

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



DISSERTAÇÃO

**Modificação de resíduos graxos animais através de cepas  
de Staphylococcus xylosus: Matéria-prima para biodiesel**

**Roger Vasques Marques**

Pelotas, Fevereiro de 2013.

**ROGER VASQUES MARQUES**

**MODIFICAÇÃO DE RESÍDUOS GRAXOS ANIMAIS ATRAVÉS DE CEPAS DE  
STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS: MATÉRIA-PRIMA PARA BODIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Érico Kunde Corrêa  
Co-Orientadora: Prof. Dra. Eduarda Hallal Duval

Pelotas, Fevereiro de 2013.

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M357m      Marques, Roger Vasques  
                Modificação de resíduos graxos animais através de cepas  
                de *Staphylococcus xylosus* : matéria-prima para biodiesel /  
                Roger Vasques Marques. – 63f. : il. – Dissertação (Mestra-  
                do). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia  
                de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de  
                Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 2013. – Orientador Érico  
                Kunde Corrêa ; co-orientador Eduarda Hallal Duval.

                1.Subprodutos. 2.*Staphylococcus xylosus*.  
                3.Fermentação. 4.Resíduos graxos. I.Corrêa, Érico Kunde.  
                II.Duval, Eduarda Hallal. III.Título.

CDD: 635.2

**Banca Examinadora:**

Érico Kunde Corrêa

Carlos Antônio da Costa Tillmann

Cláudio Martin Pereira de Pereira

Thomaz Lucia Júnior

## **Agradecimentos**

Aos meus queridos familiares, em especial à minha querida mãe, Rosa Maria, e irmão Alex, pela constante presença em minha vida, pelo grande apoio, incentivo e por acreditarem na importância desse trabalho para mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Érico Kunde Corrêa, em ser exemplo de pessoa e profissional, pelo grande incentivo e cobrança para fazer com que todos seus orientados se tornem excelentes profissionais. Pela garra demonstrada para ver o andamento do trabalho e atividades rotineiras de laboratório ir em frente, pela grande dedicação em exaltar o nome da Universidade e do Curso de Engenharia na qual está vinculado, também pela compreensão e condução dos melhores caminhos a serem tomados, e pela grande visão macro dos caminhos da ciência.

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

A minha co-orientadora Profa. Dra. Eduarda Hallal Duval, por sempre estar receptível e bem disposta a discussão das dificuldades que apareceram, pela confiança imposta em mim e nos alunos de iniciação científica, cedendo seu espaço de trabalho em qualquer dia da semana, em qualquer hora do dia. Fica meu muito obrigado.

A Prof. Dra. Ângela Maria Fiorentini, pela disponibilização das colônias de micro-organismos utilizadas neste trabalho.

A Prof. Dra. Rita de Cássia da Conceição, por utilizar seus contatos profissionais com os empreendedores para auxiliar na coleta de amostras.

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

As empresas Frigorífico COSULATI, Frigorífico Guanabara e Frigorífico Castro, por sempre estar de portas abertas, cedendo amostras e disponibilizando suas instalações para qualquer atividade ali necessária.

Aos alunos de iniciação científica Lucas Guidoni e Gustavo Bittencourt pela amizade e apoio conferidos nessa trajetória, sempre dispostos a enfrentar jornadas múltiplas de trabalho em laboratório, possibilitando a execução desse trabalho.

A todos os alunos do Núcleo de Educação, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade pela grande amizade criada, confiança e disposição tanto em horário de trabalho como fora.

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

Aos meus colegas Matheus da Paz, Michele Nogueira, Luana Decol, Paulo Teixeira, Melina Gomes e Mari Iglesias, pelas grandes indias em vários eventos dentro e fora do Estado, buscando sempre o aperfeiçoamento mútuo, mas sempre com muitas risadas e histórias para contar.

Aos meus grandes amigos e parceiros Arroio-grandenses, Guilherme, Cid, Lu, Sabrina e Bana, que conseguiram converter finais de semana de muito stress em grandes alegrias.

Ao PPGCTA, pelo voto de confiança dado ao projeto.

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

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

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

## Resumo

MARQUES, Roger Vasques. **Modificação de resíduos graxos animais através de cepas de *Staphylococcus xylosus*: Matéria-prima para biodiesel**. 2013. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

A intensa atividade da cadeia produtiva de carnes brasileira gera uma imensa quantidade de resíduos agroindustriais, dentre eles os resíduos de gorduras animais, que podem alternativamente ser convertidos em biodiesel, dada a quebra de algumas barreiras tecnológicas e econômicas que impedem a difusão desse biocombustível a partir dessas fontes na matriz energética nacional. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo quebrar a primeira dessas barreiras, que foi a redução do ponto de fusão de diferentes gorduras animais como matéria-prima para biodiesel utilizando cepas de *Staphylococcus xylosus*. Esta bactéria normalmente encontrada em queijos e embutidos cárneos fermentados possui a capacidade de produzir uma hidrolase do tipo EC 3.1.1.3, caracterizada pela sua especificidade em hidrolisar ácidos graxos com cadeia carbonada acima de 10 carbonos. Assim, foram investigados os efeitos da fermentação das gorduras animais causadas por essa bactéria nos pontos de fusão desses resíduos graxos. Foram testados os parâmetros tempo de fermentação - variando entre 1,5h e 7,5h – concentração de gordura no mosto – variando 5 pontos entre 2% e 10% e outros 5 pontos entre 50% e 90%. A concentração inicial de fermentação foi estipulada em  $10^8$  UFC. Após o término da fermentação, foi analisado o ponto de fusão das amostras ao longo do tempo e da concentração de gordura utilizada. As três fontes de gordura analisadas apresentaram queda média dos seus respectivos pontos de fusão entre 21°C (frangos) e 30°C (bovinos). As gorduras de bovinos e frangos apresentaram os resultados mais satisfatórios, onde a maior queda nas temperaturas de fusão foram obtidas com as maiores concentrações de resíduo graxo (50 a 70%) e em tempos de fermentação variando entre 1,5h e 3h.

Palavras-chave: Subprodutos, *Staphylococcus xylosus*, fermentação, resíduo graxo

## Abstract

MARQUES, Roger Vasques **Modificação de resíduos graxos animais através de cepas de *Staphylococcus xylosus*: Matéria-prima para biodiesel**. 2013. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

The intense activity of the Brazilian meat production chain generates immense amounts of agroindustrial residues, as is the case of fatty animal waste that can alternatively be converted into biodiesel, given the removal of some economic and technological barriers that prevent the spread of biofuel from these sources in the national energy matrix. Thus, the present study aimed to break the first of these barriers, which was to reduce the melting point of different animal fats as feedstock for biodiesel using *Staphylococcus xylosus* strains. These bacteria normally found in fermented sausage and cheese has the capability of producing a hydrolase of the type EC 3.1.1.3, characterized by its specificity for hydrolyzing fatty acids with carbon chain greater than 10 carbons. Thus, we investigated the effects of fermentation of animal fats caused by this bacterium in melting points of these fatty wastes. The tested parameters were fermentation time - ranging between 1.5h and 7.5h - fat concentration in the wort - 5 points ranging between 2% and 10% and other 5 points between 50% and 90%. The initial concentration of fermentation was set at  $10^8$  CFU. Upon completion of the fermentation, the melting point of the samples were analyzed over time and the concentration of fat used. The three sources of fat analyzed had average drop of their respective melting points from 21°C (chickens) and 30°C (cattle). The fat of cattle and chickens showed the most satisfactory results, where the biggest drop in melting temperatures were obtained with higher concentrations of fatty residue (50 to 70%) and shorter fermentation times, ranging between 1.5h to 3h.

Keywords: Byproducts, *Staphylococcus xylosus*, fermentation, fatty residue

## Lista de Figuras

Figura 1 - Moléculas de triglicerídeo .....	21
Figura 2 - Sistema global de transesterificação de lipídios .....	23
Figura 3 - Método aplicado para determinação do ponto de fusão .....	33
Figura 4 - Apresentação comparativa entre as amostras de gordura suína e de frangos antes do processo fermentativo .....	35
Figura 5 - Modelo de crescimento bacteriano ao longo do tempo de pré-enriquecimento.....	36
Figura 6 - Modelo de crescimento bacteriano avaliado pela densidade ótica ao longo do tempo de pré-enriquecimento.....	37
Figura 7 - Gráfico de superfície de resposta da variação do PF(T x C x t) de sebo bovino.....	40
Figura 8 - Gráfico de contorno da variação do PF(T x C x t) de sebo bovino.....	41
Figura 9 - Gráfico de superfície de resposta da variação do PF(T x C x t) de banha suína .....	43
Figura 10 - Gráfico de contorno da variação do PF(T x C x t) de banha suína .....	44
Figura 11 - Gráfico de superfície de resposta da variação do PF(T x C x t) de gordura de frango.....	47
Figura 12 - Gráfico de contorno da variação do PF(T x C x t) de gordura de frango .....	48
Figura 13 - Gordura de frango liquefeita durante o processo fermentativo.....	49

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Ácidos graxos de gorduras animais, óleos vegetais e respectivas porcentagens e pontos de fusão .....	22
Tabela 2 – Diluições aplicadas para confecção da curva de crescimento .....	30
Tabela 3 – Delineamento experimental aplicado na fermentação de gorduras animais .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 2
Tabela 4 - Propriedades físicas das gorduras animais não fermentadas .....	34
Tabela 5 – Pontos médios de fusão de gordura bovina ao longo da fermentação .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Tabela 6 - Pontos médios de fusão de gordura suína ao longo da fermentação .....	38
Tabela 7 - Pontos médios de fusão de gordura de frango ao longo da fermentação .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## Sumário

### Conteúdo

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>15</b>
3.1. Objetivos específicos.....	15
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
4.1. Matriz energética global.....	16
4.2. Classificação dos biocombustíveis.....	18
4.3. Lipídios: Matéria-prima para biodiesel.....	19
4.4. Biodiesel.....	22
4.5. <i>Staphylococcus xylosus</i> – Características gerais.....	25
4.6. Densidade Ótica.....	25
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
5.1. Coleta das amostras.....	27
5.2. Teor de umidade.....	27
5.3. Teor de acidez livre.....	28
5.4. Culturas bacterianas.....	28
5.5. Pré-enriquecimento.....	29
5.6. Crescimento bacteriano.....	29
5.6.1. Curva de crescimento.....	30
5.7. Fermentação das gorduras animais.....	31
5.8. Análise do ponto de fusão.....	31
5.9. Análise estatística.....	32

<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
6.1. Teor de umidade e acidez .....	33
6.2. Curva de crescimento.....	35
6.3. Ponto de fusão.....	37
6.3.1. Sebo Bovino.....	37
6.3.2. Banha Suína .....	41
6.3.3. Gordura de Frango.....	45
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1. Introdução

Em 2010, a produção brasileira de carnes (bovinos, suínos e aves) foi de 24,5 milhões de toneladas, sendo que 75% dessa produção foram destinadas ao mercado interno. O Brasil apresenta crescente participação no comércio internacional desses produtos, e as expectativas apontam que até 2020 a produção de carne bovina, suína e de aves supra 44,5%, 14,2% e 48,1% do mercado internacional respectivamente (FAO, 2011; BRASIL, 2011a).

Os principais Estados que impulsionam a produção de carne bovina no país são o Mato Grosso, seguido de São Paulo e Mato Grosso do Sul, sendo que cada um abateu, somente no 4º trimestre de 2010, mais de 800 mil cabeças de gado. Entretanto, comparando ao mesmo período de 2009, esses três Estados tiveram queda média de produção de 12,4%. Seguindo essa tendência, Minas Gerais e Pará, ambos abatendo quantidades superiores a 450 mil bovinos, tiveram decréscimo de 11,5% e 14,5% respectivamente (BRASIL, 2011b).

Em contraponto, a região Sul do país apresentou aumento do número de cabeças abatidas, sendo que o Rio Grande do Sul subiu de sétimo para quarto lugar no ranking das Unidades da Federação, apresentando elevação de 21,4%, chegando a aproximadamente 600 mil bovinos abatidos. Convergindo a esses valores, o Paraná teve alta de 10,2% em relação ao mesmo período do ano anterior, permanecendo na 9ª posição do ranking, já Santa Catarina teve aumento de 22,7%, estabilizando-se na 14ª posição; fora da região Sul, outro Estado com produção total superior a 1% que apresentou aumento significativo foi o Acre, tendo alta de 36,1% nesse período, passando de 14º para 12º no ranking das Unidades da Federação (BRASIL, 2011b).

Essas flutuações na produção de carne bovina pelo país ocorrem devido a diversos fatores, tais como setores da economia que afetam o abate, que abastece principalmente o mercado interno, portanto a própria diferença cultural das regiões quanto ao consumo de carnes afeta a cadeia produtiva, além da influência da economia internacional, principalmente dos importadores mais relevantes como a união europeia, que passa por um período de crise financeira em toda a zona do

euro, retraindo o comércio entre os países e desaquecendo a demanda, implicando na redução do abate nas regiões onde a exportação é o foco principal (MARQUES, et al., 2012a; FAO, 2011).

No segmento de carnes de frango, a União Brasileira de Avicultura (UBABEF) anunciou crescimento de 11,38% na produção do país, aproximando-se da China, segundo colocado como produtor, sendo que o Rio Grande do Sul contribui com 15% do total de aves abatidas no território nacional, enquanto que em exportações o Brasil ainda é o líder absoluto.

No topo do ranking mundial do consumo de carnes está a de suínos, representando 39,4% do total o consumido, seguida pela carne de aves, bovinos e ovinos/caprinos (ROPPA, 2009). A produção nacional brasileira é concentrada na região sul, sendo esta responsável por 65,4% dos abates de suínos. Santa Catarina contribui com 26,9% e o Rio Grande do Sul com 21,9% compondo os dois principais estados abatedores (BRASIL, 2011b).

No entanto, atrelado a esta crescente industrialização de carcaças animais, há um proporcional aumento na quantidade de resíduos gerados, que são principalmente ricos em lipídeos e proteínas nos três tipos de matadouros-frigoríficos (MARQUES et al., 2012a). Para os abatedouros de bovinos e suínos, ainda há a geração de resíduos do tecido ósseo das carcaças, constituídos basicamente de cálcio e potássio, já a carne de frango é comercializada juntamente com os ossos, reduzindo o volume de resíduo sólido gerado em comparação com as outras linhas de processamento. Como qualquer dejetos disposto inadequadamente ao ambiente pode se tornar um importante fator de poluição. Assim a temática para redução do impacto ambiental e sustentabilidade do sistema de produção animal é cada vez mais discutida na comunidade científica mundial (MARQUES et al., 2012b).

Pela insolubilidade dos resíduos lipídicos nos corpos hídricos, estes se tornam potenciais impactantes ambientais quando dispostos inadequadamente ao meio ambiente (BRASIL, 2010). Desse modo, como uma alternativa para reduzir o impacto ambiental e agregar valor, surge o interesse em transformar este resíduo graxo em biodiesel, contribuindo para alcançar a sustentabilidade do sistema de produção animal (PADULA et al., 2012).

Contudo, as gorduras de origem animal são constituídas de ácidos graxos de cadeias longas, acima de dez carbonos, possuindo como principal desvantagem para a síntese de biocombustíveis sua apresentação na forma sólida à temperatura

ambiente, tornando o processo de transesterificação em escala industrial oneroso devido ao alto custo energético necessário para liquefazer estes tipos de gordura, inviabilizando a produção de biodiesel a partir dessas fontes (ALPTEKIN & CANAKCI, 2011).

