	1,130	1,548
	0,597	0,554	0,553	0,637	0,657	0,652	0,708
	0,080	0,018	0,039	0,037	0,126	0,126	0,088
	0,534	0,571	0,651	0,636	0,536	0,447	0,467
	1,131	1,019	0,943	0,916	0,996	1,023	1,231
	1,077	1,063	0,910	0,866	0,886	1,028	1,325
6	1,146	1,130	1,068	1,081	0,187	1,258	1,220
	1,247	1,149	1,115	1,132	1,188	1,268	1,493
	0,577	0,617	0,849	1,074	0,732	0,561	0,528
	0,010	0,028	0,124	0,234	0,115	0,099	0,037
	0,682	0,653	0,712	0,836	0,626	0,579	0,432
	1,053	1,171	1,216	1,238	1,275	1,376	1,399
	1,131	1,110	1,191	0,679	0,386	0,973	1,111

Tabela A-IV. Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 1,60 A (posição do variac 4- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	1,848	1,534	1,446	1,379	1,513	1,632	1,434
	1,862	1,741	1,680	1,603	1,652	1,701	2,417
	0,946	1,097	1,449	1,656	0,843	0,936	1,017
	0,093	0,134	0,527	0,118	0,122	0,161	0,216
	0,647	0,672	0,941	1,253	0,767	0,660	0,514
	1,849	1,643	1,441	1,634	1,457	1,641	1,483
	1,219	1,463	1,436	1,514	1,611	1,675	2,034
1	1,736	1,446	1,286	1,242	1,276	1,374	1,396
	1,517	1,269	1,254	1,211	1,268	1,489	1,876
	0,686	0,777	0,824	0,848	0,820	0,877	0,972
	0,050	0,048	0,036	0,039	0,093	0,053	0,240
	0,694	0,710	0,715	0,843	0,631	0,628	0,396
	1,376	1,242	1,138	1,139	1,138	1,313	1,746
	1,468	1,264	1,137	1,164	1,227	1,474	1,352
2	1,532	1,248	1,122	1,086	1,137	1,220	1,407
	1,224	0,940	0,922	0,033	1,044	1,272	1,686
	0,563	0,536	0,589	0,525	0,651	0,742	0,888
	0,025	0,033	0,023	0,016	0,040	0,107	0,148
	0,718	0,611	0,531	0,522	0,497	0,507	0,487
	1,249	1,090	0,959	0,927	0,361	1,100	1,285
	1,257	1,033	1,026	0,985	1,038	1,329	1,568
3	1,465	1,193	1,077	1,035	1,063	1,158	1,299
	1,203	0,904	0,853	0,890	0,967	1,213	1,590
	0,582	0,516	0,524	0,589	0,520	0,718	0,954
	0,015	0,039	0,025	0,053	0,078	0,135	0,213
	0,627	0,615	0,539	0,488	0,487	0,528	0,411
	1,176	1,057	0,934	0,874	0,353	1,095	1,296
	1,177	1,022	0,979	0,968	1,119	1,298	1,349
4	1,525	1,250	1,128	1,069	1,033	1,203	1,344
	1,247	0,999	0,878	0,899	0,963	1,258	1,633
	0,667	0,619	0,607	0,642	0,647	0,772	0,900
	0,013	0,016	0,058	0,145	0,080	0,162	0,186
	0,669	0,669	0,540	0,547	0,549	0,575	0,540
	1,286	1,134	0,932	0,956	1,005	1,193	1,391
	1,262	1,080	1,027	0,965	1,138	1,365	1,639
5	1,728	1,324	1,248	1,214	1,176	1,347	1,527
	1,465	1,198	1,183	1,113	1,229	1,426	1,876
	0,775	0,686	0,964	1,047	0,862	0,838	0,996
	0,089	0,049	0,313	0,335	0,225	0,211	0,133
	0,661	0,756	0,633	0,743	0,694	0,550	0,639
	1,485	1,363	1,208	1,209	1,297	1,351	1,579
	1,510	1,271	1,176	1,107	1,305	1,422	1,727
6	1,506	1,545	1,470	1,354	1,498	1,486	1,777
	1,632	1,451	1,484	1,315	1,507	1,685	2,005
	0,748	0,867	1,145	1,486	0,970	0,725	0,563
	0,107	0,029	0,150	0,878	0,076	0,202	0,032
	0,691	0,830	0,995	1,099	0,825	0,655	0,767
	1,692	1,645	1,592	1,572	1,714	1,621	1,956
	1,580	1,597	1,072	1,136	1,669	1,635	1,309

Tabela A-V Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 2,640 A (posição do variac 7- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	2,720	2,353	2,350	2,147	2,292	2,449	2,407
	2,740	2,839	2,777	2,748	2,473	2,892	3,940
	1,250	1,223	1,872	2,210	1,685	1,540	1,504
	0,045	0,041	0,305	0,233	0,367	0,437	0,347
	1,149	1,182	1,572	2,152	1,357	0,997	0,658
	3,350	2,691	2,668	2,536	2,421	2,558	2,635
	2,670	2,773	2,343	2,331	2,532	2,596	3,150
1	2,891	2,357	2,066	1,986	2,012	2,206	2,329
	2,445	2,073	1,896	1,995	1,972	2,335	3,110
	0,982	1,105	1,162	1,462	1,264	1,457	1,681
	0,214	0,092	0,064	0,033	0,163	0,377	0,395
	1,256	1,386	1,300	1,359	1,002	0,712	0,650
	2,579	2,214	1,835	1,922	1,831	2,021	2,387
	2,464	2,155	1,892	1,841	1,956	2,333	2,856
2	2,596	2,040	1,808	1,733	1,755	1,964	2,124
	1,659	1,702	1,568	1,486	1,650	2,023	2,779
	0,621	0,825	0,953	0,938	1,030	1,209	1,461
	0,251	0,172	0,021	0,068	0,166	0,325	0,240
	1,306	1,102	0,979	0,986	0,832	0,852	0,716
	2,097	1,782	1,574	1,524	1,509	1,714	2,129
	2,171	1,783	1,717	1,581	1,713	2,064	2,513
3	2,234	1,969	1,708	1,640	1,705	1,845	2,120
	1,657	1,444	1,387	1,357	1,499	1,885	2,361
	0,758	0,783	0,807	0,803	0,967	1,157	1,502
	0,217	0,149	0,029	0,025	0,129	0,226	0,356
	1,292	1,069	0,883	0,803	0,780	0,775	0,820
	2,010	1,738	1,489	1,406	1,497	1,690	2,132
	1,975	1,727	1,673	1,539	1,730	2,181	2,543
4	2,520	2,051	1,786	1,708	1,762	1,929	2,149
	1,927	1,486	1,408	1,407	1,636	2,031	2,698
	0,872	0,768	0,876	0,893	1,069	1,183	1,475
	0,104	0,132	0,036	0,085	0,069	0,204	0,396
	1,188	1,088	0,997	0,921	0,852	0,893	0,848
	2,070	1,880	1,632	1,605	1,639	1,867	2,439
	1,975	1,727	1,673	1,590	1,730	2,181	2,543
5	2,733	2,276	2,044	1,903	1,946	2,141	2,469
	2,261	1,865	1,781	1,742	1,834	2,307	2,714
	0,961	1,049	1,268	1,210	1,148	1,425	1,435
	0,067	0,030	0,099	0,179	0,148	0,268	0,200
	1,126	1,236	1,162	1,317	1,206	0,891	0,864
	2,362	2,174	1,935	1,947	2,047	2,156	2,644
	2,243	1,986	1,745	1,836	2,074	2,240	2,720
6	2,389	2,552	2,383	2,288	2,387	2,602	2,808
	2,521	2,407	2,274	2,176	2,246	2,539	2,630
	1,121	0,971	1,566	1,893	1,384	1,267	1,254
	0,030	0,104	0,180	0,084	0,034	0,056	0,114
	1,344	1,451	1,424	1,904	1,312	1,154	0,879
	2,625	2,808	2,489	2,548	2,308	2,891	2,612
	2,132	1,162	1,518	1,968	2,325	2,399	2,006

Tabela A-VI. Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 3,020 A (posição do variac 8- sistema ligado em 220V).

X, Y, $Z_{i=0}^6$	0	1	2	3	4	5	6
0	3,030	2,843	2,549	2,690	2,564	2,878	2,782
	3,280	3,150	3,060	2,947	2,972	3,330	4,440
	1,301	1,618	2,131	2,920	1,890	1,592	1,858
	0,071	0,191	0,660	0,108	0,505	0,540	0,601
	1,152	1,293	1,474	2,483	1,361	1,105	0,149
	3,420	2,950	2,699	2,918	2,533	2,712	2,748
	1,964	3,040	2,858	2,816	3,090	3,010	3,630
1	3,350	2,591	2,334	2,237	2,277	2,411	2,732
	2,445	2,227	2,206	2,186	2,302	2,619	3,490
	1,701	1,384	1,558	1,756	1,486	1,741	1,864
	0,177	0,034	0,136	0,241	0,181	0,370	0,654
	1,394	1,269	1,330	1,279	1,149	0,828	0,726
	3,000	2,412	2,117	2,161	2,114	2,196	2,566
	2,941	2,327	2,182	2,082	2,253	2,623	3,110
2	2,920	2,257	2,023	1,979	2,054	2,174	2,446
	2,290	1,742	1,721	1,667	1,866	2,282	3,020
	1,073	1,001	1,092	1,111	1,145	1,582	1,732
	0,158	0,044	0,027	0,060	0,201	0,377	0,327
	1,334	1,099	1,051	1,004	0,953	0,795	0,967
	2,356	2,031	1,769	1,696	1,750	2,065	2,360
	2,520	2,015	1,902	1,760	1,974	2,361	2,878
3	2,655	2,163	1,998	1,885	1,933	2,133	2,427
	2,128	1,625	1,546	1,538	1,761	2,171	2,597
	1,068	0,944	0,947	0,986	1,065	1,392	1,720
	0,068	0,038	0,034	0,043	0,074	0,212	0,394
	1,244	1,124	0,972	0,926	0,875	0,966	0,793
	2,204	1,899	1,687	1,608	1,729	2,002	2,581
	2,387	1,946	1,794	1,694	1,883	2,242	2,727
4	2,908	2,269	1,992	1,969	2,010	2,140	2,450
	2,201	1,753	1,690	1,618	1,878	2,336	3,130
	1,117	1,121	1,093	1,047	1,145	1,404	1,707
	0,060	0,069	0,218	0,118	0,090	0,158	0,472
	1,269	1,191	1,073	1,074	1,052	0,933	0,999
	2,474	2,137	1,877	1,807	1,901	2,147	2,797
	2,563	1,980	1,887	1,864	2,056	2,375	2,831
5	3,220	2,531	2,294	2,243	2,229	2,485	2,697
	2,482	2,268	2,074	2,004	2,352	2,841	3,670
	1,242	1,541	1,703	1,554	1,497	1,530	1,682
	0,089	0,287	0,264	0,298	0,140	0,339	0,226
	1,484	1,295	1,310	1,230	1,324	1,133	1,034
	2,937	2,508	2,136	2,162	2,431	2,637	3,140
	2,432	2,075	2,172	2,294	1,976	2,716	2,810
6	2,300	2,935	2,741	2,381	2,606	2,594	2,727
	2,983	2,603	2,509	2,484	2,804	2,960	4,360
	1,668	1,451	1,905	2,493	1,793	1,607	1,607
	0,356	0,218	0,197	0,265	0,149	0,531	0,145
	1,160	1,504	1,716	2,170	1,402	1,128	0,949
	3,230	2,988	2,790	2,950	2,837	2,777	2,855
	1,724	2,128	2,360	2,283	1,522	2,238	1,169

Tabela A-VII Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 3,350 A (posição do variac 9- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	3,450	3,140	3,070	2,907	2,796	3,310	2,894
	3,330	3,130	3,010	3,310	3,250	3,600	4,670
	1,563	1,422	3,036	3,020	1,919	2,127	2,190
	0,356	0,098	0,139	2,760	0,138	0,621	0,620
	0,980	1,825	1,900	2,251	1,617	0,847	1,096
	3,830	3,560	3,270	2,908	3,220	2,746	3,460
	2,962	3,410	3,000	2,900	3,250	3,290	3,500
1	3,630	2,814	2,591	2,430	2,428	2,940	2,938
	2,924	2,451	2,417	2,470	2,447	2,990	3,880
	1,213	1,424	1,632	1,946	1,772	1,836	2,115
	0,196	0,079	0,075	0,233	0,166	0,389	0,400
	1,577	1,371	1,490	1,941	1,232	0,820	0,787
	3,200	2,660	2,349	2,287	2,464	2,529	2,759
	2,900	2,623	2,329	2,318	2,447	2,920	3,650
2	3,210	2,563	2,244	2,154	2,196	2,478	2,813
	2,405	1,976	1,809	1,782	2,060	2,564	3,360
	1,062	1,077	1,041	1,158	1,346	1,661	2,008
	0,133	0,115	0,056	0,073	0,180	0,349	0,455
	1,478	1,345	1,204	1,076	0,986	1,064	0,974
	2,673	2,277	2,008	1,881	1,951	2,214	2,856
	2,811	2,227	2,089	2,025	2,158	2,430	3,100
3	2,916	2,424	2,108	2,010	2,140	2,373	2,678
	2,265	1,844	1,658	1,675	1,899	2,433	3,270
	1,083	1,013	0,983	1,067	1,221	1,488	1,794
	0,102	0,109	0,096	0,024	0,164	0,245	0,196
	1,502	1,322	1,153	1,025	0,992	1,079	0,860
	2,583	2,163	1,903	1,811	1,918	2,208	2,586
	2,496	1,903	2,004	1,965	2,099	2,284	2,767
4	3,140	2,519	2,177	2,098	2,244	2,439	2,708
	2,522	1,979	1,803	1,877	1,938	2,547	3,080
	1,341	1,031	1,097	1,265	1,377	1,593	2,006
	0,054	0,136	0,062	0,107	0,144	0,203	0,432
	1,553	1,482	1,285	1,141	1,149	1,240	0,946
	2,762	2,292	2,085	1,946	2,098	2,502	2,718
	2,336	2,215	2,094	2,119	2,086	2,581	3,340
5	3,420	2,970	2,487	2,376	2,416	2,775	2,906
	2,826	2,322	2,436	2,432	2,519	3,150	3,540
	1,300	1,363	1,072	1,970	1,853	1,671	1,818
	0,078	0,246	0,231	0,498	0,260	0,172	0,298
	1,823	1,642	1,789	1,606	1,370	1,369	1,119
	3,080	2,834	2,654	2,385	2,560	3,010	3,480
	2,727	2,611	2,491	2,363	2,587	2,940	2,734
6	2,904	2,759	2,880	2,743	2,896	3,030	3,330
	3,420	2,982	2,797	2,847	2,620	3,230	4,810
	1,916	1,648	1,981	2,716	1,654	1,635	1,533
	0,127	0,037	0,521	2,297	0,244	0,267	0,079
	1,463	1,835	1,766	1,935	1,521	1,401	1,650
	3,500	3,330	2,882	2,960	3,400	3,870	3,470
	2,637	2,974	2,545	2,500	2,326	2,329	2,163

Tabela A-VIII. Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 4,160 A (posição do variac 10- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	3,670	3,930	3,670	3,680	2,780	3,610	3,410
	4,120	4,150	4,090	4,120	4,080	4,230	5,150
	1,510	2,197	2,870	3,770	2,440	2,370	2,670
	0,330	0,250	0,647	0,294	0,170	0,086	0,619
	1,523	1,830	2,485	2,927	1,840	1,852	1,179
	4,270	4,160	3,760	4,130	3,420	3,940	3,970
	3,700	4,630	3,660	3,880	4,100	4,310	4,240
1	4,540	3,520	3,150	3,100	3,230	3,270	3,420
	3,430	3,160	3,020	2,950	3,250	3,670	4,880
	1,665	1,871	2,297	2,430	1,799	2,290	2,670
	0,077	0,189	0,695	0,214	0,343	0,480	0,550
	1,778	1,715	1,609	1,819	1,537	1,350	1,200
	3,440	3,180	2,890	2,730	2,873	3,070	3,640
	4,030	3,250	2,920	2,900	3,070	3,350	3,930
2	3,990	3,190	2,790	2,663	2,779	2,991	3,230
	2,780	2,399	2,278	2,268	2,516	3,080	4,160
	1,428	1,421	1,419	1,311	1,522	1,994	2,540
	0,058	0,034	0,086	0,078	0,065	0,410	0,664
	1,728	1,717	1,356	1,353	1,425	1,297	1,118
	3,400	2,819	2,418	2,372	2,507	2,742	3,000
	3,380	2,827	2,636	2,557	2,750	2,946	3,490
3	3,750	3,040	2,630	2,561	2,556	2,900	3,160
	2,720	2,224	2,071	2,097	2,339	2,980	3,850
	1,323	1,231	1,227	1,217	1,299	1,904	2,530
	0,061	0,124	0,026	0,062	0,015	0,390	0,659
	1,808	1,636	1,427	1,335	1,431	1,146	1,093
	3,270	2,711	2,332	2,283	2,425	2,795	2,980
	3,370	2,785	2,459	2,498	2,571	2,912	3,390
4	3,960	3,080	2,751	2,590	2,762	3,050	3,230
	2,950	2,450	2,176	2,215	2,616	3,200	3,990
	1,538	1,341	1,357	1,456	1,600	1,978	2,540
	0,080	0,188	0,146	0,095	0,105	0,414	0,516
	1,874	1,839	1,661	1,620	1,419	1,169	1,152
	3,480	2,989	0,260	2,523	2,481	2,807	3,160
	3,000	2,785	2,664	2,664	2,824	2,949	3,710
5	4,380	3,580	3,190	3,150	3,070	3,350	3,730
	3,470	3,040	2,840	2,790	3,030	3,350	4,830
	1,351	1,632	2,060	2,049	1,883	1,920	2,540
	0,252	0,034	0,320	0,079	0,216	0,244	0,303
	1,797	2,115	2,290	2,019	1,530	1,438	1,576
	3,890	3,570	3,270	3,000	2,960	3,390	3,950
	2,444	2,740	2,543	2,733	3,060	3,530	4,270
6	3,650	3,770	3,540	3,560	3,760	4,020	4,150
	3,920	3,650	3,140	3,460	3,100	3,900	5,780
	2,079	1,939	2,570	3,440	1,668	1,522	1,702
	0,221	0,022	0,391	0,153	0,377	0,256	0,269
	1,508	2,452	2,237	2,800	1,914	1,720	1,408
	4,010	4,270	3,980	4,140	3,640	4,560	3,920
	3,510	2,465	2,520	3,010	3,120	3,440	2,370