São conhecidas duas rotas químicas para a produção de biocombustíveis, a rota química propriamente dita onde ocorre a hidrólise da ligação éster de um ácido graxo e do glicerol ligado por um ácido ou uma base, em aquecimento e adição de um álcool de cadeia curta (DA CUNHA et al., 2009). A segunda rota é a enzimática, onde a reação de hidrólise é catalisada por lipases específicas, com a vantagem de não gerar resíduos aquosos ácidos ou alcalinos, possuem uma alta especificidade resultando em menos contaminantes no produto final, além de apresentar rendimentos favoráveis (KAPTUROWSKA et al., 2012; FUKUDA et al., 2001). Em contra partida, a utilização de enzimas puras torna o processo em grande escala inviável pelo alto custo de enzimas purificadas, o que incentiva a busca por micro-organismos produtores de lipases que possam acelerar a reação mantendo mais baixo possível o custo de operação (RICHARD, 2011).

As lipases provenientes de bactérias e fungos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, principalmente pela versatilidade de suas propriedades, no que se refere a atuação enzimática e especificidade do substrato, e pela facilidade de produção em massa sendo amplamente utilizado no segmento industrial (HASAN et al., 2006).

Fiegler & Brückner (1997) identificaram o gene responsável pela produção de serina acetil transferase (E.C.3.1.1.3), enzima capaz de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 carbonos), em cepas de *Staphylococcus xylosus*, uma bactéria normalmente isolada de produtos cárneos fermentados responsável pela estabilização da cor, decomposição de peróxidos e formação de aroma devido a suas atividades proteolíticas e lipolíticas (KOZACINSKI et al., 2008).

Assim, este trabalho teve como objetivo utilizar biotécnicas com cepas de *Staphylococcus xylosus* para quebrar a cadeia carbonada de ácidos graxos, reduzindo o Ponto de Fusão (PF) das gorduras animais para temperaturas mais amenas, criando um bioprocessos alternativo interessante do ponto de vista econômico e ambiental.

## **2. Hipótese**

A fermentação causada por cepas de *Staphylococcus xylosus* em gorduras animais proporciona uma queda do ponto de fusão das mesmas pela redução do número de carbonos da cadeia dos ácidos graxos, reduzindo os custos energéticos para liquefação da gordura viabilizando a obtenção de biodiesel de origem animal.

## **3. Objetivo geral**

- Modificar a estrutura química de resíduos graxos animais utilizando cepas de *Staphylococcus xylosus*, a fim de reduzir seu ponto de fusão

### **3.1. Objetivos específicos**

- Promover um meio de transformar gorduras animais residuais em potenciais matérias-primas para produção de biodiesel pelo fracionamento da cadeia carbonada dos ácidos graxos;
- Valorizar resíduos graxos do abate de animais;
- Favorecer a sustentabilidade agroindustrial pela valorização de um resíduo que pode ser aproveitado como fonte energética para os processos produtivos da própria agroindústria.

## **4. Revisão Bibliográfica**

### **4.1. Matriz energética global**

As décadas recentes da história da humanidade foram marcadas pelo aumento da população mundial, que demandam mais recursos naturais, notadamente alimentos e energia (BANERJEE & CHAKRABORTY, 2009; GODFRAY et al., 2010). O modelo energético no mundo atual baseia-se no uso de combustíveis fósseis como fonte primária de energia, como o carvão mineral e o petróleo. No entanto, perspectivas apontam uma redução significativa dos estoques desses recursos ao redor do globo no futuro, aumentando os custos de extração. A International Energy Agency (IEA) estima que no ano de 2030, as reservas conhecidas de óleo e gás estarão reduzidas a valores em torno de 40% e 60% do montante atual respectivamente (IEA, 2011).

Nesta perspectiva, os custos para a extração destes combustíveis tornar-se-ão cada vez mais onerosos, até que seja atingido um patamar onde a utilização dessas fontes energéticas seja inviável economicamente ou que suas reservas se esgotem (SAMANLI et al., 2010; CHAUHAN et al., 2010; DUFOUR et al., 2012). Paralelamente, a demanda de energia do planeta está em ascensão, usada basicamente para todos os processos de transformações nas indústrias, criando produtos que atendem as expectativas dos consumidores quanto à qualidade de vida almejada por uma sociedade cada vez mais globalizada (GODFRAY et al., 2010).

Esses recursos são gerados a partir da sobreposição de matéria-orgânica ao longo dos séculos. São assim caracterizados, pois a taxa de consumo dessas fontes é muito superior à capacidade de geração dos mesmos (INAN & SCHENK, 2001). De qualquer forma, mesmo que as reservas de matéria-prima fóssil no planeta estivessem longe de findar-se, a humanidade deveria rumar para a substituição desse tipo de energia por renováveis, no intuito de controlar as mudanças climáticas que por indícios científicos podem ser causadas pela emissão de gases de efeito estufa por reintrodução de carbono antes fossilizado no ambiente, já que o setor

energético atual contribui com em média 66% do total desses gases liberados na atmosfera (TÜKENMEZ & DEMIRELI, 2012; SOBRINO et al., 2011).

Como medida de controle para essa situação, diferentes países – merecendo destaque Brasil, Estados Unidos e parte da União Européia – tradicionais potências agropecuárias, vêm investindo no desenvolvimento de diferentes biocombustíveis (CRAGO, 2010). O aprimoramento de tecnologias alternativas a decadente oferta de petróleo e que possibilitem a desejada sustentabilidade energética, constitui-se em um dos grandes desafios de nossa sociedade. Além disso, os biocombustíveis são considerados menos poluentes, já que sua combustão emite uma menor taxa de monóxido de carbono, compostos sulfurados e hidrocarbonetos aromáticos (XUE et al., 2011; AN et al., 2011; SANTORI et al., 2012). Como vantagem adicional, estes combustíveis podem ser obtidos a partir de recursos como biomassa (cana de açúcar, milho, microalgas, oleaginosas), resíduos graxos e dejetos. Todo combustível originado desses tipos de recursos, são chamados de biocombustíveis e atualmente seu emprego e concepção são difundidos pelo mundo (KNOTHE, 2010).

Os biocombustíveis de maior importância são: biodiesel, bioetanol e biogás. Entretanto, os combustíveis líquidos assumem atualmente o papel mais importante no setor bioenergético, pois outras fontes renováveis alternativas aos biocombustíveis líquidos ainda estão muito aquém na pesquisa e tecnologia, principalmente na área dos transportes terrestre, marinho e aéreo que utilizam majoritariamente propulsores movidos a combustíveis líquidos. Até mesmo avanços em outros setores energéticos como de energia elétrica e nuclear, mostram-se em desenvolvimento lento, seja por elevados custos, barreiras tecnológicas e/ou limitações de recursos quando comparados aos biocombustíveis (RICHARD, 2011; AN et al., 2011).

Apesar de todos os avanços tecnológicos que as energias renováveis requerem para causar uma queda significativa na necessidade do consumo de energias de origem fóssil, e efetivamente engajar na sociedade contemporânea como métodos rotineiros de obtenção de energia, o mundo atual vive em uma era onde a busca pela sustentabilidade, tanto nutricional quanto energética, está em pauta nas principais reuniões de autoridades mundiais e eventos científico-tecnológicos na atualidade, mesmo que isso supere outras preocupações como

qualidade, velocidade e flexibilidade produtiva (SOBRINO et al., 2011; JUPESTA, 2012).

Sustentabilidade não é um termo novo, no entanto, só agora é difundido pela sociedade científica e governamental, ainda estando por atingir as grandes massas populacionais. O conceito original foi criado em 1987 no “Relatório de Bruntland” em uma comissão mundial sobre meio ambiente e desenvolvimento realizada pela Organização das Nações Unidas (ONU, 1987), que define sustentabilidade como um desenvolvimento que permite atender as necessidades da geração atual, sem comprometer a capacidade das gerações futuras de atenderem suas próprias necessidades.

#### **4.2. Classificação dos biocombustíveis**

Biocombustíveis podem ser classificados principalmente em dois grandes grupos, em função da fonte usada para sua produção. Denomina-se biocombustível de primeira geração, aquele originado de vegetais como milho, canola, cana-de-açúcar, palma, etc. Em comum, todos são concorrentes diretos na alimentação de humanos, o que causaria competição por áreas de cultivo, de modo que terras férteis estariam sendo usadas para fins energéticos e não no intuito de nutrir populações, levando à alta no preço dos alimentos (GOH & LEE, 2011; NAIK et al., 2010).

Por outro lado, os biocombustíveis de segunda geração não competem com a produção de alimentos, já que são produzidos a partir de biomassa vegetal não comestível, ricos em lignocelulose, ou ainda obtidos de vegetais modificados biotecnologicamente para se adaptarem a condições adversas de cultivo, assim favorecendo o uso de terras ideais para produção de alimentos, enquanto que regiões com clima e solo desfavorável (como por exemplo, temperaturas extremas, condições pluviométricas inadequadas, solo ácido e etc.), possam cultivar plantas para produção de energia (NAIK et al, 2010; HAVLIK et al., 2011; CARRIQUIRY et al., 2011). Também se incluem nessa classificação, combustíveis obtidos a partir de microalgas e resíduos de outros processos, como é o caso dos resíduos graxos animais provindos de matadouros-frigoríficos de bovinos, suínos e aves, que utilizam o residual lipídico (sebo, banha e óleo respectivamente) para serem convertidos em biodiesel (CUNHA et al., 2011; NIGAN & SINGH, 2011; HAVLIK et al., 2011). Por ser

uma fonte abundante, os resíduos graxos de matadouros podem ser uma matéria-prima promissora em grandes potências agropecuárias como Estados Unidos e Brasil, por exemplo. Este último possui o maior rebanho industrial de bovinos (cerca de 45 milhões de cabeças de gado) além de ser o maior exportador de carne de frangos do mundo (COELHO et al., 2012).

Alguns pesquisadores sustentam a ideia de uma terceira geração de biocombustíveis, oriundas de biomassa microbiana como bolores e leveduras, onde usam como substrato, resíduos agrários pré-tratados como casca de arroz hidrolisada, para produção e acumulação intracelular de lipídeos (HUANG et al., 2009; ZHU et al., 2008).

As tecnologias de uso de micro-organismos para produção de óleos, pareada com o anseio pelo melhor tratamento e aproveitamento de resíduos da produção agrária e agropecuária, impulsionam a sociedade para alcançar a sustentabilidade dos diversos setores envolvidos, de forma que esses fungos, bactérias e algas promovem a biorremediação desses resíduos causando benefícios ambientais e econômicos, seja tornando esses compostos menos impactantes ou aplicando processos de transformação para sua valorização e reciclagem (SINGH et al., 2011; DISMUKES et al., 2008).

#### **4.3. Lipídios: Matéria-prima para biodiesel**

Biologicamente, os lipídeos exercem funções estruturais e de reserva de energia para os seres vivos, além de servirem como veículos de cofatores enzimáticos lipossolúveis como as vitaminas A, E, D e K. Apresenta-se no organismo animal, majoritariamente, na forma de ácidos graxos de cadeia linear e número par de átomos de carbono. Uma definição geral distingue os lipídeos em apolares ou neutros e polares, sendo que estes apresentam além da ligação éster da união do ácido graxo e do álcool, outras funções químicas como é o caso dos fosfolipídeos, cerebrosídeos e outros mais complexos. Por sua vez, os glicerídeos, carotenóides, terpenóides, esteróides e as ceras pertencem ao grupo dos apolares (ORDÓÑEZ, 2005).

Os glicerídeos são componentes básicos de lipídeos neutros, geralmente insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. São constituídos por uma molécula de glicerol, na qual estão esterificadas uma, duas ou três moléculas de

ácidos graxos de alto peso molecular denominadas respectivamente por mono, di ou triglicerídeos, sendo esta última, a forma mais abundante na natureza (ORDÓÑEZ, 2005; BOBBIO & BOBBIO, 1992). Também podem ser divididos em óleos e gorduras de acordo com seu estado físico a temperatura ambiente, onde lipídeos que são encontrados no estado líquido são considerados óleos enquanto que as gorduras são sólidas. Segundo Solomons & Fryhle (2009), os dois principais fatores que regem essa classificação são o grau de insaturação e o ponto de fusão.

A Fig. 1 a seguir, ilustra duas moléculas de glicerídeos, a primeira contendo duas moléculas de ácido esteárico (18:0) e uma de ácido oléico (18:1, n-9) ligadas ao glicerol (a), a segunda molécula representa um glicerídeo com cadeias lineares compostas por três ácidos esteáricos ligados ao glicerol (b).

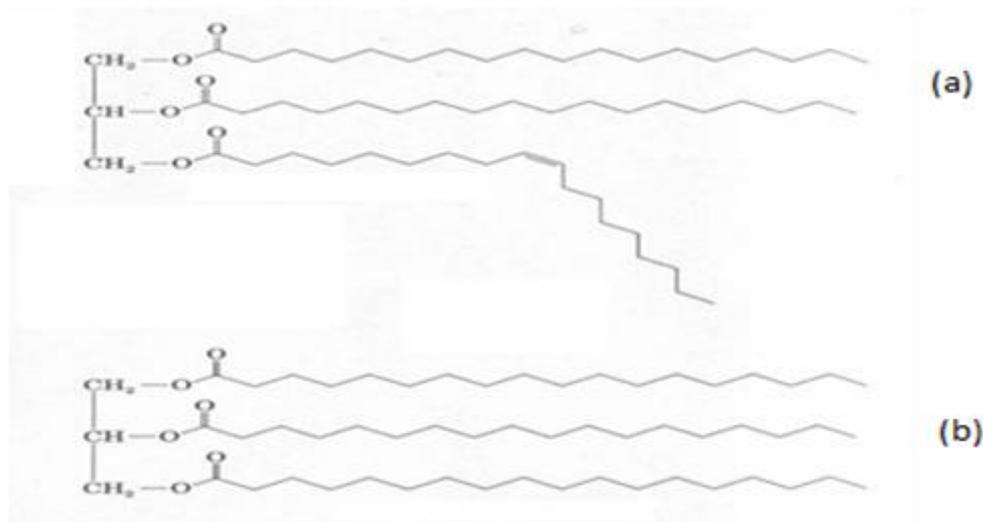


Figura 1: Moléculas de triglicerídeo – (a) contendo um ácido graxo insaturado; (b) composta exclusivamente por ácidos graxos saturados (MARQUES et al., 2012b)

Segundo Bobbio & Bobbio (1992), o ponto de fusão de ácidos graxos está relacionado com a capacidade que as moléculas têm de aproximarem uma as outras permitindo que ocorra ação de forças de Van der Waals (atração entre moléculas de polaridades semelhantes) entre elas e conseqüentemente aumentando a energia necessária para ocasionar um afastamento entre elas, resultando em um ponto de fusão mais elevado. Assim, incidem proporcionalmente nessa propriedade o número de átomos de carbono e a existência de ligações trans ao longo da cadeia carbonada, enquanto que inversamente proporcional ao ponto de fusão influi o número de pontos de insaturação da molécula, pois causam impedimento estérico

entre as cadeias resultando em forças de Van der Waals mais fracas, baixando o ponto de fusão (TURATTI et al., 2002; ATKINS & LORETA, 2006).

Por apresentar maior número de insaturações nas cadeias de ácidos graxos, os triglicerídeos vegetais são chamados de óleos enquanto que os animais de gorduras. Tecnicamente, essa propriedade confere aos óleos vegetais uma maior aplicabilidade para processos e bioprocessos, pois seu estado líquido favorece reações e transformações dessa matéria-prima em produtos alimentícios e biocombustíveis (ANASTOPOULOS et al., 2009).

A Tab. 1 a seguir representa o teor de ácidos graxos presentes em gorduras animais e óleos vegetais, e seus respectivos Pontos de Fusão (PF).

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

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

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

\* Não detectado

A análise da composição de ácidos graxos constitui o primeiro passo para a avaliação da qualidade do óleo bruto e/ou seus produtos de transformação. Para a determinação da composição, em termos de ácidos graxos, podem ser utilizados

métodos cromatográficos (cromatografia líquida e gasosa) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (NETO et al., 2000).

#### 4.4. Biodiesel

Tecnicamente, biodiesel é definido como um éster alcoólico (metílico ou etílico) produzido através de uma reação de transesterificação com um álcool e um catalisador químico ou enzimático, proveniente de fontes renováveis de energia como óleos vegetais ou gorduras animais, resultando em uma mistura de ésteres de ácidos graxos e como subproduto o glicerol. Esse biocombustível está atrelado a utilização em motores de ignição por compressão, também conhecidos como motores a ciclo-diesel, e que atenda as especificações estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP). (BRASIL, 2005; FERRARI et al, 2005).

A reação de produção do biodiesel baseia-se na reação estequiométrica do alquil glicerol com álcool em presença de um catalisador formando ésteres alquílicos e glicerol (DEMIRBAS, 2008). A figura 2 a seguir representa o processo global de transesterificação de lipídeos sendo que esse sistema é uma sequência de três reações reversíveis e consecutivas em que os mono e dialciligliceróis são os intermediários.

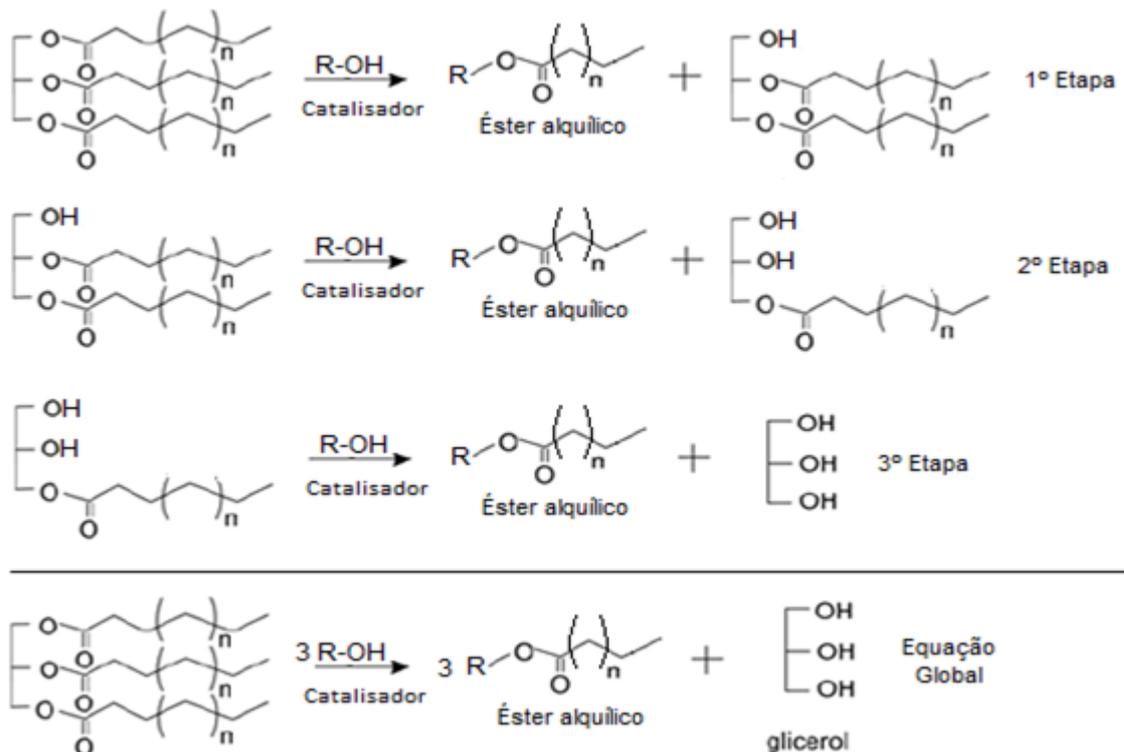


Figura 2: Sistema global de transesterificação de lipídeos (MARQUES et al., 2012b)

Segundo Mendow et al. (2011), os alcoóis que podem ser utilizados na reação de transesterificação são os alifáticos, apresentando somente hidroxilas primárias ou secundárias e sua cadeia principal contendo de um a oito átomos de carbono, sendo que os mais importantes nesse processo são o metanol e o etanol.

O emprego do metanol para transesterificação é impulsionado por razões econômicas e operacionais do processo, pois tem menor custo, é isento de água, tem menor cadeia e tem maior polaridade que o etanol, favorecendo a separação do éster metílico do glicerol formado, no entanto, este álcool possui maior toxicidade e maior inflamabilidade, limitando seu uso em grandes escalas (STAMENKOVIC et al., 2007; TAUFIQ-YAP et al., 2011).

Um revés importante do uso de metanol é evidenciado quando usamos gordura animal como matéria-prima para o biodiesel, Ma et al. (1998a) relatam que a solubilidade da gordura bovina em metanol é de apenas 8% v/v a 45°C chegando a 19% v/v a 100°C, enquanto que ao substituir esse álcool por etanol, a solubilidade varia de 23% v/v em 45°C e finalmente chega a 100% a partir de 68°C, esse fato é explicado devido ao acréscimo de um grupamento metileno na cadeia do álcool, fazendo com que o etanol possua uma apolaridade maior que o metanol, e assim solubilizando a gordura animal em condições mais amenas.

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

No processo de catálise ácida, a esterificação é realizada por ácidos fortes, normalmente ácido sulfúrico, obtendo rendimentos próximos a 99%, em contraponto, exige temperaturas em torno dos 100°C por aproximadamente 3 horas, além de utilizar álcool em excesso para só assim garantir a reação. Essa rota reacional torna-se onerosa suficiente para impedir a produção em escalas superiores a laboratoriais (VAN GERPEN, 2005).

O processo químico alcalino (usando base como catalisador), é menos corrosivo que a reação em meio ácido, promove um menor gasto energético e um menor tempo de transesterificação (STAMENKOVIC et al., 2007). Porém, existe uma

limitação no uso de catálise alcalina quando a matéria-prima apresenta certo teor de ácidos graxos livres, pois eles competem pelo catalisador dando início a reação de saponificação paralela a transesterificação, levando a queda no rendimento dos ésteres pela dificuldade de separação do biodiesel da fração de glicerina, além da perda de catalisador que se torna irrecuperável (LOTERO et al., 2005; MA et al., 1998a).

Um meio de contornar essa situação é realizar uma pré-esterificação dos ácidos graxos livres com um catalisador ácido para somente então prosseguir com a transesterificação por via alcalina dos trialcilgliceróis (CANAKCI & VAN GERPEN, 2001). Encinar et al. (2011) utilizaram resíduo graxo bovino na síntese de biodiesel, e reportam que o limiar para a obtenção do melhor rendimento de ésteres é  $5,86 \text{ mg KOH.g}^{-1}$  de amostra, resultando em 99,7% (m/m%) de conversão.

Outra característica indesejável da matéria-prima animal ou vegetal é o teor de umidade. Assim como os ácidos graxos livres, a água interfere negativamente na síntese de biodiesel por via alcalina, pois promulga a formação de sabão e emulsões, dificultando o processo de separação das fases do glicerol e dos ésteres, e por consequência, decaindo o rendimento da reação (MA et al., 1998b).

O processo de transesterificação enzimática é mais lento que os químicos, entretanto permite condições de operação mais leves acarretando na redução de gastos energéticos e evita a corrosão dos equipamentos (MU et al., 2008).

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

Dentre os micro-organismos que possuem o gene responsável pela produção desse tipo particular de enzima está o *Staphylococcus xylosus*, uma bactéria gram-positiva, não patogênica, comumente encontrada em produtos cárneos fermentados. É importante no processamento desses produtos, pois libera para o meio compostos importantes na formação do sabor e aroma característico pela sua atividade proteolítica e lipolítica. (FIORENTINI et al., 2009; FIEGLER & BRÜCKNER, 1997).

#### 4.5. *Staphylococcus xylosus* – Características gerais

Pertencente a família das *Micrococcaceae*, o *Staphylococcus xylosus* é uma bactéria mesófila, gram-positiva, em aerobiose apresenta crescimento ótimo, podendo ainda ser anaeróbio facultativo, porém com desenvolvimento menos significativo. É amplamente empregado pela indústria de alimentos em produtos fermentados. Esta última característica é conferida devido a sua capacidade de produzir compostos corantes, flavorizantes e de redução de nitratos, a partir da hidrólise de proteínas e lipídios, servindo como uma das culturas iniciadoras, juntamente com bactérias ácido-láticas, no processamento de queijos e produtos cárneos fermentados em geral (CICHOSKI et al., 2011; MANSOUR et al., 2009; OLESEN & STAHNKE, 2004).

A Food and Drug Administration (FDA), órgão americano que controla a segurança de alimentos e medicamentos, reconhece o *Staphylococcus xylosus* como seguro para ser aplicado na indústria alimentícia e farmacêutica através do certificado GRAS (do inglês, Generally Recognized As Safe). A principal característica que diferencia esse micro-organismo das bactérias patogênicas do mesmo gênero como o *S. aureus* e *S. intermedius*, é sua incapacidade de produzir exoenzimas do tipo coagulase, que formam um complexo aglutinante com as fibrinas do sangue causando a coagulação sanguínea (USA, 2004; MOSCHETTI et al., 1997).

#### 4.6. Densidade Ótica

A análise de densidade ótica é uma ferramenta rápida e eficiente na análise quantitativa de solutos em um determinado solvente e quando aplicada a microbiologia, fornece uma forma alternativa à contagem em placas (metodologias oficiais para enumeração de unidades formadoras de colônias), já que este tipo de análise apresenta, apesar de excelente precisão, uma limitação quanto ao tempo até a obtenção de colônias visíveis para contagem, podendo variar de 24h até 72h.

A determinação da densidade ótica baseia-se na emissão de um feixe de luz sobre um prisma, passando por um controlador de comprimento de onda seguindo para uma solução com o composto a ser analisado. A radiação sofrerá refração de acordo com a concentração do composto na solução e um detector ao final do tubo avalia a diferença entre a quantidade de luz emitida da fonte e a quantidade que foi

detectada, medindo então em quantidade de radiação absorvida, ou simplesmente absorbância (SILVA & QUEIROZ, 2006).

A quantificação de um determinado composto é feito a partir da repetição da análise com soluções padrão e traço de curva padrão. Aplicado à microbiologia, a densidade ótica permite uma rápida análise da concentração celular presente em uma amostra aquosa. Nesse caso, a análise padrão é a contagem em placas ou aplicação da técnica do número mais provável, no entanto, essas técnicas microbiológicas levam pelo menos 48h do momento da coleta até a leitura dos resultados, tempo este mínimo necessário para que as colônias de microorganismos cresçam até se tornarem visíveis a olho nu. Dessa forma a densidade ótica se torna uma importante ferramenta de análise complementar pela sua rapidez na obtenção dos resultados (BARANYL & ROBERTS, 1994).

Contudo, ela apresenta uma falha quando aplicada a microbiologia, pois como se baseia em uma propriedade física para mensurar a concentração, esse método não diferencia células ativas e mortas, pois ambas refratarão o feixe de luz gerando um resultado falso-positivo. Assim, esse método só é recomendado para avaliação da concentração celular em amostras aquosas quando o crescimento bacteriano é anterior à fase estacionária de crescimento, onde o número de células mortas se equivale ao número de células ativas (MYTILINAIOS et al., 2012).

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Coleta das amostras**

As amostras dos resíduos graxos foram coletadas em frigoríficos abatedouros da região sul do estado do Rio Grande do Sul, de animais recém-abatidos e antes da operação de lavagem das carcaças, dando preferência a gorduras com o menor resquício de sangue possível.

Para os resíduos de suínos e bovinos, foram coletadas amostras do invólucro graxo dos rins dos animais, com massa aproximada de 0,6kg e 1,5kg respectivamente, a coleta nesse ponto da linha de processamento visou facilitar as futuras operações de limpeza, contribuindo para a homogeneidade das amostras entre si. Os resíduos foram gentilmente doados pelas empresas: Frigorífico Castro S.A. (suínos) e Frigorífico Famile S.A. (bovinos) ambos situados em Pelotas-RS.

Para os resíduos de frangos, as amostras foram obtidas da operação de toalete das carcaças, sendo coletados cerca de 2kg de resíduo a partir da higienização do dorso das mesmas. Os resíduos de frango foram doados pelo Frigorífico COSULATI situado no município de Morro Redondo-RS.

As amostras foram coletadas em sacos plásticos estéreis e transportadas em caixa térmicas com gelo para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas. Realizado o fracionamento das amostras, uma parcela foi congelada para futuras análises e o restante submetidos imediatamente a fermentação proposta no experimento. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **5.2. Teor de umidade**

Para obtenção do teor de umidade dos resíduos graxos frescos de bovinos, suínos e de frangos, foram pesadas 5g de gordura animal em cadinhos previamente tarados e levados para estufa a 105°C. Foi realizada a pesagem das amostras em intervalos de 1h a partir da segunda hora sob secagem até a obtenção de peso

constante, conforme metodologia indicada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

### 5.3. Teor de acidez livre

O teor de acidez livre foi mensurado utilizando adaptação do método KS M ISO 6618 (Korean Standard Association, 2003) para produtos oriundos do petróleo e lubrificantes por método titulométrico. Foram pesadas 5g de resíduo graxo animal em frasco erlenmeyer e adicionados 50 mL de solução de éter etílico/etanol (2:1 v/v) como solvente. Foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1% e após 1 h em repouso, a solução foi titulada com KOH 0,1N até o aparecimento e permanência da cor rósea.

O índice de acidez é expresso pela massa de KOH necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes na amostra por g de amostra (mg KOH.g<sup>-1</sup>). O teor de acidez livre foi calculado de acordo com a Eq. 1 a seguir.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{V \cdot N}{m} \quad (1)$$

Onde,  $\text{Índice de acidez}$  é o valor da acidez (mg KOH.g<sup>-1</sup>),  $V$  é o volume de KOH consumido na titulação (mL),  $N$  é a normalidade do hidróxido de potássio, e  $m$  é a massa de amostra (g).

### 5.4. Culturas bacterianas

Culturas estoques de *S.xylosus* AD1 e U5 isoladas a partir de fermentação de produtos cárneos, estão armazenadas em ultra-freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (MICROBIAL) da UFPel. Semestralmente, é realizado repique das colônias para tubos inclinados com ágar BHI (Brain-Heart Infusion Agar, HIMEDIA – M211) e armazenados sob refrigeração (4°C). A partir destas colônias, foi realizado o cultivo em caldo BHI de acordo com metodologia descrita por Fiorentini et al. (2009), até obtenção da concentração celular inicial para o processo.

### 5.5. Pré-enriquecimento

Para cada operação, foi preparado um tubo com 10 mL de caldo BHI (HIMEDIA – M210) conforme instrução contida no rótulo, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Foi transferido assepticamente para esse tubo uma alçada de culturas estoques de *S.xylosus* AD1 e uma alçada de *S.xylosus* U5 e incubados em estufa a 35 ± 0,1°C por um *Overnight* de forma a retirar as células do estado de latência (MANSOUR et al., 2009).

Após o período de um *Overnight*, 1L de caldo BHI previamente esterilizado foi inoculado com 10 mL do meio pré-enriquecido e incubado a 35 ± 0,1°C e 100rpm em câmara incubadora com agitação orbital (shaker). A fim de manter a concentração inicial de células na fermentação constante, foi construída a curva de crescimento bacteriana. Dessa forma foi averiguado que é necessário um tempo de incubação de 3h para atingir a concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL de meio de cultivo.