Tabela A-IX. Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 4,345 A (posição do variac 11- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	4,330	4,040	3,730	3,740	3,830	3,850	3,920
	4,100	4,630	4,270	4,180	4,200	4,810	6,200
	2,050	2,240	2,980	3,730	2,780	2,570	2,560
	0,022	0,012	0,084	1,670	0,071	0,049	0,082
	2,000	1,780	2,240	3,020	1,740	1,330	1,010
	4,910	4,290	4,190	4,090	3,580	3,650	4,290
	4,490	4,440	4,060	3,770	4,220	4,440	4,390
1	4,660	3,660	3,280	3,110	3,220	3,350	3,410
	3,510	3,210	3,160	2,980	3,210	3,770	4,850
	1,190	1,840	2,060	2,330	2,160	2,300	2,530
	0,024	0,011	0,030	0,021	0,060	0,063	0,072
	2,070	1,850	1,920	1,810	1,470	1,230	1,060
	3,970	3,430	2,930	3,000	2,980	3,070	3,600
	3,680	3,970	3,060	3,080	3,190	3,700	4,590
2	4,190	3,230	2,850	2,790	2,800	3,150	3,210
	2,900	2,510	2,400	2,310	2,570	3,170	4,050
	1,230	1,450	1,480	1,510	1,480	1,900	2,360
	0,037	0,016	0,005	0,007	0,020	0,027	0,044
	2,030	1,690	1,630	1,480	1,420	1,180	0,096
	3,380	2,950	2,510	2,480	2,540	2,970	3,410
	3,320	3,010	2,780	2,700	2,830	3,270	4,120
3	3,780	3,110	2,690	2,610	2,730	2,970	3,260
	2,420	2,370	2,200	2,120	2,380	3,010	3,720
	1,360	1,290	1,130	1,280	1,380	1,750	2,250
	0,021	0,015	0,016	0,004	0,006	0,020	0,039
	1,970	1,630	1,500	1,450	1,400	1,370	1,190
	3,310	2,800	2,460	2,380	2,490	2,850	3,400
	3,340	2,900	2,660	2,610	2,730	3,210	4,010
4	3,940	3,220	2,780	2,35	2,580	3,210	4,260
	3,010	2,420	2,280	2,350	2,580	3,210	4,260
	1,410	1,430	1,360	1,500	1,470	1,940	2,380
	0,036	0,003	0,017	0,004	0,010	0,018	0,038
	1,980	1,740	1,760	1,720	1,520	1,440	1,430
	3,470	3,000	2,780	2,590	2,780	3,080	3,720
	3,360	3,030	2,780	2,710	2,810	3,290	4,180
5	4,490	3,580	3,270	3,030	3,210	3,330	3,690
	3,420	3,170	2,870	2,930	3,180	3,910	4,770
	1,610	1,920	2,070	2,100	1,830	2,080	2,180
	0,025	0,013	0,014	0,011	0,018	0,040	0,067
	2,260	2,130	2,190	2,330	2,640	1,640	1,340
	3,830	3,730	3,540	3,350	3,430	3,680	3,980
	3,680	3,370	3,110	3,210	2,840	3,720	4,310
6	3,680	3,750	3,590	3,450	3,600	3,780	4,180
	4,200	3,680	3,710	3,810	3,680	4,290	6,000
	1,630	2,380	3,120	3,680	1,930	1,850	1,800
	0,026	0,026	0,006	0,082	0,050	0,057	00,065
	2,030	2,090	2,790	3,290	2,120	1,830	4,330
	4,250	4,440	3,560	4,110	4,050	4,450	4,160
	3,060	3,000	3,070	2,430	3,420	2,300	2,320

Tabela A-X. Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 4,525 A (posição do variac 12- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	4,680	4,260	4,220	4,060	4,000	4,140	4,120
	4,740	4,050	4,200	4,440	4,250	5,030	6,090
	1,750	2,400	3,350	4,080	2,470	2,670	2,760
	0,011	0,014	0,032	2,860	0,008	0,030	0,051
	2,040	2,050	0,780	3,340	2,400	1,950	1,340
	4,680	4,630	4,520	3,810	4,200	4,340	4,680
	4,222	4,430	4,280	3,940	4,060	4,380	4,650
1	4,370	3,870	3,480	3,360	3,350	3,500	3,720
	3,720	3,490	3,260	3,280	3,310	3,800	4,960
	1,840	1,930	2,370	2,500	2,410	2,430	2,980
	0,007	0,023	0,018	0,017	0,028	0,039	0,063
	2,060	1,950	2,030	2,260	1,840	1,530	1,360
	3,940	3,470	3,110	3,210	3,120	3,420	4,140
	3,830	3,520	3,300	3,230	3,360	3,780	4,080
2	3,880	3,360	3,010	2,920	3,000	3,220	3,570
	3,120	2,650	2,470	2,550	2,660	3,350	4,510
	1,300	1,520	1,400	1,550	1,650	2,030	2,590
	0,010	0,005	0,009	0,001	0,026	0,031	0,057
	1,880	1,840	1,690	1,540	1,510	1,480	1,450
	3,350	3,030	2,730	2,630	2,730	3,100	3,710
	3,690	2,910	2,860	2,860	2,940	3,280	3,760
3	3,660	3,280	2,830	2,760	2,830	3,180	3,500
	2,730	2,460	2,220	2,280	2,540	3,160	3,860
	1,300	1,300	1,280	1,290	1,500	1,980	2,430
	0,017	0,003	0,014	0,006	0,015	0,032	0,041
	1,890	1,680	1,590	1,460	1,430	1,350	1,450
	2,480	2,970	2,590	2,530	2,610	2,970	4,060
	3,410	2,810	2,820	2,740	2,920	3,230	3,760
4	3,930	3,440	2,970	2,860	2,960	3,280	3,750
	2,980	2,620	2,390	2,430	2,750	2,090	4,620
	1,420	1,520	1,360	1,510	1,770	2,110	2,610
	0,023	0,026	0,017	0,004	0,015	0,029	0,042
	2,030	1,870	1,840	1,730	1,620	1,450	1,650
	3,550	3,290	2,950	2,830	2,970	3,300	4,140
	3,280	3,110	2,960	2,930	3,130	3,930	3,150
5	4,400	3,880	3,390	3,180	3,250	3,610	3,993
	3,620	3,310	3,050	3,330	3,370	4,170	5,300
	1,780	2,140	2,180	3,640	2,310	2,390	3,150
	0,004	0,008	0,024	0,048	0,055	0,024	0,072
	2,300	1,990	2,180	2,260	1,880	1,900	0,133
	4,130	4,000	3,550	3,580	3,700	4,150	0,170
	3,610	3,630	3,490	3,400	3,600	3,960	4,770
6	3,680	3,720	3,800	3,630	4,020	4,460	4,680
	4,340	4,140	3,640	3,660	3,520	4,370	6,090
	2,010	2,450	3,170	3,470	2,400	1,900	2,450
	0,028	0,011	0,050	1,250	0,030	0,024	0,050
	2,480	2,660	2,440	3,060	2,290	2,470	1,530
	4,200	4,740	3,970	4,340	4,530	4,960	3,970
	2,070	2,330	3,220	2,700	4,000	4,060	3,290

Tabela A-XI Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 5,715 A (posição do variac 14- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	5,920	5,270	5,050	4,880	5,120	5,710	5,210
	6,020	5,810	5,260	5,360	5,370	5,860	7,670
	2,830	2,890	4,090	4,880	3,400	3,160	3,400
	0,033	0,028	0,061	2,120	0,073	0,074	1,140
	2,540	2,310	2,760	4,430	2,020	1,680	0,084
	7,010	5,630	5,570	4,830	4,390	5,410	5,310
	5,530	5,710	5,270	5,110	5,230	5,720	7,000
1	6,080	4,810	4,200	4,010	4,130	4,450	4,680
	4,930	4,320	3,750	3,860	4,140	4,910	6,300
	1,940	2,420	2,540	2,830	2,760	2,770	3,330
	0,041	0,003	0,013	0,046	0,052	0,010	0,087
	3,040	2,610	2,460	2,370	1,760	1,780	1,500
	5,200	4,430	4,060	3,720	3,780	4,080	5,210
	5,210	4,360	3,950	3,890	4,040	4,600	5,680
2	5,290	4,180	3,610	3,530	3,600	4,010	4,340
	4,160	3,110	3,060	3,010	3,330	4,040	5,480
	2,050	1,850	1,890	1,770	2,150	2,730	3,080
	0,019	0,021	0,004	0,014	0,023	0,055	0,060
	2,990	2,250	1,930	1,970	1,790	1,650	1,480
	4,570	3,870	3,290	3,180	3,310	3,580	4,730
	4,960	3,930	3,450	3,360	3,480	4,150	5,220
3	4,850	3,990	3,450	3,310	3,400	3,880	4,150
	3,990	3,020	2,820	2,790	3,080	3,860	4,670
	2,070	1,690	1,670	1,660	1,860	2,330	2,900
	0,023	0,016	0,005	0,004	0,016	0,035	0,054
	2,430	2,160	1,820	1,760	1,760	1,670	1,430
	4,410	3,690	3,150	3,080	3,210	3,560	4,160
	4,470	3,650	3,440	3,300	3,360	4,000	5,230
4	5,350	4,120	3,530	3,350	3,510	3,850	4,260
	4,160	3,110	3,000	3,030	3,300	4,140	5,610
	2,130	1,950	1,930	1,960	2,110	2,190	3,030
	0,018	0,018	0,005	0,011	0,025	0,049	0,052
	2,680	2,370	2,140	1,850	1,890	1,250	1,530
	4,720	4,050	3,510	3,330	3,420	3,810	4,550
	4,190	3,600	3,550	3,410	3,640	3,810	4,550
5	5,850	4,650	3,880	3,790	4,150	4,380	4,820
	4,990	3,960	4,020	3,980	4,100	4,960	6,410
	2,290	2,490	3,170	3,280	2,380	2,860	2,680
	0,007	0,006	0,019	0,065	0,037	0,072	0,052
	2,790	2,620	2,820	2,760	2,080	2,040	1,840
	5,420	4,720	4,370	4,250	4,210	4,710	5,720
	4,540	4,360	3,980	4,080	4,130	5,020	5,900
6	4,840	4,560	4,750	4,660	4,670	5,540	4,870
	5,600	4,890	5,140	4,770	5,010	5,320	7,890
	2,170	2,750	3,590	5,120	2,820	2,590	2,250
	0,033	0,013	0,073	0,099	0,091	0,051	0,016
	2,860	3,150	3,220	3,730	2,700	2,350	2,480
	6,080	5,300	5,080	4,960	4,940	5,570	6,300
	4,090	3,590	4,370	4,200	4,230	4,490	3,930

Tabela A-XII. Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 7,270 A (posição do variac 20- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	7,550	6,910	6,340	6,470	5,980	6,850	6,950
	6,340	7,370	6,650	6,730	7,010	7,760	9,550
	2,310	3,740	4,760	5,980	5,050	4,040	4,230
	0,019	0,016	0,096	0,069	1,700	4,200	1,320
	2,450	2,940	4,050	4,750	3,250	1,110	1,620
	8,530	2,900	7,110	6,050	6,520	2,210	7,500
	7,380	7,130	6,690	6,740	7,160	6,850	8,370
1	7,850	5,890	5,320	5,150	5,300	5,620	6,350
	5,280	5,080	4,750	4,830	5,230	6,220	8,190
	2,480	3,030	3,560	4,200	3,700	4,140	4,380
	0,040	0,011	0,059	0,090	0,064	1,220	1,330
	3,210	3,120	3,080	3,210	2,690	2,170	2,020
	6,780	5,640	5,050	4,600	5,090	5,560	6,660
	6,580	5,700	5,100	5,000	5,100	5,890	7,370
2	6,880	5,270	4,680	4,520	4,620	5,120	5,720
	5,160	3,950	3,610	3,750	3,960	5,240	7,100
	2,420	2,390	2,240	2,300	2,640	3,640	3,970
	0,027	0,025	0,010	0,020	0,030	0,066	0,083
	3,290	2,890	2,350	2,400	2,340	2,010	2,100
	5,770	4,780	4,190	4,170	4,270	4,820	5,840
	5,960	4,960	4,530	4,360	4,490	5,550	6,870
3	5,920	5,060	4,470	4,240	4,390	5,000	5,490
	4,940	3,530	3,320	3,320	3,820	5,060	6,280
	2,430	2,150	1,980	2,010	2,520	3,410	4,160
	0,022	0,021	0,011	0,019	0,022	0,044	0,098
	2,950	2,770	2,440	2,460	2,150	1,960	1,700
	5,010	4,670	4,090	3,970	4,150	4,710	5,890
	5,480	4,690	4,120	4,210	4,460	5,390	6,700
4	6,800	5,250	4,650	4,440	4,610	5,000	5,830
	5,230	4,090	5,680	3,640	4,000	5,290	7,150
	2,420	2,440	3,430	2,370	2,830	3,540	4,170
	0,019	0,022	0,002	0,017	0,042	0,067	0,086
	3,350	3,000	2,750	2,670	2,390	2,170	2,130
	5,750	5,100	4,540	4,260	4,480	5,010	6,300
	5,240	4,760	4,560	4,250	4,720	5,650	7,100
5	7,360	5,910	5,260	5,090	5,140	5,490	6,240
	6,030	4,980	4,780	5,100	5,320	6,600	7,500
	3,000	3,160	3,930	4,250	3,790	3,890	4,190
	0,028	0,014	0,019	0,063	0,094	0,074	0,055
	6,580	3,230	3,920	4,050	2,870	2,210	3,360
	6,720	5,980	5,370	5,550	5,370	5,990	7,560
	5,730	5,210	5,210	4,970	5,690	6,290	7,820
6	6,440	5,900	6,280	5,910	6,400	7,080	6,530
	6,530	6,700	6,340	6,110	6,970	6,960	9,980
	2,500	3,500	5,009	6,250	3,420	2,960	3,260
	0,022	0,011	0,084	1,610	0,065	0,061	0,016
	3,120	4,270	4,700	5,730	3,440	3,170	2,180
	7,870	7,400	6,860	6,820	6,710	6,370	7,790
	4,080	6,070	4,660	4,400	5,660	6,520	4,890

Tabela A-XIII Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 8,00 A (posição do variac 20- sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	8,660	8,080	6,970	6,980	7,230	7,880	7,980
	7,790	7,720	6,960	7,610	7,970	8,530	11,740
	3,210	4,330	5,470	7,630	5,720	4,500	5,960
	0,047	0,069	1,290	5,670	1,910	0,083	1,420
	3,610	2,620	3,680	3,890	1,830	2,170	1,520
	9,940	8,180	6,550	5,390	6,910	8,820	8,290
	7,510	8,950	7,270	7,620	8,130	8,660	10,330
1	7,910	6,830	6,150	5,930	6,140	6,540	7,480
	6,86	5,700	5,430	5,500	5,690	7,320	8,200
	2,800	3,160	3,880	4,340	1,040	5,310	5,010
	0,038	0,014	0,033	0,097	0,033	1,450	1,700
	3,890	3,330	3,490	3,170	2,810	2,250	2,120
	7,390	6,300	5,640	5,620	5,720	6,030	7,950
	7,660	6,590	5,550	5,700	6,020	7,330	8,630
2	7,310	6,080	5,330	5,130	5,420	5,850	6,360
	5,520	4,540	4,230	4,210	4,870	5,990	7,730
	2,620	2,520	2,650	2,480	3,250	3,920	5,020
	0,017	0,030	0,009	0,037	0,040	1,070	1,620
	3,190	3,200	2,830	2,810	2,640	2,420	2,020
	6,090	5,530	4,700	4,650	4,890	5,510	6,810
	6,670	5,370	4,940	5,010	5,380	6,290	7,880
3	6,740	5,780	5,030	4,880	5,080	5,650	6,370
	5,160	4,150	3,890	3,950	4,410	5,760	7,280
	2,660	2,380	2,380	2,610	2,900	3,880	5,090
	0,023	0,027	0,002	0,016	0,038	0,082	1,300
	3,200	3,090	2,690	2,470	2,300	2,340	2,190
	5,850	5,290	4,660	4,420	4,760	5,430	7,190
	6,190	5,390	4,970	4,850	5,160	6,170	7,740
4	7,330	5,990	5,340	5,100	5,260	5,780	6,600
	5,390	4,600	4,120	4,340	4,900	6,030	7,610
	3,020	2,640	2,850	3,000	3,380	3,900	4,640
	0,017	0,024	0,008	0,030	0,077	0,04	1,330
	3,580	3,460	3,070	2,930	2,440	2,490	2,260
	6,830	5,750	5,290	4,890	4,920	5,890	6,480
	5,900	5,690	5,080	5,190	5,560	6,370	8,210
5	8,390	6,790	6,020	5,850	6,000	6,290	7,050
	6,920	5,830	5,530	5,800	6,360	7,330	9,290
	3,010	3,370	4,360	5,300	4,560	4,860	4,830
	0,033	0,022	0,052	0,092	1,000	1,720	1,930
	4,010	3,790	3,960	4,510	3,150	2,430	1,950
	7,630	6,970	6,760	6,380	6,300	6,750	8,460
	5,720	6,310	5,980	6,300	6,320	6,880	8,990
6	7,550	7,060	6,970	7,070	7,550	7,790	7,720
	7,230	6,380	6,940	6,640	7,170	8,830	10,350
	3,810	3,570	4,920	7,510	4,570	4,100	3,570
	0,032	0,012	0,045	0,072	0,070	0,076	0,097
	2,640	3,900	5,830	4,840	3,840	4,480	2,150
	7,440	8,310	7,150	6,590	7,850	8,320	8,500
	5,420	7,610	5,850	6,150	5,520	7,800	5,700