### 5.6. Crescimento bacteriano

Foram transferidos assepticamente 2mL do caldo com as culturas pré-enriquecidas para um erlenmeyer com 200mL de caldo BHI estéril, submetido a fermentação em incubadora shaker a 35 ± 0,1°C e 100rpm ao longo de 8h, conforme metodologia descrita por Mauriello et al. (2004) e adaptado de Fiorentini et al. (2009).

No tempo inicial, a partir da primeira hora e em intervalos de 1,5h, foram coletadas amostras do mosto e inoculadas em ágar BHI para contagem de colônias, utilizando a técnica do espalhamento em superfície onde 0,1mL da amostra foi assepticamente transferido para as placas e espalhadas pela superfície com auxílio de alça de Drigalski. As diluições seriadas utilizadas no experimento estão descritas na Tab. 2 a seguir.

Tabela 2 – Diluições aplicadas para confecção da curva de crescimento

Tempo (h)	Diluições (10 <sup>x</sup> )											
	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12
1,5		x	x	x	x							
3,0				x	x	x	x	x				
4,5						x	x	x	x	x		
6,0							x	x	x	x	x	
7,5								x	x	x	x	x

Paralelamente à contagem em placas, foi realizada análise da densidade ótica das amostras para cada tempo de fermentação em espectrofotômetro (Hitachi U 2010) a 630nm, conforme metodologia sugerida por Kanasaki et al. (1975), onde 1mL do mosto foi transferido para a cubeta específica do espectrofotômetro e conduzida a leitura em absorbância.

#### 5.6.1. Curva de crescimento

Foram construídas curvas de crescimento bacteriano a partir dos resultados obtidos do cultivo. Duas curvas foram traçadas relativas a concentração de unidades formadoras de colônias e para a análise de densidade ótica, utilizando regressão linear com ajuste a modelo exponencial (Eq. 2) e polinomial (Eq. 3) respectivamente utilizando o software *Statistica 7.0* da *StatSoft Inc.* (MONTGOMERY & RUNGER, 2012; JEONG et al., 2009).

$$y = \sum \beta_0 \cdot e^{\beta_1 x} \quad (2)$$

$$y' = \sum \beta_2 x^2 + \beta_1 x + \beta_0 \quad (3)$$

Onde,  $y$  (concentração de colônias na amostra em UFC.mL<sup>-1</sup>) e  $y'$  (valor da densidade ótica em absorbância) são as variáveis resposta, “ $x$ ” (tempo de incubação em horas) a variável independente e “ $\beta$ ” são as constante do processo.

### 5.7. Fermentação das gorduras animais

As amostras de gorduras animais foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e após adição dos respectivos volumes de caldo BHI, foram levadas a homogeneizador de alimentos tipo “*Stomacher*” por 2 min e transferidas para erlenmeyers estéreis onde o volume total do mosto foi de 200 mL. Os frascos foram dispostos em incubadora “shaker” para início da fermentação, sob  $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$  e 100 rpm. As condições de fermentação obedeceram ao delineamento experimental descrito na Tab. 3 a seguir.

Tabela 3 – Delineamento experimental aplicado na fermentação de gorduras animais

Gordura Animal	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes
	Tempo de fermentação (h)	Concentração de gordura (%)	
1 Sebo bovino	1,5	2	Ponto de fusão (AOCS, 2009)
		4	
		6	
		8	
		10	
2 Banha suína	4,5	50	
		60	
		70	
		80	
3 Gordura de Frango	7,5	90	

3 amostras x 5 tempos x 10 concentrações = 150 experimentos x 3 repetições = 450 resultados

Ao atingir cada tempo analítico alvo, a fermentação foi interrompida e foram coletadas assepticamente uma amostra de aproximadamente 1g de cada erlenmeyer, correspondente as dez diferentes concentrações em teste, submetendo-as a análise de ponto de fusão.

### 5.8. Análise do ponto de fusão

Tubos de ensaio contendo aproximadamente 1g de amostra foram parcialmente imersos em balão com água e submetidos a aquecimento em manta

térmica, elevando lentamente a temperatura desde 30°C até 80°C. Este método adaptado da American Oil Chemists Society (AOCS, 2009) propõe a detecção de três temperaturas que caracterizam o ponto de fusão de ácidos graxos, constatando três temperatura, correspondentes a três ácidos graxos, diferentes ou não, que compõem um triacilglicerol. Dessa forma, é possível identificar uma temperatura de início da fusão ( $T_i$ ), que é aquela que caracteriza a fusão do ácido graxo que liquefaz com a menor temperatura, a segunda, denominada temperatura de pico ( $T_{pico}$ ), característica do ácido graxo de ponto de fusão intermediário, e por fim, a temperatura da fusão completa ( $T_f$ ), onde o último ácido graxo do triacilglicerol é liquefeito, obtendo como produto final somente triacilgliceróis cristalizados (RODRIGUEZ-RACT et al., 2010). A Fig. 3 a seguir mostra o aparato utilizado para obtenção do ponto de fusão.



Figura 3 - Aparato aplicado para determinação do ponto de fusão

### 5.9. Análise estatística

Os dados experimentais correspondentes aos pontos de fusão foram tabulados, seguido de Análise de Variância (ANOVA). A Diferença Mínima Significativa (DMS) entre as médias dos resultados foram analisadas por teste de Tukey à nível de 5% de significância (MONTGOMERY & RUNGER, 2012).

Para a construção das superfícies de resposta referente a variação do PF em relação a temperatura de fusão, concentração de gordura e tempo de fermentação ( $T \times C \times t$ ), foi considerada somente a temperatura de pico das amostras, pois ambas temperaturas iniciais e de fusão completa são afetadas pela quantidade de amostra utilizada na análise (KNOTHE & DUNN, 2009).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Teor de umidade e acidez

Através dos dados apresentados na Tab. 4 a seguir, podemos identificar que o sebo bovino e a gordura de frango apresentaram umidade inferior a 0,02% enquanto que a banha suína apresentou valor de umidade de 0,07%.

Os parâmetros encontrados podem ser explicados pela estrutura morfológica das amostras coletadas. A gordura renal suína apresentou um extensivo invólucro membranoso externo e interno, o que pode ter contribuído para uma maior retenção de água nessa amostra. Por se tratar de uma amostra in natura, a membrana presente no tecido adiposo contribuiu ainda para a retenção de sangue no interior da gordura. A Fig. 4 a seguir, mostra um comparativo entre as gorduras de suínos e frangos não fermentados nos frascos erlenmeyers depois da adição do meio de cultura.

Tabela 4 - Propriedades físicas das gorduras animais não fermentadas

Propriedades	Sebo Bovino	Banha Suína	Gordura de Frango	Método
Umidade (%)	0,01 ± 0,012	0,07 ± 0,035	0,018 ± 0,01	Secagem em estufa (AOAC, 1995)
Acidez (mg KOH.g <sup>-1</sup> )	0,102 ± 0,01	0,204 ± 0,01	0,102 ± 0,01	Titulometria (KS M ISO 6618)



Figura 4 - Apresentação comparativa entre as amostras de gordura suína (esquerda) e de frangos (direita) antes do processo fermentativo

A principal consequência da contaminação por sangue no momento da síntese do biodiesel seria o aumento dos custos de processo para remoção desse interferente, e por consequência elevando a umidade da amostra, prejudicando a separação do biodiesel na fase de purificação, e reduzindo a atividade dos catalisadores (VAN GERPEN, 2005).

A umidade da gordura bovina e da de frango foram inferiores ao limite máximo estabelecido pela literatura de 0,06%, portanto, dentro dos parâmetros adequados para sofrerem transesterificação por qualquer via catalítica sem a necessidade de passarem por operação de secagem (MA et al., 1998b). Por outro lado, a gordura suína apresentou umidade de 0,07%, sendo recomendada a remoção da mesma até teores dentro do limiar caso seja desejado a aplicação de catálise alcalina para transesterificação (VAN GERPEN, 2005).

As amostras de resíduo graxo bovino e de frango apresentaram índices de acidez de  $0,102\text{mg KOH.g}^{-1}$  enquanto que a gordura suína  $0,204\text{mg KOH.g}^{-1}$ , valores dentro do ideal para produção de biocombustível segundo Ma et al. (1998b), que relatam que o índice de acidez das gorduras animais não ultrapassem  $1\text{ mg KOH.g}^{-1}$  para o emprego de catálise básica, caso contrário, deve ser conduzida uma

pré-esterificação dos ácidos graxos livres para reduzir esse teor, ou ainda uma saponificação com hidróxido de sódio. Como as amostras foram coletadas e uma parcela delas foi imediatamente submetidas a temperatura de refrigeração e utilizadas no experimento em período inferior a 24h, era esperado o baixo índice de acidez livre indicando lipídios em bom estado de conservação (CHEN & LUO, 2011; CAO et al., 2008). Alptekin e Canakci (2011) produziram biodiesel a partir de gordura de frango depois de reduzir a acidez livre de 1,34 mg KOH.g<sup>-1</sup> para 0,22mg KOH.g<sup>-1</sup> utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% e metanol na proporção de 40:1 por 80min e 60°C.

Apesar de que a gordura bovina e suína tenha sido coletada nos mesmos pontos dentro da linha de processamento de cada frigorífico, o resíduo graxo suíno apresentou uma significativa quantidade de tecido membranoso na parte externa e principalmente, na parte interna por entre o tecido adiposo que envolve os rins, essa membrana contribuiu para a captura de água da própria linha de processamento em seu tecido, conforme foi verificado pela Fig. 4.

## 6.2. Curva de crescimento

A Fig. 5 representa a curva de crescimento bacteriano que relaciona a concentração de UFC ao longo do tempo de cultivo.

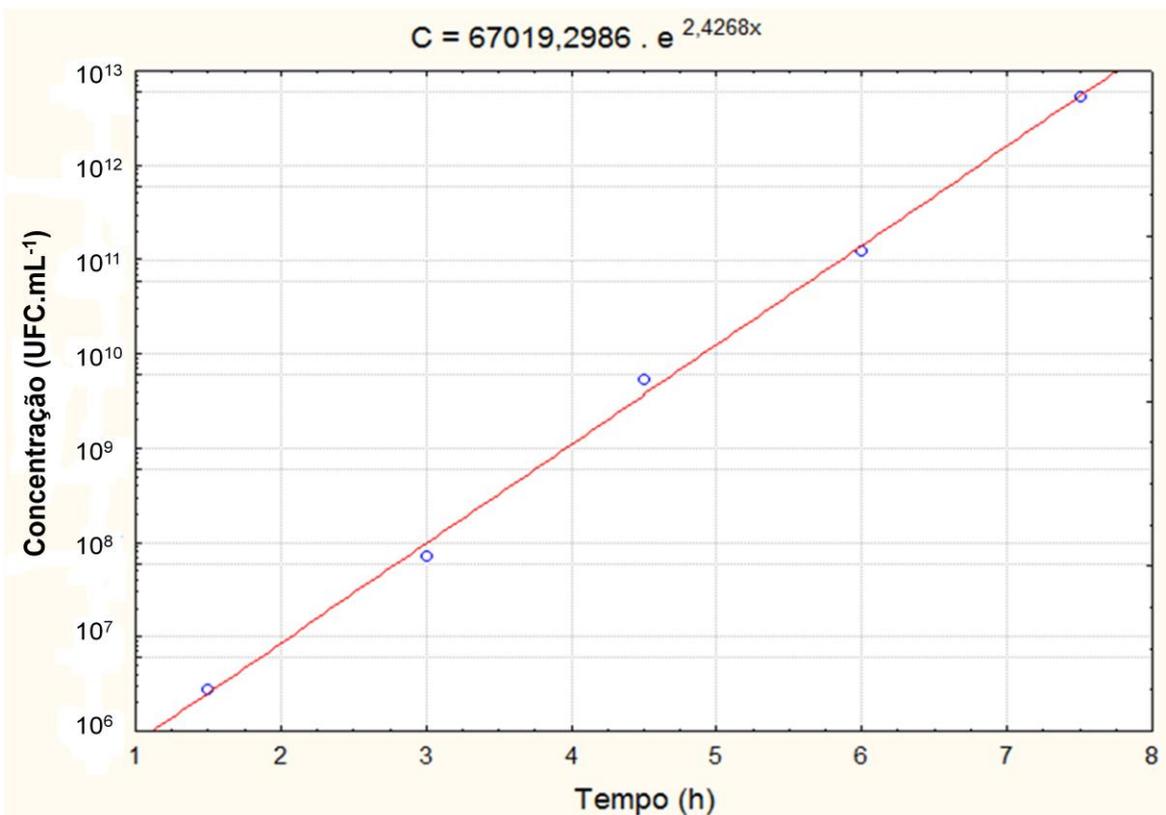


Figura 5 - Modelo de crescimento bacteriano ao longo do tempo de pré-enriquecimento  
( $r^2 = 0,9885$ ;  $p < 0,01$ )

A equação que caracteriza o processo apresentado pela Fig. 5, nos permite calcular o tempo necessário para atingir a concentração de unidades formadoras de colônia desejada, assim, arbitrando  $C = 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$  obtemos:

$$C = 67019,2986 \cdot e^{2,4268x} \quad (4)$$

$$C = 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$$

$$x = 3,011\text{h} = 3\text{h } 39,6\text{s} \equiv 3\text{h}$$

Desse modo, portanto, observamos que é necessário 3h de pré-enriquecimento para obtermos a concentração inicial de células para prosseguir com a fermentação. Como uma ferramenta complementar para modelagem e controle do processo, foi traçada também a curva da variação da densidade ótica ao longo do tempo, representada pela Fig. 6 a seguir.