Tabela A-XIV Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 10,00 A (posição do variac - sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	10,51	9,61	9,46	8,70	8,83	10,12	8,81
	9,62	9,99	9,56	9,19	9,79	11,34	13,85
	0,380	5,64	7,77	9,49	6,83	6,870	7,69
	0,257	0,183	1,261	1,671	1,225	2,480	2,78
	4,81	4,45	5,49	6,09	3,71	3,580	2,732
	12,70	9,59	9,69	7,84	8,43	9,940	9,960
	10,06	10,00	9,27	9,27	9,97	11,630	12,850
1	10,53	8,29	7,57	7,36	7,56	8,290	9,410
	7,16	6,79	6,78	6,05	7,33	9,240	11,57
	2,827	4,35	4,61	4,82	5,26	5,770	6,180
	1,279	0,400	0,563	0,240	1,125	1,685	1,446
	6,14	4,32	4,32	4,82	2,98	2,610	2,510
	9,38	7,92	7,10	6,71	6,85	7,820	10,06
	8,18	8,22	7,03	7,01	7,25	8,980	10,74
2	9,29	7,38	6,60	6,44	6,76	7,420	8,350
	5,80	5,87	5,17	5,28	6,18	7,600	10,36
	1,435	3,37	3,16	3,29	4,08	4,880	6,310
	0,934	0,336	0,183	0,196	0,724	1,206	1,696
	4,46	4,12	3,69	3,34	2,90	2,970	2,770
	8,12	6,89	5,82	5,68	6,10	7,080	8,950
	7,29	7,08	6,48	6,21	6,54	8,090	9,730
3	8,93	7,11	6,41	6,05	6,26	7,220	7,990
	5,04	5,35	5,08	4,90	5,73	7,470	8,630
	1,359	3,01	3,02	3,19	3,80	4,590	5,810
	1,582	0,211	0,189	0,201	0,525	1,100	1,355
	5,31	3,77	3,34	2,99	3,05	2,810	2,823
	7,38	6,43	5,80	5,50	5,93	6,980	8,900
	7,35	6,66	5,99	5,99	6,36	7,790	9,420
4	9,35	7,91	6,74	6,34	6,54	7,210	8,190
	4,81	5,49	5,39	5,45	6,29	7,780	10,63
	1,816	3,23	3,63	3,79	4,36	5,280	6,080
	1,112	0,301	0,103	0,103	0,720	0,942	1,500
	4,83	4,20	4,01	3,55	3,49	3,120	2,660
	8,05	7,14	6,60	6,22	6,57	7,470	8,580
	6,99	7,19	6,61	6,36	6,75	8,240	10,00
5	10,45	8,26	7,56	7,37	7,53	7,670	8,570
	9,99	7,36	6,99	7,08	7,86	9,410	11,90
	1,829	4,72	5,60	5,93	5,61	5,910	6,300
	1,598	0,232	0,804	0,824	1,241	0,885	1,100
	4,42	4,68	5,22	5,05	4,49	3,400	3,500
	8,67	8,29	8,14	5,57	8,04	9,150	11,130
	7,63	8,12	7,28	7,17	8,05	9,38	11,20
6	9,50	7,83	8,54	8,81	8,85	9,650	9,700
	6,79	8,14	8,87	8,97	9,16	10,52	10,00
	3,59	5,61	7,09	9,08	5,78	5,780	3,900
	1,226	0,111	0,265	0,140	1,186	1,093	0,400
	5,06	5,99	6,20	7,64	4,76	3,910	4,00
	9,40	9,81	10,11	9,04	9,13	10,210	12,00
	8,00	8,96	8,21	6,31	6,95	8,700	7,400

Tabela A-XV Valores de indução magnética (mT) obtidos durante a exploração do sistema gerador de campo eletromagnético referente a valores de 12,00 A (posição do variac - sistema ligado em 220V).

X, Y, Z _{i=0} ⁶	0	1	2	3	4	5	6
0	11,75	11,31	10,65	10,35			
	12,20	10,63	8,92	9,01			
	5,24	5,00	7,01	7,23			
	0,350	1,117	0,559	3,29			
	4,49	6,49	8,48	11,25			
	12,07	12,41	11,78	11,63			
	8,95	11,95	9,98	10,49			
1	12,08	9,75	8,68	8,44			
	9,65	8,24	7,42	7,69			
	2,60	4,05	4,30	5,56			
	1,811	0,749	0,701	0,505			
	5,94	5,34	5,91	5,59			
	11,58	8,93	8,76	8,44			
	11,13	9,49	9,07	8,41			
2	11,25	8,63	7,74	7,33			
	7,53	6,33	5,99	6,20			
	2,49	3,77	3,57	3,18			
	1,853	0,676	0,133	0,215			
	5,58	4,44	3,97	4,20			
	10,39	7,60	6,89	6,49			
	8,73	8,58	7,64	7,17			
3	10,43	8,47	7,17				
	7,05	6,49	5,47				
	2,08	3,48	3,39				
	1,773	0,849	0,200				
	5,04	4,25	3,64				
	8,94	6,85	6,08				
	9,28	7,89	7,42				
4	10,91	8,83	7,52				
	6,62	6,43	6,25				
	2,92	3,18	4,54				
	0,240	0,661	0,309				
	4,03	4,67	3,82				
	8,74	7,10	6,77				
	8,30	8,74	8,08				
5	11,79	8,60	8,28				
	10,77	8,96	7,99				
	4,96	5,24	5,98				
	0,777	0,095	0,913				
	3,03	4,78	4,89				
	11,02	8,96	7,93				
	11,23	10,00	9,33				
6	9,13	9,99	9,39				
	11,00	11,68	10,17				
	3,60	6,43	8,02				
	1,005	1,048	2,265				
	5,80	4,10	3,99				
	8,09	10,00	8,22				
	9,92	11,65	11,72				

APÊNDICE B

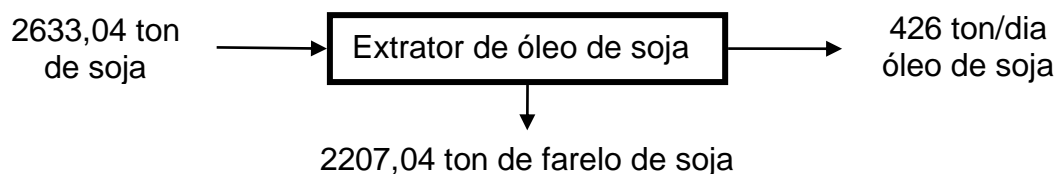
Tomando como base uma usina de biodiesel que processa 100.000,00 ton/ano, foram realizados os balanços de massa e energia segundo o fluxograma previamente definido para a rota enzimática. Essa usina requer em média 2633,04 toneladas de soja/dia, o que gera 2207,04 tonelada/dia de farelo e cerca de 384 toneladas de biodiesel. A partir desses dados se determinaram as capacidades dos equipamentos em termos de volume e superfície de transferência de calor para finalmente estimar o custo dos mesmos e assim realizar a avaliação técnico-econômica preliminar. A Tabela B-I apresenta diferentes propriedades requeridas para os cálculos dos balanços de calor e massa do processo.

Tabela B-I Principais propriedades utilizadas durante os cálculos.

	Densidade Kg/m^3	Calor	Massa molecular g/mol
Etanol	792,10	$\lambda = 846 \text{ kJ/kg}$	46
Óleo	920		874
Biodiesel	874,7		
t-butanol	781,20	$\lambda_l = 544 \text{ kJ/kg}$	
Biocatalisador	781,20		
Água	$\rho_{\text{agua}} = 1000$	$C_p = 4,186 \text{ J/kg}^\circ\text{C}$	

Balanço de massa na extração de óleo

Para encontrar a produção diária de biodiesel por esta indústria, foi realizado o cálculo do fluxo de massa para cada etapa do processo. Tomando como base que, 1 Kg de soja fornece cerca de 0,16179 Kg de óleo, resultou no seguinte balanço de massa, onde se necessitam 2633,04 ton de grãos de soja para fornecer 426 ton de óleo bruto/ dia conforme o esquema abaixo:



Balanço de calor e massa na etapa de transesterificação enzimática

A Tabela B-II apresenta os cálculos de balanço de massa, enquanto que a Tabela B-III apresenta os resultados do balanço de calor. Para determinar os volumes dos componentes presentes na reação e posteriormente proceder ao cálculo do volume de matéria-prima, e as capacidades dos equipamentos utilizados na usina, levando em consideração a massa de óleo gerado no processo, segundo ilustrado no esquema a seguir:

Tabela B-II. Cálculos dos reagentes utilizados na reação de biodiesel pela rota enzimática.

Meio reacional	Cálculos
Óleo	$V_{\text{Óleo}} = \frac{426 \text{ kg de óleo/dia}}{920 \text{ kg/m}^3} = 463 \text{ m}^3/\text{dia}$
Etanol	$V_{\text{etanol}} = \frac{135000 \text{ kg de etanol/dia}}{792 \text{ kg/m}^3} = 170 \text{ m}^3/\text{dia}$
Biocatalisador	$V_{\text{biocatalisador}} = \frac{463}{5} = 92,6 \text{ ton/dia ou } 138,90\text{m}^3$
T-butanol	$V_{\text{t-butanol}} = 30 \% \text{ de vol de óleo} = 0,30 \times 463 = 138,90\text{m}^3$
Biodiesel	$V_{\text{biodiesel}} = \frac{384000 \text{ Kg/dia}}{920 \text{ Kg/m}^3} = 417 \text{ m}^3/\text{dia} \approx 400 \text{ m}^3/\text{dia}$

A partir da massa de óleo gerado no processo procedeu-se ao cálculo para estimar o volume de matéria-prima e a capacidade dos equipamentos utilizados nesta etapa do processo, considerando-se duas etapas de reação que incluíram no total 4 reatores com decantadores intermediários. Neste caso, se considerou também o emprego de células imobilizadas em suportes de poliuretano como biocatalisador, além de t-butanol como solvente.

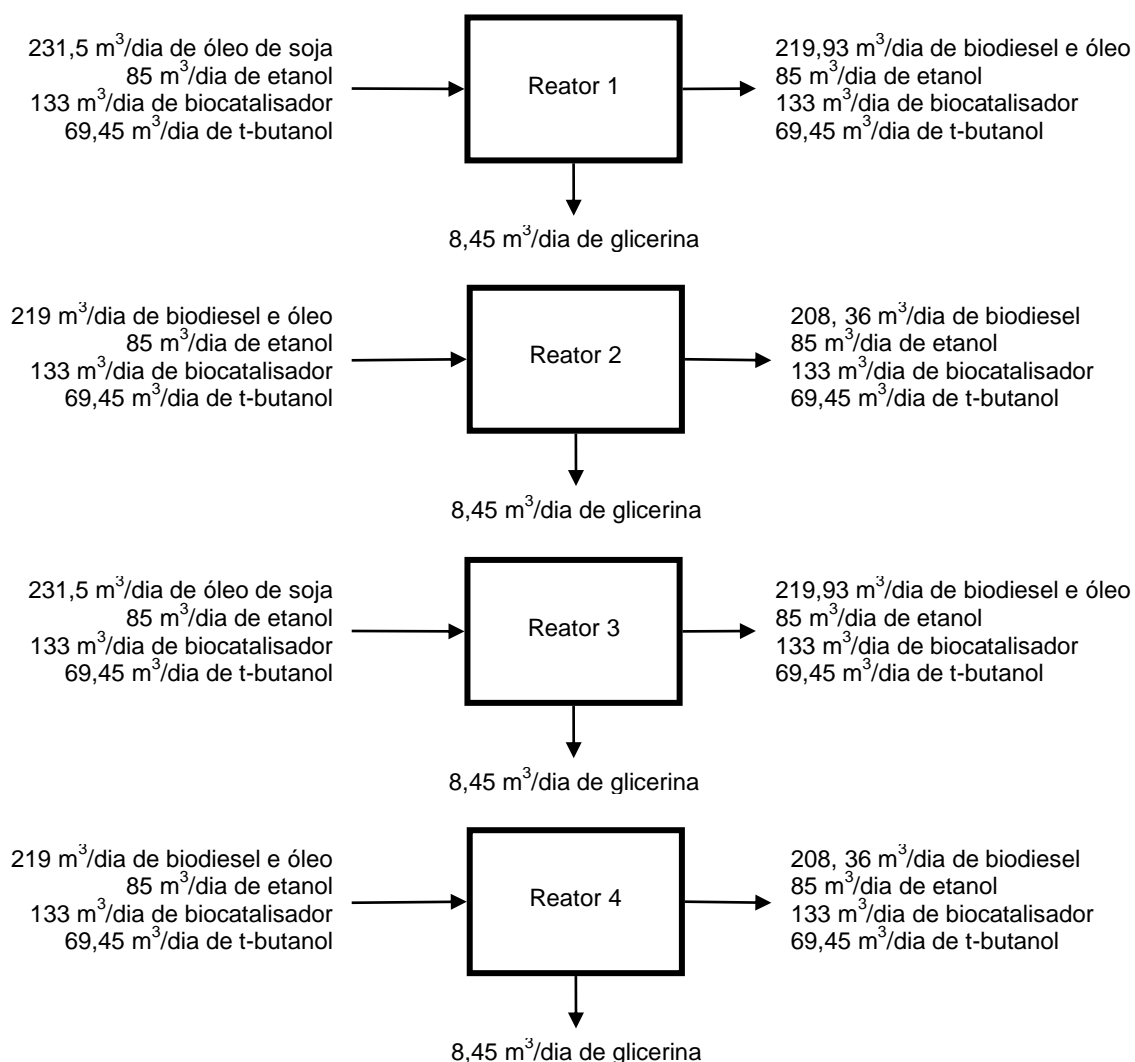
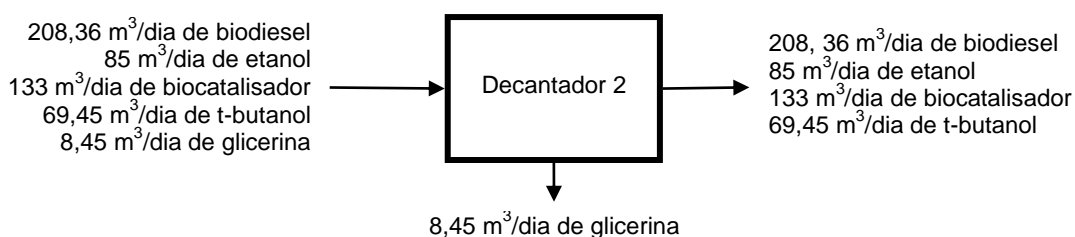
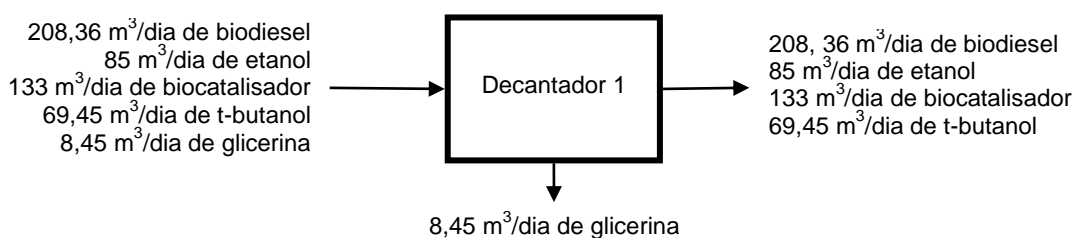


Tabela B-III Cálculo do balanço de calor na etapa de reação.