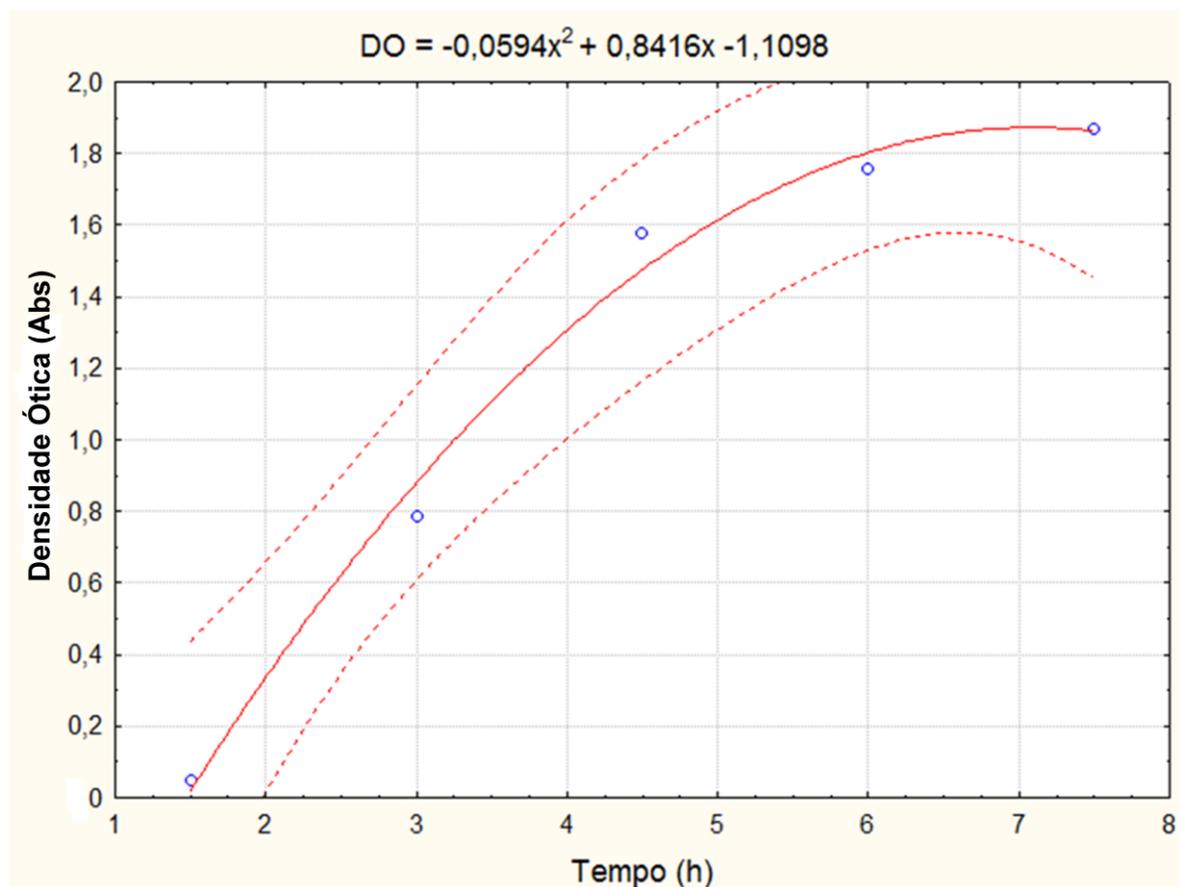


Figura 6 - Modelo de crescimento bacteriano avaliado pela densidade ótica ao longo do tempo de pré-enriquecimento ( $r^2 = 0,9417$ ;  $p < 0,01$ )

A linha contínua na Fig. 6 representa o perfeito ajuste ao modelo polinomial ( $r^2 = 1$ ) enquanto que as linhas tracejadas delimitam os limites do ajuste em nível de

95% de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), mostrando adequado ajuste ao modelo pois os pontos do intervalo estão contidos dentro desses limites. Ainda analisando a mesma figura, podemos utilizar o tempo calculado através da Eq. 4 ( $x = 3h$ ) e substituir na equação que define o gráfico da Fig. 6 (Eq. 5) temos assim:

$$DO = -0,0594x^2 + 0,8416x - 1,1098 \quad (5)$$

$$x = 3,011h ; DO = 0,8893$$

A Fig. 6 representa a fase exponencial de crescimento bacteriano até o início da fase estacionária a partir das 7h de enriquecimento. Através da Eq. 5 obtivemos  $DO = 0,8893$ , diferentemente da  $DO = 0,4$  encontrada por Fiorentini et al. (2009) que avaliaram o crescimento de culturas de *S. xylosus* AD1 e U5 ao longo de 24h de fermentação em caldo BHI.

Quanto a concentração de colônias, foi possível chegar a  $10^8$  colônias por mL de meio de cultura em apenas 3h de incubação, enquanto que o mesmo trabalho citado anteriormente chegou a esta concentração em tempo superior a 5h. O fato de o crescimento ter sido acelerado no presente trabalho pode ser explicado, pela submissão das cepas de *S.xylosus* a um período de aproximadamente 14h (*Overnight*) de incubação prévia, a fim de retirar as células do seu estado de latência imposta pela refrigeração, dessa forma, uma multiplicação em menor tempo foi possível (MAURIELLO et al., 2004).

### 6.3. Ponto de fusão

#### 6.3.1. Sebo Bovino

A Tab. 5 mostra as temperaturas médias de fusão obtidas durante a fermentação de resíduos graxos bovinos.

**Tabela 5 – Pontos médios de fusão de gordura bovina ao longo da fermentação**

Concentração (%)	PF (°C)				
	Tempo de fermentação (h)				
	1,5	3,0	4,5	6,0	7,0
2	65,50 <sup>1,a</sup>	57,75 <sup>2,a</sup>	58,00 <sup>2,a</sup>	57,75 <sup>2,a</sup>	57,25 <sup>2,a</sup>
4	63,25 <sup>1,a</sup>	58,50 <sup>2,a</sup>	57,50 <sup>2,a</sup>	57,75 <sup>2,a</sup>	57,25 <sup>2,a</sup>
6	63,75 <sup>1,a</sup>	57,75 <sup>2,a</sup>	57,50 <sup>2,a</sup>	53,75 <sup>3,ab</sup>	54,75 <sup>3,ab</sup>
8	63,75 <sup>1,a</sup>	59,25 <sup>2,a</sup>	57,25 <sup>2,a</sup>	53,75 <sup>3,ab</sup>	51,00 <sup>4,b</sup>
10	62,50 <sup>1,a</sup>	59,25 <sup>2,a</sup>	56,75 <sup>3,a</sup>	49,00 <sup>4,cd</sup>	48,00 <sup>4,bcd</sup>
50	49,75 <sup>1,c</sup>	45,75 <sup>2,d</sup>	46,25 <sup>2,c</sup>	45,25 <sup>2,d</sup>	44,50 <sup>2,d</sup>
60	52,00 <sup>1,bc</sup>	45,50 <sup>2,d</sup>	45,50 <sup>2,c</sup>	46,25 <sup>2,cd</sup>	46,00 <sup>2,cd</sup>
70	55,50 <sup>1,b</sup>	46,50 <sup>2,cd</sup>	47,00 <sup>2,bc</sup>	48,75 <sup>2,cd</sup>	48,75 <sup>2,bc</sup>
80	53,50 <sup>1,bc</sup>	51,50 <sup>2,b</sup>	51,00 <sup>2,b</sup>	49,50 <sup>23,c</sup>	48,25 <sup>3,bcd</sup>
90	54,50 <sup>1,b</sup>	50,50 <sup>2,bc</sup>	50,50 <sup>2,b</sup>	49,75 <sup>2,bc</sup>	47,25 <sup>3,bcd</sup>

\* letras iguais nas colunas e números iguais nas linhas não apresentam diferença significativa, letras diferentes nas colunas e números diferentes nas linhas apresentam diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ )  
 Ponto de fusão inicial =  $74^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ .

Com esses dados apresentados, podemos verificar uma estabilidade relativa ao ponto de fusão dos resíduos não fermentados até a concentração de 10%, no primeiro tempo de fermentação. Contudo, ao aumentar a concentração de gordura no meio para teor acima de 50%, uma queda significativa no ponto de fusão foi encontrada, passando de aproximadamente  $62,5^{\circ}\text{C}$  para  $49,7^{\circ}\text{C}$ .

É possível averiguar também, uma elevação no ponto de fusão quando aumentamos a concentração de gordura bovina no meio para acima de 70%, ficando esses teores, portanto, como um intermediário entre as concentrações iniciais que apresentaram ponto de fusão mais elevado e gorduras fermentadas em concentrações de 50 e 60% que apresentaram as temperaturas de fusão menores nesse tempo de reação.

Através das médias dos pontos de fusão expressos nas Tab. 5, podemos representar na Fig. 7 a seguir, a variação do PF do sebo bovino fermentado em função da temperatura de fusão, concentração de gordura e tempo de fermentação -  $PF_{(T \times C \times t)}$ .

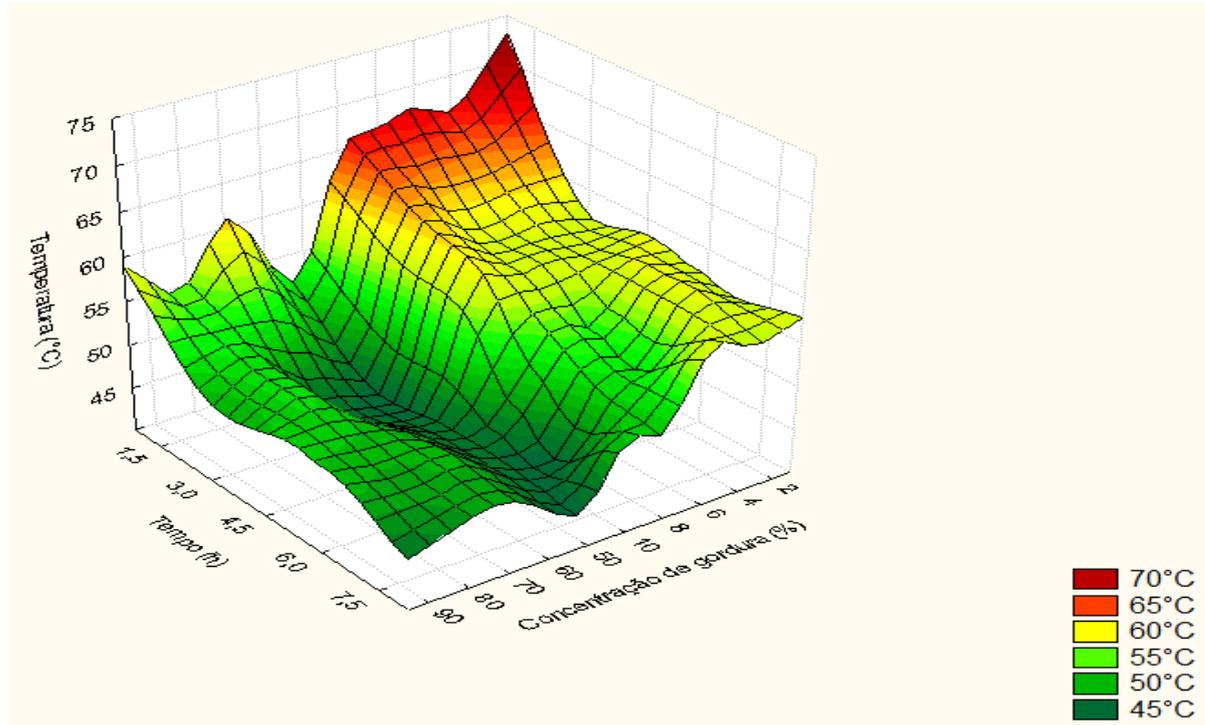


Figura 7 - Gráfico de superfície de resposta da variação do  $PF_{(T \times C \times t)}$  de sebo bovino

A superfície apresentada na Fig. 7 mostra um ponto de fusão próximo ao da gordura bovina in natura quando usado 10% ou menos de sebo bovino no caldo fermentativo. Essa tendência somente começa a apresentar mudanças após 7,5h de fermentação quando o ponto de fusão chega a 48°C na concentração de 10%, faixa de temperatura atingida já na primeira hora e meia de reação quando aumentamos a concentração de gordura para 50%.

Tal comportamento pode ser explicado pela maior quantidade de meio de cultivo presente no reator, logo, em concentrações de gorduras inferiores, há um grande aporte de nutrientes de fácil absorção, permitindo o crescimento celular sem a necessidade de produção de lipases para metabolização da gordura animal. A medida que o teor de gordura se eleva no meio, há uma menor disponibilidade de nutrientes do meio de cultura, induzindo as bactérias a produzirem lipases para iniciar a metabolização de carbono a partir dos resíduos graxos ocasionando a quebra da cadeia carbonada dos triglicerídeos e conseqüentemente a queda no ponto de fusão (HORN et al., 2007; TANO-DEBRAH et al., 1999).

O gráfico representado pela Fig. 7 pode ainda ser representado em forma de contorno (Fig. 8) para melhor visualização do comportamento do PF nas variáveis testadas no experimento.

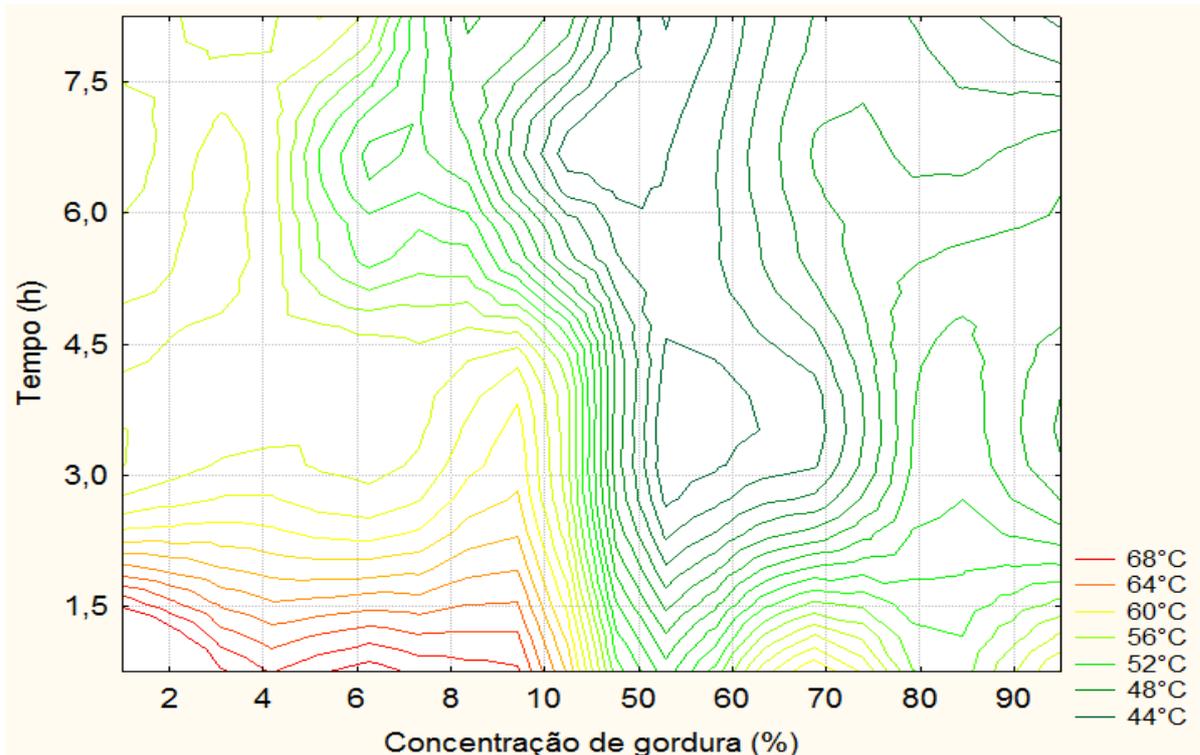


Figura 8 - Gráfico de contorno da variação do  $PF_{(T \times C \times t)}$  de sebo bovino

Através da Fig. 8, é possível identificar uma zona de convergência a níveis inferiores de pontos de fusão já a partir da primeira hora e meia de fermentação quando aumentamos a concentração de gordura no meio de cultura para patamares superiores a 50%, apresentando elevação no ponto de fusão a partir de 70% de gordura no mosto. Contudo, temperaturas de fusão mais amenas podem ser obtidas com 70% de gordura no meio a partir de 3h de fermentação. A queda na atividade metabólica e consequente ponto de fusão mais elevado nas faixas acima de 70% pode ser explicado pela atividade de água abaixo do ideal para o desenvolvimento do *S.xylosum* causada por elevada concentração de resíduo graxo animal (CARPINE et al., 2010; KENNEALLY et al., 1998).

Com concentrações inferiores a 6%, a queda em 10°C no ponto de fusão só foi detectada após 7,5h de fermentação, essa mesma faixa de temperatura foi detectada em 4,5h de fermentação com concentrações de 8 e 10%. Como ótimo operacional, foi possível observar que em 3h de fermentação foi suficiente para causar a queda de aproximadamente 25°C no ponto de fusão nas concentrações de 50 e 60% chegando ao entorno de 45°C na temperatura de pico (LIDE, 2007).

As condições de processo ótimas para atingir as menores temperaturas de fusão de resíduos graxos bovinos, foram 70% de gordura e 30% de caldo BHI,

submetidos a fermentação de *S.xylosus* por no mínimo 3h, obtendo uma redução no ponto de fusão de 73°C – 75°C (gordura in natura) para 46°C (KNOTHE & DUNN, 2009). Considerando que a matéria-prima é um resíduo agroindustrial, é desejada sua máxima utilização possível sem que prejudique o processo. Se elevarmos o tempo de fermentação para próximo de 7h, talvez fosse possível utilizar uma concentração de gordura no meio que tendesse a 80%, contudo, para avaliar se o incremento na concentração é viável, visto que um maior tempo de fermentação implica em maior consumo de energia, se faz necessária uma análise econômica para avaliar se o processo sob essas condições seria interessante do ponto de vista econômico, tecnológico e ambiental.

### 6.3.2. Banha Suína

A Tab. 6 mostra as temperaturas médias de fusão obtidas durante as 7,5h de fermentação de resíduos graxos suínos.

Tabela 6 - Pontos médios de fusão de gordura suína ao longo da fermentação

Concentração (%)	PF (°C)				
	Tempo de fermentação (h)				
	1,5	3,0	4,5	6,0	7,0
2	65,50 <sup>1,ab</sup>	54,75 <sup>2,a</sup>	42,50 <sup>3,b</sup>	46,75 <sup>3,b</sup>	57,25 <sup>2,ab</sup>
4	66,25 <sup>1,a</sup>	56,25 <sup>2,a</sup>	45,75 <sup>3,ab</sup>	47,50 <sup>3,ab</sup>	57,00 <sup>2,ab</sup>
6	56,50 <sup>1,c</sup>	45,50 <sup>23,b</sup>	42,00 <sup>3,b</sup>	49,50 <sup>2,ab</sup>	58,25 <sup>1,ab</sup>
8	61,75 <sup>1,abc</sup>	47,00 <sup>3,b</sup>	43,25 <sup>3,ab</sup>	47,00 <sup>3,b</sup>	53,75 <sup>2,bc</sup>
10	58,75 <sup>1,bc</sup>	44,00 <sup>3,b</sup>	42,50 <sup>3,b</sup>	49,75 <sup>2,ab</sup>	59,50 <sup>1,ab</sup>
50	57,75 <sup>1,c</sup>	44,75 <sup>2,b</sup>	44,25 <sup>2,ab</sup>	47,50 <sup>2,ab</sup>	61,00 <sup>1,ab</sup>
60	58,25 <sup>12,bc</sup>	44,25 <sup>4,b</sup>	48,75 <sup>3,ab</sup>	54,75 <sup>2,a</sup>	60,50 <sup>1,ab</sup>
70	63,50 <sup>1,abc</sup>	46,00 <sup>2,b</sup>	47,25 <sup>2,ab</sup>	49,00 <sup>2,ab</sup>	60,50 <sup>1,ab</sup>
80	57,00 <sup>2,c</sup>	47,00 <sup>3,b</sup>	50,75 <sup>3,a</sup>	51,00 <sup>3,ab</sup>	63,00 <sup>1,a</sup>
90	57,50 <sup>1,c</sup>	47,00 <sup>23,b</sup>	44,50 <sup>3,ab</sup>	51,00 <sup>2,ab</sup>	48,75 <sup>2,c</sup>

\* letras iguais nas colunas e números iguais nas linhas não apresentam diferença significativa, letras diferentes nas colunas e números diferentes nas linhas apresentam diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ )  
Ponto de fusão inicial = 68°C  $\pm$  1,2°C.

Através da Tab. 6 acima, é possível observar uma que houve uma diferença significativa entre quatro pontos com pontos de fusão mais elevados (referentes as concentrações 2, 4, 8 e 70%) e as cinco concentrações com menores pontos de fusão (6, 50, 60, 80 e 90%) em 1,5h de processo fermentativo. Apesar da diferença

entre a maior e a menor temperatura média de fusão ser de em média 10°C, não há indícios de que a concentração de gordura suína no meio seja um fator importante no gradiente de temperatura de fusão como foi no caso do sebo bovino.

Podemos realizar uma análise crítica do processo em geral ao avaliarmos o comportamento do ponto de fusão, através das médias dos pontos de fusão expressos na Tab. 6, podemos então representar na Fig. 9 a seguir, a variação do PF do sebo bovino fermentado em função da temperatura de fusão, concentração de gordura e tempo de fermentação -  $PF_{(T \times C \times t)}$ .

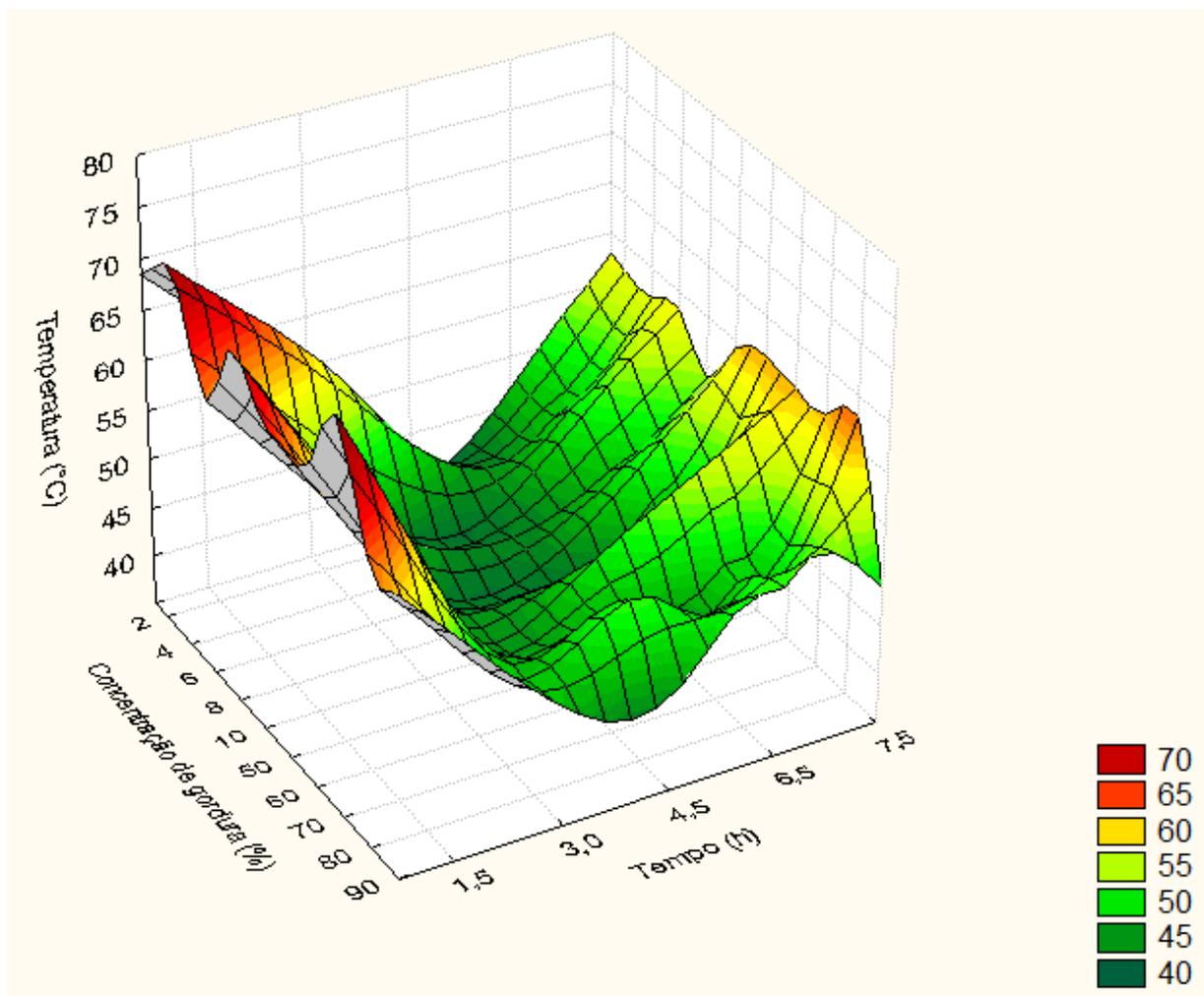


Figura 9 - Gráfico de superfície de resposta da variação do  $PF_{(T \times C \times t)}$  de banha suína

Através da Fig. 9 podemos identificar uma mudança no comportamento da temperatura média de fusão da gordura suína quando comparada a gordura bovina. Enquanto que o processo anterior mostrou uma tendência de queda no ponto de fusão já a partir da 1,5h de fermentação e concentração de 50%, a gordura suína começou a mostrar quebra singela de cadeia carbonada após 3h de fermentação,

sendo somente após 4,5h que ocorrerá um decréscimo no ponto de fusão mais significativo.

Podemos visualizar melhor o gráfico representado na Fig. 9 sob forma de contorno (Fig. 10) a seguir.

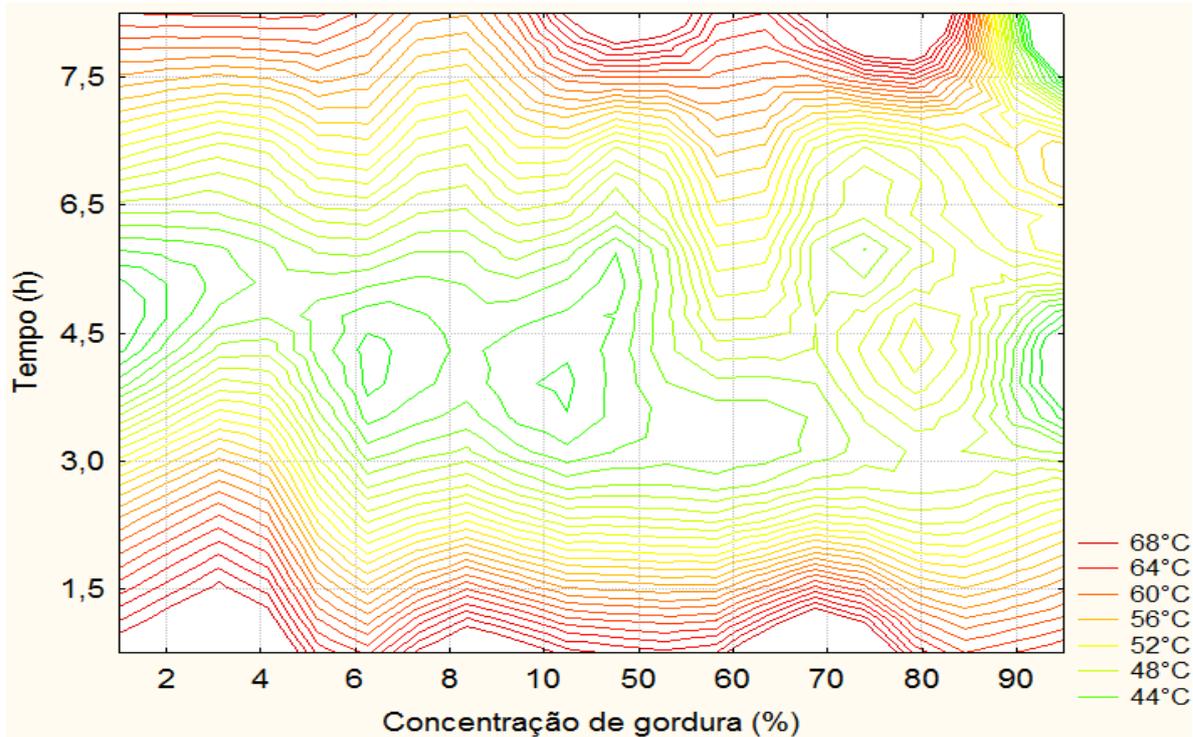


Figura 10 - Gráfico de contorno da variação do  $PF_{(T \times C \times t)}$  de banha suína

Através da Fig. 10 podemos observar o desvio no padrão encontrado anteriormente na fermentação de sebo bovino. Além de apresentar variação de -20°C somente a partir das 4,5h transcorridas, o aumento da concentração de gordura não afeta positivamente a atividade microbiana sobre o tecido adiposo suíno, onde sob efeito desse tempo o teor de gordura menor (2%) apresenta o mesmo nível de ponto de fusão que 60% de lipídios no meio.

Outro ponto diferencial único da gordura suína que merece destaque é o fato da temperatura de fusão voltar a se elevar à medida que o tempo de fermentação transcorre, mesmo em concentrações onde o ponto de fusão já havia caído para níveis inferiores a 50°C. A provável explicação são as camadas de membranas sucessivas encontradas na gordura do invólucro renal dos suínos, formando uma barreira à ação do *S.xylosus*. Essa decadência e conseguinte aumento do ponto de fusão sugerem que, uma camada membranosa mais externa foi hidrolisada pelas bactérias, sendo necessário cerca de 2h de reação metabólica para tal quebra

ocorrer, e somente assim a cadeia carbonada dos ácidos graxos pode iniciar a ser fracionada (COMA, 2008; COOKSEY, 2005).

O seguinte incremento no ponto de fusão a partir de 6h de fermentação sugere que uma nova camada mais interna de membrana foi encontrada pelas bactérias, cessando a ação direta nos triglicerídeos, forçando-as a adaptarem seu metabolismo e produzir enzimas capazes de hidrolisar as membranas, permitindo novo contato com os triacilgliceróis, promulgando seu crescimento no meio (MANSOUR et al., 2005; ZHOU, 2003). Zhou et al. (2012) reportam que mudanças bruscas em condições de operação de processos industriais e laboratoriais envolvendo micro-organismos causam distúrbios em seu metabolismo e atividade fisiológica podendo favorecer ou frear o crescimento microbiano devido ao tempo de adaptação necessário para replicação do DNA e replicação do RNA em novos compostos que permitam a ele se desenvolver. Diante desses resultados, a coleta de gordura suína livre de tecidos membranosos se faz necessária para otimizar a ação das lípases do *S. xylosus*.

A partir de 70% de resíduo graxo no mosto, podemos observar uma elevação no nível de temperatura de fusão quando comparado com as concentrações menores de banha suína, comportamento este, observado também nas gorduras bovinas, sugerindo uma baixa atividade de água no mosto, insuficiente para tornar a dispersão de células homogênea na totalidade das amostras dentro dos frascos.

No caso da gordura suína, os pontos de fusão mais baixos foram obtidos após 4,5h de fermentação, decaindo de iniciais 67°C- 68°C para temperaturas na faixa de 42°C (KNOTHE & DUNN, 2009). Contudo, não houve relação aparente entre a concentração de gordura utilizada na fermentação. É importante ressaltar, que a membrana presente em toda a extensão da amostra de resíduo graxo suíno, interferiu negativamente no processo pelo bloqueio imposto as bactérias para ação nos triglicerídeos, imperando as células a produzirem enzimas capazes de transpassar esse empecilho e continuar a degradar a gordura. Aliado a isso, os resquícios de sangue também contribuiriam de forma negativa para a produção de biodiesel, sendo necessária uma operação de lavagem extra para remoção deste tipo de contaminante do tecido adiposo, contribuindo para o aumento da umidade da amostra e conseqüentemente, obrigando o emprego de uma etapa de secagem. Para utilização de gordura suína em um futuro processo fermentativo, um estudo de amostragem deve ser feito, considerando possíveis envoltórios presentes que

dificultem a ação das enzimas de *S.xylosus*, além de contaminantes que venham prejudicar, tanto a fermentação, como a viabilidade do processo de conversão dessas gorduras em biodiesel.

### 6.3.3. Gordura de Frango

Os pontos de fusão da gordura de frango estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Pontos médios de fusão de gordura de frango ao longo da fermentação

Concentração (%)	PF (°C)				
	Tempo de fermentação (h)				
	1,5	3,0	4,5	6,0	7,0
2	43,50 <sup>3,b</sup>	56,50 <sup>1,bc</sup>	49,00 <sup>2,d</sup>	50,00 <sup>2,a</sup>	46,75 <sup>23,a</sup>
4	43,75 <sup>3,b</sup>	53,50 <sup>1,c</sup>	49,50 <sup>12,cd</sup>	49,25 <sup>2,a</sup>	45,75 <sup>3,a</sup>
6	44,25 <sup>3,b</sup>	53,25 <sup>1,c</sup>	51,50 <sup>1,abcd</sup>	50,00 <sup>12,a</sup>	47,25 <sup>23,a</sup>
8	46,25 <sup>2,ab</sup>	56,50 <sup>1,bc</sup>	55,75 <sup>1,abc</sup>	49,75 <sup>2,a</sup>	46,25 <sup>2,a</sup>
10	47,25 <sup>1,ab</sup>	46,25 <sup>1,d</sup>	49,75 <sup>1,bcd</sup>	49,00 <sup>1,a</sup>	47,00 <sup>1,a</sup>
50	45,00 <sup>2,b</sup>	44,50 <sup>2,d</sup>	48,75 <sup>1,d</sup>	47,25 <sup>12,a</sup>	45,00 <sup>2,a</sup>
60	48,25 <sup>2,ab</sup>	45,25 <sup>2,d</sup>	56,00 <sup>1,ab</sup>	47,25 <sup>2,a</sup>	45,50 <sup>2,a</sup>
70	51,50 <sup>12,a</sup>	50,75 <sup>12,cd</sup>	53,50 <sup>1,abcd</sup>	51,75 <sup>12,a</sup>	48,25 <sup>2,a</sup>
80	52,50 <sup>2,a</sup>	62,75 <sup>1,ab</sup>	51,50 <sup>23,abcd</sup>	53,00 <sup>2,a</sup>	48,50 <sup>3,a</sup>
90	52,25 <sup>34,a</sup>	65,00 <sup>1,a</sup>	57,00 <sup>2,a</sup>	53,50 <sup>23,a</sup>	49,50 <sup>4,a</sup>

\* letras iguais nas colunas e números iguais nas linhas não apresentam diferença significativa, letras diferentes nas colunas e números diferentes nas linhas apresentam diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ )

Ponto de fusão inicial =  $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Através da Tab. 7 acima, podemos observar que houve diferença significativa entre as amostras com concentração de gordura superior a 70% e as inferiores a 6% e a com 50%, mas em nível diferente daquele averiguado nas gorduras bovinas, no caso dos resíduos graxos de frango, as menores concentrações apresentaram uma maior queda no ponto de fusão após 1,5h de fermentação, variando entre  $43,5^{\circ}\text{C}$  e  $45^{\circ}\text{C}$ . De qualquer forma, essa faixa de temperatura já é mais marcante nesse tipo de gordura do que nas demais, que precisaram passar por um maior tempo de processo fermentativo para atingir esses níveis.

A Fig. 11 representa a variação do PF da gordura de frango fermentado em função da temperatura de fusão, concentração de gordura e tempo de fermentação -  $\text{PF}_{(T \times C \times t)}$ , podendo avaliar o processo como um todo.

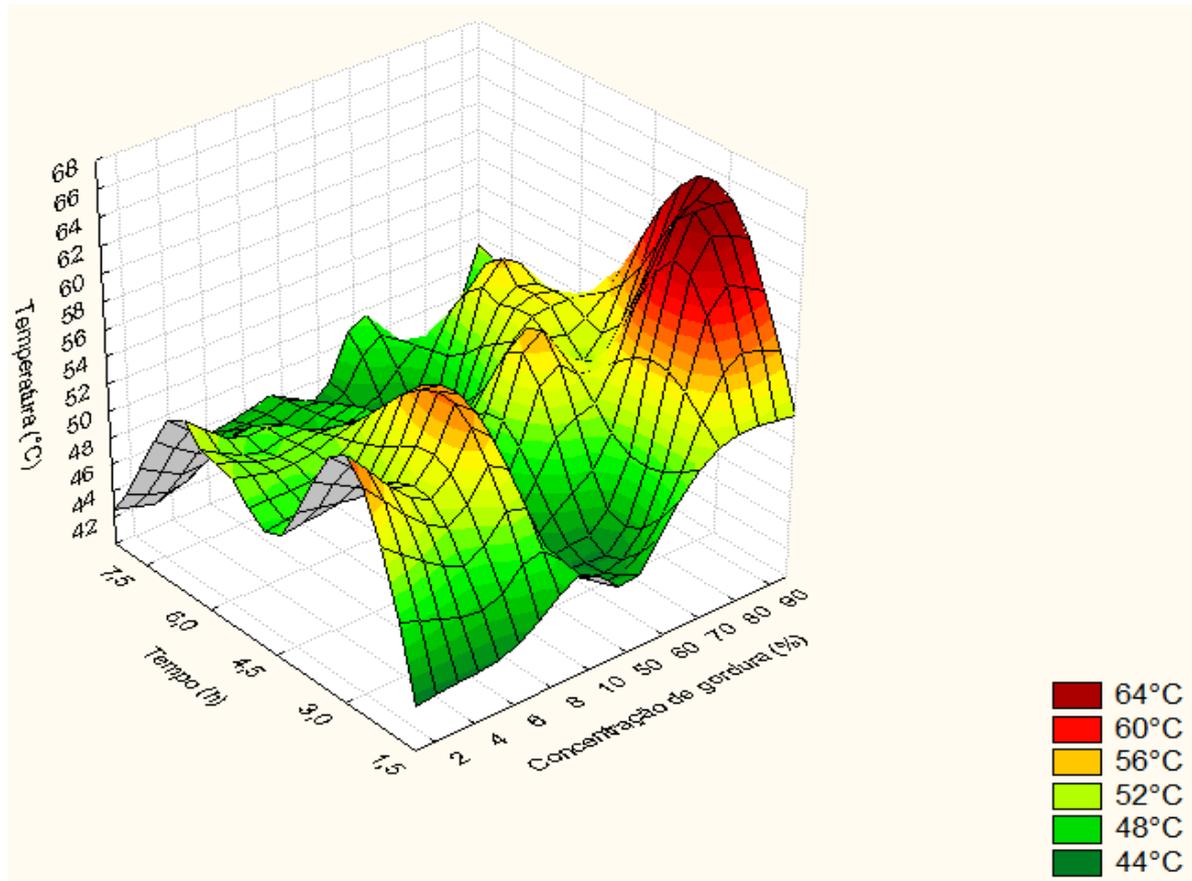


Figura 11 - Gráfico de superfície de resposta da variação do  $PF_{(T \times C \times X)}$  de gordura de frango

O gráfico representado pela Fig.11 acima, nos permite observar um padrão diferente de curvas de temperaturas de fusão de resíduo graxo de frango. Destacamos a similaridade aos resíduos bovinos quando identificamos uma zona de baixo ponto de fusão no entorno da concentração de 50% de gordura animal no mosto. Podemos acrescentar ressaltar ainda, o resultado positivo apresentado nas fermentações de baixa concentração de lipídios também já na primeira hora e meia de processo, tendendo a acréscimo no ponto de fusão a medida que o tempo de fermentação é transcorrido.

Claramente podemos identificar um pico de alta temperatura de fusão no começo da fermentação até 4,5h nas concentrações de 80 e 90%.

Traçando um gráfico de contorno (Fig.12), a partir da Fig. 11, podemos analisar os níveis de temperatura de fusão atingida ao longo do processo.

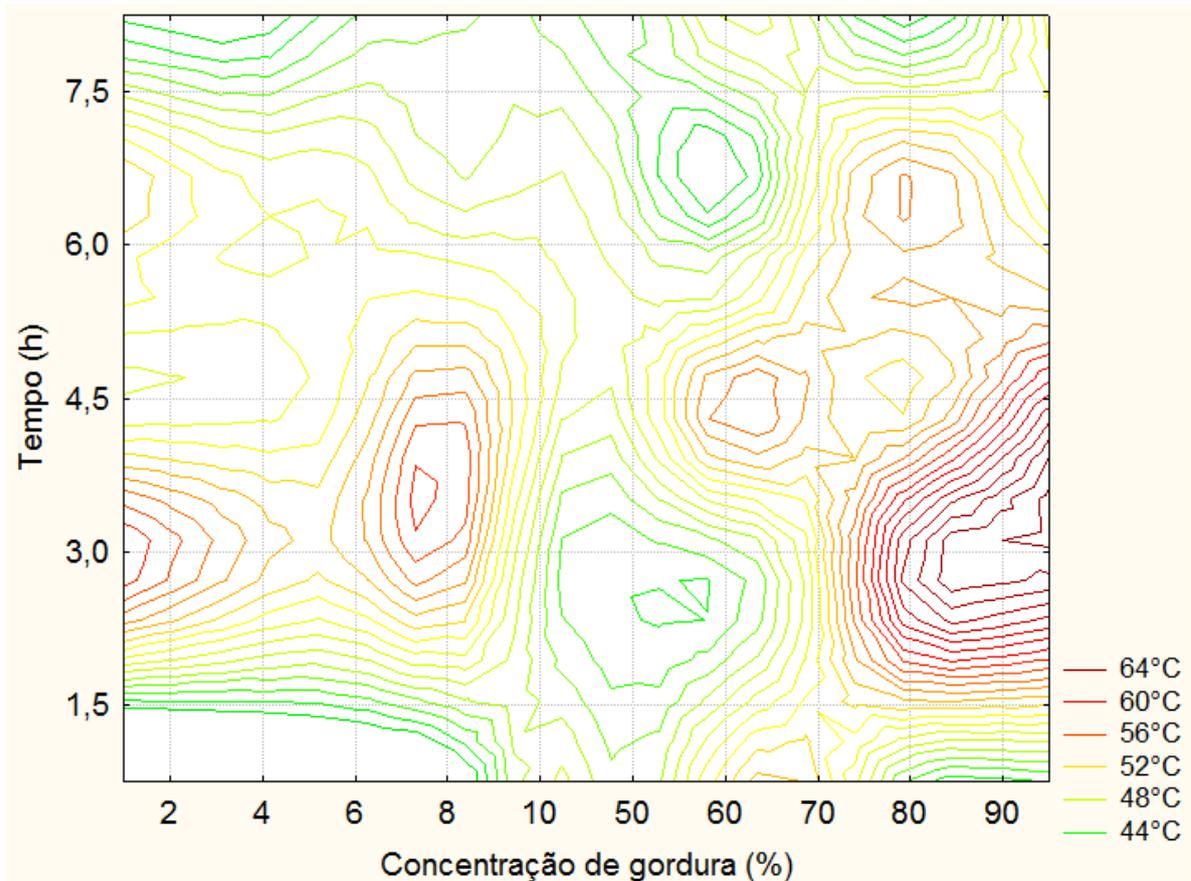


Figura 12 - Gráfico de contorno da variação do  $PF_{(T \times C \times t)}$  de gordura de frango

Podemos observar que o processo de fermentação de gordura de frango possui um ótimo operacional na faixa de 3h de fermentação, onde é possível usar entre 50 e 60% de gordura animal. Analisando as concentrações de 70% e superiores, notamos novamente uma queda ínfima no ponto de fusão das amostras, ocorrendo somente queda de níveis em tempo próximo a 7,5h, a causa principal é a alta concentração de gorduras e volume de água insuficiente para garantir a ação bacteriana em toda a massa de gordura (OLESEN & STAHNKE, 2004).

Guru et al. (2010) relatam que aditivos e processos alternativos são necessários para viabilizar o uso de resíduos graxos de frangos para produção de biodiesel, pois há perdas de álcool utilizado na reação de transesterificação por evaporação ao atingir a temperatura de fusão da gordura de frango que, segundo o autor, é de 68°C, sendo necessário o uso de um volume maior de álcool, elevando os custos do processo. Além disso, a alta temperatura causa degradação dos ácidos graxos, diminuindo a quantidade de matéria-prima disponível para produção de biocombustível.

As discontinuidades do padrão da temperatura de fusão nas concentrações inferiores a 60% e a partir de 3h de processo podem ser explicadas pela total liquefação e diluição da gordura no meio de cultura, visto que a técnica do ponto de fusão foi aplicada a massa ainda sólida contida nos frascos erlenmeyer. A Fig. 13 a seguir mostra o meio de cultivo com grandes glóbulos de gordura diluídos na então dispersão.



Figura 13 – Gordura de frango liquefeita durante o processo fermentativo em (a) 4,5h e (b) 6h de reação para a concentração de 50% de resíduo graxo

Podemos identificar visualmente na figura acima, que uma parcela da gordura foi liquefeita pela ação do *S.xylosus* e estava presente sob a forma de óleo em temperatura ambiente, a formação dos glóbulos de óleo formados pode ser evidenciada pela insolubilidade da gordura no meio de cultura. Este fato pode ser explicado pela composição química dos triacilgliceróis de frango. Comparado com as gorduras bovinas e suínas, os triglicerídeos de aves possuem um maior aporte de ácidos graxos insaturados (C18:1), conforme visto na Tab. 1 anteriormente, que possuem um ponto de fusão inferior aos ácidos graxos saturados, indicando que uma menor atividade lipolítica já favoreceria que o ponto de fusão sofresse queda.

Neste estudo, o óleo formado pela fermentação não foi coletado e, portanto seu ponto de fusão não foi determinado, justificando o fato de que os resultados dos pontos de fusão das amostras não terem sido inferiores a temperatura de incubação (35°C).

Os resíduos graxos de frango apresentaram a maior queda no ponto de fusão em 1,5h de fermentação e com 2% de gordura no meio de cultura. Todavia, tendo em vista utilizar o maior volume de resíduos possíveis, é viável o uso de 50% de gordura para esse mesmo tempo de processo. O ponto de fusão teve queda de iniciais 66°C para 45°C ao final de 1,5h. Uma peculiaridade observada, é que na fermentação de gordura de frango houve a formação de glóbulos de óleo no meio de cultura, sendo que este produto não pôde ser analisado pela metodologia proposta, sendo necessário o emprego de uma operação de separação do óleo e do meio de cultura para determinação de seu ponto de fusão, tais como centrifugação, ou filtração por membranas (KLEN & VODOPIVEC, 2012; COUTINHO et al., 2009).

De modo geral, das três fontes de resíduo graxo estudados neste trabalho, as gorduras de bovinos são as que não necessitam de operações secundárias para ajusta-la, tanto a fermentação, quando a produção de biodiesel. As gorduras de frango também apresentam boa aplicabilidade, realizando os devidos ajustes para a coleta do óleo liquefeito, unindo com a gordura restante da fermentação, dando seguimento para a transesterificação. Ambas as gorduras podem servir de alvo para estudos futuros sobre a otimização do processo aplicado neste trabalho, pois apresentaram grande diminuição em seus pontos de fusão, dessa contribuindo para a produção em maiores escalas de biodiesel oriundo dessas fontes.

As gorduras de suínos apresentaram uma queda no ponto de fusão relativamente aceitável, no entanto, tecidos extras inerentes dessa gordura presente no tecido adiposo do invólucro renal dificulta as operações e reações que dariam seguimento a produção de biodiesel em escalas superiores a laboratoriais, visto que, a etapa de higienização de carcaças, da onde é coletada a amostra de resíduo graxo, é a etapa mais indicada para coleta de gordura suína sem contaminações de outros resíduos ou subprodutos.

## 7. Conclusão

Concluimos que a fermentação causada por *Staphylococcus xylosus* em gorduras de bovinos, frangos e suínos causam uma queda significativa em seus respectivos pontos de fusão devido a quebra na cadeia carbonada dos ácidos graxos, reduzindo os custos energéticos para liquefação da gordura, permitindo que processos químicos para obtenção do biodiesel sejam realizados em temperaturas mais amenas, reduzindo gastos e aumentando o rendimento da atividade.

Os resíduos graxos de bovinos e frangos podem ser submetidos a fermentação de *S.xylosus* a fim de causar a queda de seus pontos de fusão, baixando a energia gasta nas próximas etapas de obtenção de biodiesel e aumentando o rendimento das mesmas pela amenização das condições de processo necessárias para produção do biocombustível.

A gordura suína pode passar pelo processo fermentativo e obter queda aproximada de 24°C em sua temperatura de fusão, no entanto alguns cuidados quanto ao local de coleta da gordura dentro da planta agroindustrial deve ser tomados, pois a gordura suína apresenta membranas de revestimento de seu tecido adiposo, dificultando a ação dos micro-organismos, prejudicando a síntese de biodiesel pelo acúmulo de umidade e favorecendo a contaminação por resquícios de sangue da linha de processamento, o que eleva os custos de obtenção de biocombustível dessa matéria-prima.

Com esse pré-tratamento de gorduras animais, foi possível criar uma nova rota para valorização desses resíduos agroindustriais, abrindo portas para novos estudos na área, desviando um subproduto de baixíssimo valor agregado e o escoando para transformação de um produto de superior qualidade, reduzindo o montante levado a estações de tratamento de efluentes e centrais de resíduos da empresa, cortando gastos, contribuindo para a manutenção do meio ambiente e promulgando a sustentabilidade da cadeia produtiva de forma que mais impostos, trabalho e renda são gerados de uma mesma atividade.

## 8. Referências

ALPTEKIN, E.; CANAKCI, M. Optimization of transesterification for methyl ester production from chicken fat. **Bioresource Technology**. v.102, p.6385-6391, 2011.

AN, H.; WILHELM, W. E.; SEARCY, S. W. Biofuel and petroleum-based fuel supply chain research: A literature review. **Biomass and Bioenergy**. v.35, p.3763-3774, 2011.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY (AOCS). **AOCS Official Method Cj 1-94**. 2009.

ANASTOPOULOS, G.; ZANNIKOU, Y.; STOURNAS, S.; KALLIGEROS, S. Transesterification of vegetable oils with ethanol and characterization of the key fuel properties of ethyl esters. **Energies**. v.2, p.362-376, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. v.2, n.17. Gaithersburg EUA: AOAC, 1995.

ATKINS, P.; LORETTA, J. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3ªEd. Porto Alegre: Bookman. 2006.

BANERJEE, A.; CHAKRABORTY, R. Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production – A review. **Resources, Conservation and Recycling**. v.53, p.490-497, 2009.

BARANYL, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**. v.23, p.277-294, 1994.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução a química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1992.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Agência Nacional do Petróleo (ANP). Lei Nº 11.097 de 13 de Janeiro de 2005. **Introdução do biodiesel na matriz energética brasileira**. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria Recursos Hídricos e Ambiente Urbano. Lei Nº 12.305 de 02 de Agosto de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília, DF, 2010.

<sup>a</sup>BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Estatística da produção agrícola – Junho de 2011**. Brasília, DF, 2011.

<sup>b</sup>BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Estatística da produção pecuária**. Brasília, DF, 2011.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**. v.44, p.1429-1436, 2001.

CAO, F.; CHEN, Y.; ZHAI, F.; LI, J.; WANG, J.; WANG, X.; WANG, S.; ZHU, W. Biodiesel production from high acid value waste frying oil catalyzed by superacid heteropolyacid. **Biotechnology and Bioengineering**. v.101, p.93-100, 2008.

CARPINE, D.; DAGOSTIN, J. L. A.; SANTA, H. S. D.; ALVAREZ, D. C.; TERRA, N. N.; SANTA, O. R. D. Proteolytic and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal sausages. **Ambiência**. v.6, n.1, p.125-132, 2010.

CARRIQUIRY, M. A.; DU, X.; TIMILSINA, G. R. Second generation biofuels: Economics and policies. **Energy Policy**. v.39, p.4222-4234, 2011.

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

CHEN, Y. H.; LUO, Y. M. Oxidation stability of biodiesel derived from free fatty acids associated with kinetics of antioxidants. **Fuel Processing Technology**. v.92, p.1387-1393, 2011.

CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, A. P.; DI LUCCIO, M. Viability of *Staphylococcus xylosus* during shelf-life of *dulce de leche* prepared by vacuum evaporation. **Ciência Rural**. v.41, n.11, p.2026-2031, 2011.

COELHO, S. T.; MONTEIRO, M. B.; KARNIOL, M. R. **Atlas de Bioenergia do Brasil**. Centro Nacional de Referência em Biomassa (CENBIO). São Paulo. 2012.

CRAGO, C. L.; KHANNA, M.; BARTON, J.; GIULIANI, E.; AMARAL, W. Competitiveness of Brazilian sugarcane ethanol compared to US corn ethanol. **Energy Policy**. v.38, p.7404-7415, 2010.

COMA, V. A review: Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**. v.78, p.90-103, 2008.

COOKSEY, K. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. **Food Additives and Contaminants**. v.22, p.980-987, 2005.

COUTINHO, C. M.; CHIU, M. C.; BASSO, R. C.; RIBEIRO, A. P. B.; GONÇALVES, L. A. G.; VIOTTO, L. A. State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: A review. **Food Research International**. v.42, n.5-6, p.536-550, 2009.

CUNHA, J. A.; PEREIRA, M. M.; VALENTE, L. M. M.; DE LA PISCINA, P. R.; HOMS, N.; SANTOS, M. R. L. Waste biomass to liquids: Low temperature conversion of sugarcane bagasse to bio-oil. The effect of combined hydrolysis treatments. **Biomass and Bioenergy**. v.35, p.2106-2116, 2011.

DA CUNHA, M. E.; KRAUSE, L. C.; MORAES, M. S. A.; FACCINI, C. S.; JACQUES, R. A.; ALMEIDA, S. R.; RODRIGUES, M. R. A.; CAMARÃO, E. B. Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. **Fuel Processing Technology**. v.90, p.570-575, 2009.

DEMIRBAS, A. **Energy Conversion and Management**. v.49, p.125-130, 2008.

DISMUKES, G.C.; CARRIERI, D.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G. M.; POSEWITZ, M.C. Aquatic phototrophs : efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**. v.19, p.235–240, 2008.

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

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

FAO – Food and Agricultural Organization of United Nations. **Food Outlook: Global Market Analysis – June 2011**. Disponível em: <<http://www.fao.org/giews/english/fo/index.htm>>. Acesso em: 24 jul. 2011.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. **Química Nova**. v.28, p.19-23, 2005.

FIEGLER, H.; BRÜCKNER, R. Identification of the serine acetyltransferase gene of *Staphylococcus xylosus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.148, p.181-187, 1997.

FIORENTINI, A. M.; SAWITZKI, M. C.; BERTOL, T. M.; SANT'ANNA, E. S. Viability of *Staphylococcus xylosus* isolated from artisanal sausages for application as starter cultures in meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40, p.129-133, 2009.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Amsterdam. v.92, p.405-416, 2001.

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

GOH, C. S.; LEE, K. T. Second-generation biofuel (SGB) in Southeast Asia via lignocellulosic biorefinery: Penny-foolish but pound-wise. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.15, p.2714-2718, 2011.

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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. v.39, p.235-251, 2006.

HAVLÍK, P.; SCHNEIDER, U. A.; SCHMID, E.; BÖTTCHER, H.; FRITZ, S.; SKALSKÝ, R.; AOKI, K.; DE CARA, S.; KINDERMANN, G.; KRAXNER, F.; LEDUC, S.; McCALLUM, I.; MOSNIER, A.; SAUER, T.; OBERSTEINER, M. Global land-use implications of first and second generation biofuel targets. **Energy Policy**. v.39, p.5690-5702, 2011.

HINGU, S. M.; GOGATE, P. R.; RATHOD, V. K. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using sonochemical reactors. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.17, p.827-832, 2010.

HORN, S. J.; ASPMO, S. I.; EIJSINK, V. G. H. Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**. v.40, n.5, p.1328-1334, 2007

HUANG, C.; ZONG, M. H.; HONG, W.; LIU, Q. P. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. **Bioresource Technology**. v.100, p.4535–4538, 2009.

INAN, S.; SCHENK, H. J.; Evaluation of petroleum generation and expulsion from a source rock by open and restricted system pyrolysis experiments. Part I. Extrapolation of experimentally-derived kinetic parameters to natural systems. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v.58-59, p.213-228, 2001.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY - IEA. **Key world energy statistics**. Paris OECD/IEA,, 2011.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**. v.13, n.4, p.390-397, 2002.

JEONG, G. T.; YANG, H. S.; PARK, D. H. Optimization of transesterification of animal fat ester using response surface methodology. **Bioresource Technology**. v.100, p.25-30, 2009.

JUPESTA, J. Modeling technological changes in the biofuel production system in Indonesia. **Applied Energy**. v.90, p.211-217, 2012.

KANASAKI, M.; BREHENY, S.; HILLIER, A. J. Effects of temperature on growth and acid production of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**. p.142-144, 1975.

KAPTUROWSKA, A. U.; STOLARZEWICZ, I. A.; KRZYCZKOWSKA, J.; FLORJARICZYK, E. B. Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. **Ultrasonic Sonochemistry**. v.19, p.186-191, 2012.

KENNEALLY, P. M.; LEUSCHNER, R. G.; ARENDT, E. K. Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. **Journal of Applied Microbiology**. v.84, p.839-846, 1998.

KLEN, T. J.; VODOPIVEC, B. M. The fate of olive fruit phenols during commercial olive oil processing: Traditional press versus continuous two- and three-phase centrifuge. **LWT – Food Science and Technology**. v.49, n.2, p.267-274, 2012.

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

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

KOREAN STANDARD ASSOCIATION. **Petroleum products and lubricant determination of acid or base number: Colour indicator titration method. KS M ISO 6618**. 2003.

KOZACINSKI, L.; DROSINOS, E.; CAKLOVICA, F.; COCOLIN, F.; GASPARIK-REICHARDT, J.; VESKOVIC, S. Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. **Food Technology and Biotechnology**. v.46, p.93-180, 2008.

LIDE, D. R. **Handbook of chemistry and physics**. 88<sup>o</sup> Ed. Boca Raton – Florida: CRC Press. 2007.

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN, J. G. Jr. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v.44, p.5353-5363, 2005.

<sup>a</sup>MA, F. R.; CLEMENTS, L. D.; HANNA, M. A. Biodiesel fuel from animal fat. Ancillary studies on transesterification of beef tallow. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v.3, p.3768-3771, 1998.

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

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

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.11, p.1300-1311, 2007.

<sup>a</sup>MARQUES, R. V.; DA PAZ, M. F.; GUIDONI, L. L. C.; CORRÊA, E. K. Estudo de caso: Resíduos lipídicos de frigoríficos-abatedouros no estado do Rio Grande do Sul e uma potencial solução tecnológica para sua valorização. VIII SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE QUALIDADE AMBIENTAL, ABES, Porto Alegre, 2012. **Anais do VIII Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**. Porto Alegre, PUCRS. 2012.

<sup>b</sup>MARQUES, R. V.; DA PAZ, M. F.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M.; CORRÊA, L. B.; CORRÊA, E. K. **Resíduos Sólidos de Matadouros-Frigoríficos**. In: Gestão de Resíduos. Porto Alegre: Manas/Evangraf, 2012. p.210-226.

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

MENDOW, G.; VEIZAGA, N. S.; QUERINI, C. A. Ethyl ester production by homogenous alkaline transesterification: Influence of the catalyst. **Bioresource Technology**. v.102, p.6385-6391, 2011.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 5<sup>a</sup> Ed.

MOSCHETTI, G.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Differentiation of *Staphylococcus xylosus* strains from Italian sausages by antibiotyping and low frequency restriction

fragment analysis of genomic DNA. **Systematic and Applied Microbiology**. v.20, p.432-438, 1997.

MU, Y.; XIAU, Z. L.; ZHANG, D. J. A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumonia*. **Biochemical Engineering Journal**. v.40, p.537-441, 2008.

MYTILINAIOS, I.; SALIH, M.; SCHOFIELD, H. K.; LAMBERT, R. J. W. Growth curve prediction from optical density data. **International Journal of Food Microbiology**. v.154, p.169-176, 2012

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.14, p.578-597, 2010.

NIGAN, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**. v.37, p.52-68, 2011.

NETO, P. R. et al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n. 4, p.531-537, 2000.

OLESEN, P. T.; STAHNKE, L. H. The influence of environmental parameters on the catabolism of branched-chain amino acids by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. **Food Microbiology**. v.21, p.43-50, 2004.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. v.2.

ORGANIZATION OF UNITED NATIONS – ONU. **Brundtland Report – Report of the world commission on environment and development**. ONU, 1987.

PADULA, A. D.; SANTOS, M. S.; FERREIRA, L.; BORENSTEIN, D. The emergence of the biodiesel industry in Brazil: Current figures and future prospects. **Energy Policy**. v.44, p.395-405, 2012.

RICHARD, T. L. Challenges in scaling up biofuels infrastructure. **Science**. v.329, p.793-796, 2011.

RODRIGUEZ-RACT, J. N.; COTTING, L. N.; POLTRONIERI, T. P.; SILVA, R. C.; GIONELLI, L. A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de leite e óleo de girassol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, n.1, p.258-267, 2010.

ROPPA, L. **Perspectivas da produção mundial de carnes, 2007 a 2015**. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-corte/artigos/perspectivas-producao-mundial-carnes-t140/p0.htm>>. Acesso em: 11 jun. 2011.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para suínos e aves: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252p.

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

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

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3ªEd. Viçosa: Editora UFV, 2006.

SINGH, A.; OLSEN, S. I.; NIGAM, P. S. A viable technology to generate third-generation biofuel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v.86, p.1349-1353, 2011.

SOBRINO, F. H.; MONROY, C. R.; PÉREZ, J. L. H. Biofuels and fossil fuels: Life Cycle Analysis (LCA) optimization through productive resources maximization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.15, p.2621-2628, 2011.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 9.ed. v.2. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

STAMENKOVIC, O. S.; LAZIC, M. L.; TODOROVIC, Z. B.; VELJKOVIC, V. B.; SKALA, D. U. **Bioresource Technology**. v.98, p.2688-2699, 2007.

TANO-DEBRAH, K.; FUKUYAMA, S.; OTONARI, N.; TANIGUCHI, F.; OGURA, M. An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentrations of fats and oils. **Bioresource Technology**. v.69, n.2, p.133-139, 1999.

TAUFIQ-YAP, Y. H.; LEE, H. V.; HUSSEIN, M. Z.; YUNUS, R. Calcium-based mixed oxide catalysts for methanogenesis of *Jatropha curcas* oil to biodiesel. **Biomass and Bioenergy**. v.35, p.827-834, 2011.

TÜKENMEZ, M.; DEMIRELI, E. Renewable energy policy in Turkey with the new legal regulations. **Renewable Energy**. v.39, p.1-9, 2012.

TURATTI, J. M.; GOMES, R. A. R.; ATHIÉ, I. **Lipídeos – Aspectos funcionais e novas tendências**. Campinas: ITAL, 2002. 78p.

UBABEF – UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Avicultura brasileira em 2010: exportações e produção**. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoExterno/Atual.php>>. Acesso em: 11 jun. 2011.

UNITED STATES OF AMERICA. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration – FDA. **Dossier in support of the generally recognized as safe (GRAS) status of Specific strains of *Carnobacterium maltaromaticum* as a food ingredient**. College Park, MD. 2004

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

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

ZHOU, J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. **Current Opinion in Microbiology**. v.6, p.288-294, 2003.

ZHOU, Z.; MENG, F.; LIANG, S.; NI, B.; JIA, X.; LI, S.; SONG, Y.; HUANG, G. Role of microorganism growth phase in the accumulation and characteristics of biomacromolecules (BMM) in a membrane bioreactor. **RSC Advances**. v.2, p.453-460, 2012.

ZHU, L. Y.; ZONG, M. H.; WU, H. Efficient lipid production with *T. fermentas* and its use for biodiesel preparation. **Bioresource Technology**. v.99, p.7881–7885, 2008.