Cálculos	
Energia	$Q = M \cdot C_p \cdot \Delta t$ $= (426 + 135 + 92,6 + 108,51) \frac{kg}{dia} \times 1,97 \frac{kJ}{kg \cdot K}$ $\times 10K = 15013,37 kJ/dia$
Temperatura	$\Delta t = T_{reator} - T_{amb} = (30 - 24) = 6^\circ C \cong 10^\circ C \cong 10K$
Vapor	$Q = \lambda \cdot Q_{vapor} = Q_{vapor} = \frac{15013,37}{334} = 44,95 \frac{kg}{dia}$
Sperficie de trasferencia de calor	$Q = U \cdot A \cdot \Delta T_{ML} ; \text{ onde, } A = \frac{Q}{U \cdot \Delta T_{ML}} = \frac{360320,88}{(137,15)(74,97)(1,8)} = 19,47 pe^2$

O volume útil dos decantadores foi definido a partir do fluxo presente nos reatores, de acordo com os volumes da mistura que sai dos reatores, considerando ainda 30% de volume a mais para alcançar uma capacidade total de 680 m³.



Balço de calor e massa para estimar a recuperao de etanol

Nos clculos para a recuperao do etanol, alm do volume do equipamento, calcularam-se parmetros em relao quantidade de energia necessria para seu funcionamento em termos de calor de aquecimento e de evaporao:

$$\text{Calor fornecido ao Biodiesel} = 762,10 \frac{\text{kg}}{\text{dia}} \times 1,97 \frac{\text{kJ}}{\text{kgK}} \times (82 - 30) = 78069,52 \frac{\text{kJ}}{\text{dia}}$$

$$\text{Calor etanol} = 67500 \frac{\text{kg}}{\text{dia}} \times (25958 \times (82 - 30) + 846) = 66216150 \frac{\text{kJ}}{\text{dia}} = 2759 \cdot 10^6 \frac{\text{kJ}}{\text{h}}$$

$$\text{Calor do t-butanol} = 54260 \frac{\text{kg}}{\text{dia}} \times (2698 \times (82 - 30) + 544) = 37129900,96 \frac{\text{kJ}}{\text{dia}}$$

Cálculo do condensador de etanol

$$Q = 2759 \cdot 10^6 \frac{\text{kJ}}{\text{h}} = U \cdot A \cdot \Delta T_{ML}$$

$$U = 84,44 \frac{\text{kJ}}{\text{pé}^2 \cdot \text{h} \cdot ^\circ\text{F}}$$

$$\Delta T_{ML} = \frac{\Delta T_A - \Delta T_B}{\ln \frac{\Delta T_A}{\Delta T_B}} = \frac{(82 - 22) - (78 - 50)}{\ln \frac{(82-22)}{(78-50)}} = 41,99^\circ\text{C} = 75,58^\circ\text{F}$$

$$A = \frac{Q}{U \cdot \Delta T_{ML}} = \frac{2759 \cdot 10^6 \frac{\text{kJ}}{\text{h}}}{\left(84,44 \frac{\text{kJ}}{\text{pé}^2 \cdot \text{h} \cdot ^\circ\text{F}}\right) (75,58^\circ\text{F})} = 432 \text{pé}^2$$

$$\text{Calor do Biodiesel} = 13464 \frac{\text{kg}}{\text{dia}} \times 1,97 \frac{\text{kJ}}{\text{kgK}} \times (82 - 30) = 57468,84 \frac{\text{kJ}}{\text{h}}$$

Cálculo do evaporador do etanol

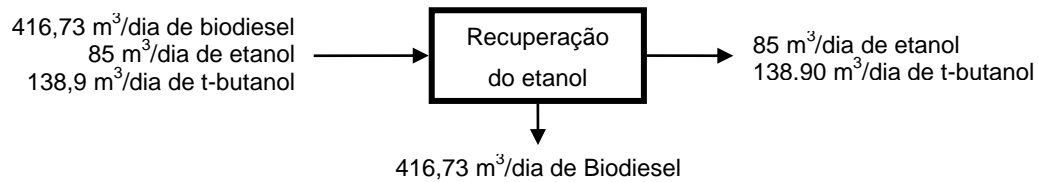
$$Q = 57468,84 \frac{\text{kJ}}{\text{h}} = U \cdot A \cdot \Delta T_{ML}$$

$$U = 84,44 \frac{\text{kJ}}{\text{pé}^2 \cdot \text{h} \cdot ^\circ\text{F}}$$

$$\Delta T_{ML} = \frac{\Delta T_A - \Delta T_B}{\ln \frac{\Delta T_A}{\Delta T_B}} = \frac{(100 - 30) - (90 - 82)}{\ln \frac{(100-30)}{(90-82)}} = 28,58^\circ\text{C} = 51,45^\circ\text{F}$$

$$A = \frac{Q}{U \cdot \Delta T_{ML}} = \frac{57468,84 \frac{\text{kJ}}{\text{h}}}{\left(84,44 \frac{\text{kJ}}{\text{pé}^2 \cdot \text{h} \cdot ^\circ\text{F}}\right) (51,45^\circ\text{F})} = 13,23 \text{pé}^2 \cong 15 \text{pé}^2$$

Esquema geral desta etapa



Balço de massa referente à lavagem de biodiesel

Neste caso, se tomou como base 1/3 de água em relação ao volume de biodiesel, onde o volume de biodiesel a lavar = $13464 \frac{kg}{dia} = 15,39 \frac{m^3}{dia}$, então a quantidade de água de lavagem é = $5,13 \frac{m^3}{dia}$ ou

$$M_{agua} = 5,13m^3/dia \times 1000 kg/m^3 = 5130kg/dia.$$

O calor de aquecimento necessário é de:

$$Q = 5130 \frac{kg}{dia} \times 4,187 \frac{kJ}{kg \cdot K} \times (75 - 25) = 1073960 \frac{kJ}{dia}$$

$$U = 475 \frac{BTU}{pé^2 \cdot h \cdot ^\circ F}$$

$$\Delta T_{ML} = \frac{T_A - T_B}{\ln \frac{T_A - T_v}{T_B - T_v}} = \frac{75 - 25}{\ln \frac{(75-100)}{(25-100)}} = 45,53^\circ C = 21,29^\circ F$$

$$\text{Área de transferência do tanque é de } A = \frac{Q}{U \cdot \Delta T_{ML}} = 4,65pé^2 \cong 10pé^2.$$

Cálculo da etapa de secagem do biodiesel

Cálculo para determinar o sistema de secagem do biodiesel, considerando que o biodiesel contém 20% de água, isso corresponde a:

$$\text{Água} = 5130 \frac{kg}{dia} \times 0,20 = 10,26 \frac{kg}{dia}$$

$$\text{O cálculo do aquecedor foi: } Q = 1026 \frac{kg}{dia} \times 334 \frac{kJ}{kg} = 342648 \frac{kJ}{dia}$$

$$\text{Área de transferência de calor: } \Delta T_{ML} = \frac{\Delta T_A - \Delta T_B}{\ln \frac{\Delta T_A}{\Delta T_B}} = \frac{(100-90) - (90-25)}{\ln \frac{(100-90)}{(90-25)}} = 29,38^\circ C = 84,88^\circ F$$

$$A = \frac{Q}{U \cdot \Delta T_{ML}} = \frac{342648 \frac{kJ}{dia}}{130 \cdot 84,88^\circ F} = 49,84pé^2 \cong 50pé^2$$

Calor latente da água

$$(M \cdot Cp \cdot \Delta T)_{vapor \text{ que condensa}} = (M \cdot Cp \cdot \Delta T)_{\text{água de aquecimento}}$$

$$M_v(Cp \cdot \Delta T + \lambda) = M_a \cdot Cp(T_s - 2s)$$

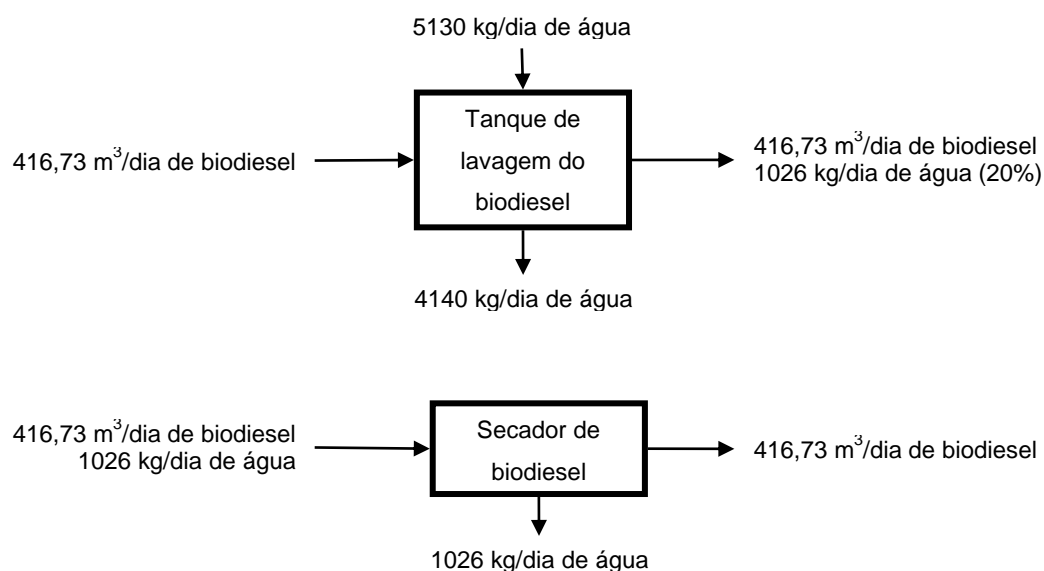
$$M_v(Cp \cdot \Delta T + \lambda) = 1026 \frac{kg}{dia} \left(4,186 \frac{J}{kg^{\circ}C} (100 - 90) + 2260 \frac{J}{kg} \right) = 2308802,94$$

$$Cp(T_s - 2s) = 4,186 \cdot 10^{-3} \times (90 - 25) = 0,272$$

Quantidade de água removida do biodiesel

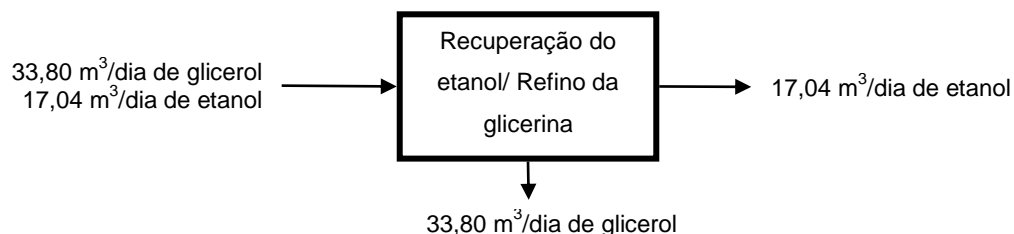
$$M_a = \frac{2308802,94}{0,272} = 8488246,103 \frac{kg \text{ de água}}{dia}$$

O esquema geral dos balanços de lavagem/ secagem de biodiesel é:



Etapa de purificação da glicerina visando seu uso na fermentação

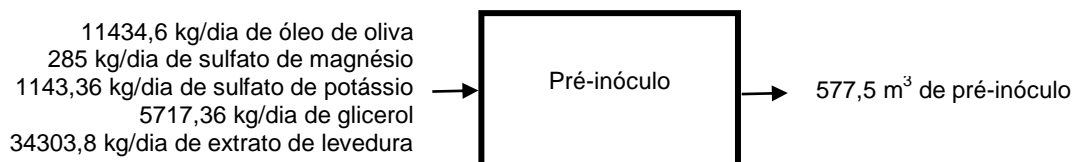
O esquema geral é ilustrado a seguir prevendo o volume total de glicerina gerada nos quatro reatores de transesterificação empregados:



Após a obtenção da glicerina com um maior grau de pureza, pode ser definido a quantidade de biocatalisador obtido e sua demanda para produção de biodiesel pela rota enzimática utilizando a whole a base da levedura *Y. Lipolytica*. Como regra se adotou uma relação de 25% de biocatalisador em

relação à massa de óleo utilizada em cada batelada resultando em 92,6 ton de biocatalisador.

Sabendo que a produtividade da *Yarrowia lipolytica* é de 0,024 kg de biomassa/litro de meio de cultura, então serão necessários 577,5 m³ de meio de cultura para o pré-inóculo necessário para produzir o biocatalisador requerido segundo ilustrado no esquema a seguir. A relação de inóculo para o meio de fermentação é de 15%.



Na Tabela B-IV, estão descritos os nutrientes utilizados no meio de cultura, com as respectivas quantidades utilizadas tanto para a preparação do pré-inóculo, tanto no meio de fermentação.

Tabela B-IV Nutrientes necessários para a produção de biomassa celular e suas respectivas quantidades em kg/dia.

Nutrientes	Pré-inóculo (Kg/dia)	Meio de fermentação (Kg/dia)
Óleo de oliva	1143,46	77000
Sulfato de magnésio	285,865	1925
Sulfato de potássio	1143,46	7700
Extrato de levedura	34303.8	231000
Glicerol	5717,30	38500

Com base nos resultados experimentais foi escolhido poliuretano como suporte para imobilização das células, considerando uma proporção de biomassa por partícula de 3:1 e a partir desses dados foi calculado a quantidade de partículas de poliuretano necessária para imobilizar 92,6 toneladas de biomassa:

$$\text{Massa de poliuretano} = \frac{92,6}{3} = 30,86 \frac{\text{ton}}{\text{dia}}$$

Mas, para determinar o volume do fermentador para preparação do biocatalisador, foi necessário volume da massa de poliuretano. A densidade do poliuretano varia de 15 a 130 kg/m³, tomando a média desses valores:

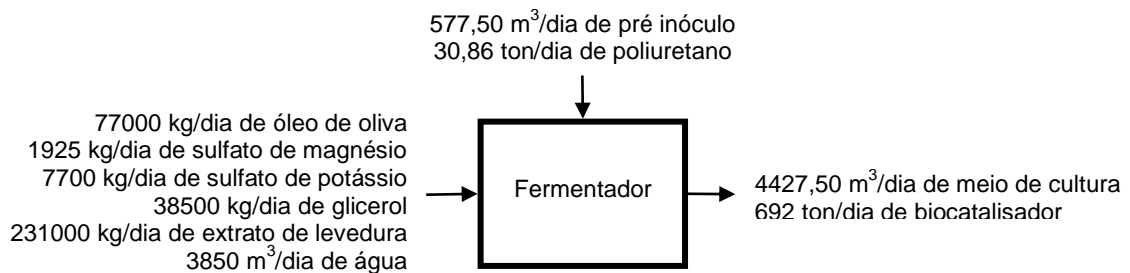
$$\text{Volume de poliuretano} = 30860 \frac{\text{Kg}}{\text{dia}} \times \frac{\text{m}^3}{72,5 \text{ Kg}} = 425,56 \text{ m}^3/\text{dia}$$

Ou seja, para calcular o volume do fermentador deve considerar a seguintes entradas com 15% de inóculo:

$$577,50 \text{ m}^3 \text{ de pré inóculo} + 3850 \text{ m}^3 \text{ meio de cultura} = \frac{4427,50 \text{ m}^3}{\text{dia}}$$

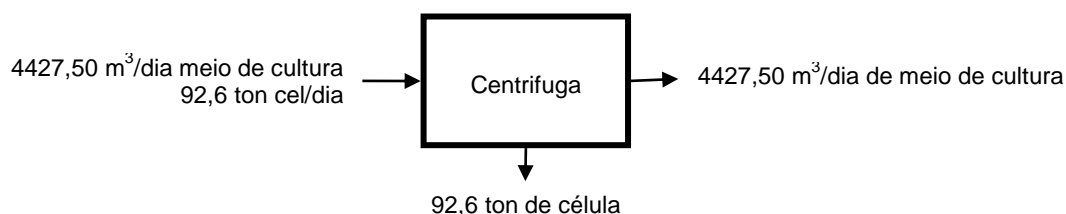
$$\text{Volume do fermentador} = 425,56 \frac{\text{m}^3}{\text{dia}} + 5755,75 \frac{\text{m}^3}{\text{dia}} = 6181,31 \frac{\text{m}^3}{\text{dia}}$$

O volume do fermentador com poliuretano será de 6181,31 m³/dia. No esquema abaixo se relacionam os fluxos de entrada no fermentador para produção de biomassa celular.



Neste processo, fez-se necessário 3 fermentadores para a produção de levedura, tanto para produção de biocatalisador, quanto para produção de proteína unicelular. Diante desse volume de meio foi calculada a capacidade da centrífuga, uma vez que a centrifugação do final da fermentação será realizada por batelada de fermentação. Desta forma, a capacidade da centrífuga será de 2060,43 m³/dia. Logo abaixo apresenta as correntes de entrada no equipamento.

$$\text{Capacidade da centrífuga} = \frac{6181,31}{3} = 2060,43 \frac{\text{m}^3}{\text{dia}}$$



Cálculo da formulação de ração animal usando biomassa produzida

Considerando que o whole cell usado na produção de biodiesel é reusado em vários ciclos de transesterificação o excedente de biomassa pode então ser destinado a produção de proteína uniceçular. Neste contexto, para a produção da ração animal utilizando a biomassa da *Y. lipolytica* como incremento do conteúdo protéico do farelo de soja, segundo a legislação brasileira só é permitido a adição de 12% de levedura na ração animal (Rostagno, 2011), porém a produção de biomassa diariamente é cerca de 96,2 ton/dia, então para a produção de ração a partir dessa biomassa, resulta em 740 ton/dia de produto final, que pode ser armazenado até sua comercialização:

