



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA
CAMPUS DE PALMAS - TO**

FÁBIO RIBEIRO DA SILVA JÚNIOR

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO FRUTO
DO PEQUI (*Caryocar Brasiliense*) PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS COMO
MATÉRIA-PRIMA ENERGÉTICA.**

**PALMAS-TO
2023**

FÁBIO RIBEIRO DA SILVA JÚNIOR

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO FRUTO
DO PEQUI (*Caryocar Brasiliense*) PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS COMO
MATÉRIA-PRIMA ENERGÉTICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Agroenergia Digital, da Universidade Federal do
Tocantins, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Agroenergia.

Orientadora: Prof. Dr^a Flávia Lucila Tonani Siqueira

PALMAS – TO
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S586s Silva Júnior, Fabio Ribeiro da.

Seleção e avaliação de leveduras isoladas do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*) para a produção de lipídios como matéria-prima energética. / Fabio Ribeiro da Silva Júnior. – Palmas, TO, 2025.

60 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2025.

Orientador: Dra Flávia Lucila Tonani Siqueira

Coorientador: Dra Juliana Fonsceca Moreira

1. Isolamento de leveduras do fruto do pequi. 2. Utilização de resíduos agroindustriais como fonte de energia. 3. Caracterização de leveduras do pequi. 4. Soro de leite e manipueira como meio de cultivo de leveduras oleaginosas. I. Título

CDD 333.7

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FÁBIO RIBEIRO DA SILVA JÚNIOR

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO FRUTO
DO PEQUI (*Caryocar Brasiliense*) PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS
COMO MATÉRIA-PRIMA ENERGÉTICA.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr^a Flávia Lucila Tonani Siqueira

Orientadora

Dr^a Elainy Cristina Alves Martins Oliveira

Examinadora Interna

Dr^a Eskálath Morganaa Silva Ferreira

Examinadora Externa

PALMAS – TO
2023

AGRADECIMENTOS

DEUS Pai & Mãe

UFT Orientadora Flávia

Eskálathe Morganna

Elainy Cristina Solange Carreiro

Mayk Ernando

PPGA

IRMÃS Familiares

A MIM MESMO POR NÃO DESISTIR

Diana Lopes Prof.^a Juliana

Prof. Raphael *Gabriela Fachine*

LMGA

Guilherme Oliveirae

AMIGOS!

SILVA JUNIOR, Fábio Ribeiro da; **SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO FRUTO DO PEQUI (*Caryocar Brasiliense*) PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS COMO MATÉRIA-PRIMA ENERGÉTICA.** Palmas-TO; Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, 2023, 60 p. Dissertação (mestrado).

RESUMO

Devido ao aumento do uso das fontes de energia fóssil, ao aumento dos preços e à preocupação ambiental. Uma alternativa promissora é a extração de lipídeos de microrganismos, como algas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que oferecem várias vantagens em relação às fontes vegetais. O objetivo dessa pesquisa é apontar as usalidades das leveduras oleaginosas isoladas do fruto do pequi, com potenciais em acumular lipídios em suas celular, a fim de apontarmos uma alternativa sustentável de utilização de resíduos agroindustriais para uma nova fonte energética. O experimento foi conduzido em condição *in vitro*, no Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada - LMGA, na Universidade Federal do Tocantins - UFT, campus Palmas – TO. Os frutos coletados foram devidamente identificados e separados e após o isolament, foi realizado o teste de coloração utilizando o corante Sudan B. para a quantificação das leveduras oleaginosas. Já para a extração do lipídeo, o meio foi preparado utilizando 25 mL de soro de leite, 25 mL de manipueira e 0,5 g de extrato de levedura, para cada 100 mL -1. A extração de lipídeos contidos na biomassa das leveduras, foi realizada utilizando a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959); onde a biomassa seca, previmanete centrifugada, passou por digestão ácida para rompimento da parede celular da levedura. A extração dos lipídeos foi realizada pela solução de 10 ml de clorofórmio e 5 ml de metanol na proporção de 2:1. Foram obtidas 15 leveduras isoladas do fruto do pequi com características de microorganismos oleaginosos com a técnica de coloração sudan blcak. Onde, a levedura 22 isolada da polpa do pequi, foi a que apresentou um maior percentual de acúmulo de lipídeos, utilizando o soro de leite e a manipueira como meio de crescimento para a obtenção de biomass; Dessa forma, a conversão de uma fonte de carbono originária do soro do leite e da manipueira em biomassa e lipídios, mostrou-se bastante eficientes, com resultados positivos e satisfatórios.

Palavras-chaves: Extração de Lipídios, Biomassas, Residuos agroindustriais, Soro de leite, Manipueira, Sudan Black.

SILVA JUNIOR, Fábio Ribeiro da; **SELECTION AND EVALUATION OF ISOLATED YEASTS FROM PEQUI FRUIT (*Caryocar Brasiliense*) FOR THE PRODUCTION OF LIPIDS AS AN ENERGY RAW MATERIAL.** Palmas-TO; Graduate Program in Agroenergy, Federal University of Tocantins, 2023, 60 p. Thesis (Master's degree).

ABSTRACT

Due to the increased use of fossil energy sources, rising prices and environmental concerns. A promising alternative is the extraction of lipids from microorganisms, such as algae, bacteria, yeasts and filamentous fungi, which offer several advantages over plant sources. The objective of this research is to point out the uses of oleaginous yeasts isolated from the pequi fruit, with the potential to accumulate lipids in their cells, in order to point out a sustainable alternative for the use of agro-industrial residues for a new energy source. The experiment was carried out in in vitro conditions, at the General and Applied Microbiology Laboratory - LMGA, at the Federal University of Tocantins - UFT, Palmas campus - TO. The collected fruits were properly identified and separated and after isolation, the staining test was performed using the Sudan B. dye for the quantification of oleaginous yeasts. For lipid extraction, the medium was prepared using 25 mL of whey, 25 mL of manipueira and 0.5 g of yeast extract for each 100 mL -1 . The extraction of lipids contained in the yeast biomass was carried out using the methodology proposed by Bligh and Dyer (1959); where the dry biomass, previously centrifuged, underwent acid digestion to break the yeast cell wall. The lipids were extracted using a solution of 10 ml of chloroform and 5 ml of methanol in a 2:1 ratio. Fifteen yeasts isolated from pequi fruit with characteristics of oleaginous microorganisms were obtained using the sudan blcak staining technique. Where, the yeast 22 isolated from the pequi pulp, was the one that presented the highest percentage of lipid accumulation, using whey and manipueira as a growth medium to obtain biomass; Thus, the conversion of a source of carbon originating from whey and cassava into biomass and lipids proved to be quite efficient, with positive and satisfactory results.

Keywords: Lipid Extraction, Biomass, Agroindustrial residues, Whey, Manipueira, Sudan Black.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Linha do tempo de ampliação e perspectiva obrigatória do percentual de biodiesel na produção de óleo diesel tipo B estabelecido na Resolução CNPE nº 16, de 29/10/2018.....	15
Figura 2: Reação de transesterificação para produção de biodiesel	18
Figura 3: Processo de transesterificação para a produção de Biodiesel no Brasil	19
Figura 4: Ranking da extração vegetal em toneladas de frutos do pequi no Brasil.....	28
Figura 5: Arvore, florescência e fruto do pequi	30
Figura 6: Distribuição do fruto do pequi no Brasil	31
Figura 7: Estrutura morfológica do fruto do pequi	32
Figura 8: Composição de ácidos graxos dos óleos de soja, pequi e mamona.....	34
Figura 9: Isolamento de leveduras da polpa e semente do pequi. Onde F1: fruto 1 e F2: fruto 2	37
Figura 10: Etapas da realização do teste utilizando o corante sudan black para a qualificação das leveduras olegionasa. Onde: 10A: Réplica de impressão da levedura para o teste. 10B: Placas contendo o sudan black para identificação das leveduras lipogênicas. 10C: Levedura identificada como lipogênica utilizando a técnica com sudan black. 10D: Levedura identificada como não lipogênica utilizando a técnica com sudan black.....	38
Figura 11: Processo de extração do lipídio da biomassa obtida, resultando em uma solução trifásica.....	40
Figura 12: Lipídeos acumulados de leveduras oleaginosas crescidas no soro do leite e manipueira.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desempenho das leveduras isoladas do pequi, em diferentes materiais testados com o corante Sudan Black. Identificando a quantidade de leveduras que coloriram.....	41
Tabela 2: Resultados da produção de biomassa de leveduras crescidas no meio contendo soro de leite, manjueira e extrato de levedura.....	43
Tabela 3: Resultados da análise de variância das médias do acúmulo de lipídeos das leveduras isoladas do pequi.	45

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	11
2 - OBJETIVOS	13
2.1 - Geral	13
2.2 - Específicos	13
3 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.1 - Biodiesel.....	14
3.2 - A cadeia produtiva do biodiesel.....	16
<i>3.2.1 – Biodiesel à base de lipídeos.....</i>	<i>20</i>
3.3 – Resíduos agroindustriais com potencial de potencializar fontes energéticas.....	20
<i>3.3.1 - Soro de leite como meio de crescimento para leveduras oleaginosas.....</i>	<i>21</i>
<i>3.3.2 - Manipueira como meio de crescimento para leveduras oleaginosas</i>	<i>22</i>
3.4 – Leveduras.....	23
<i>3.4.1 - Leveduras oleaginosas.....</i>	<i>24</i>
3.5 – Aplicação Biotecnológica das Leveduras Oleaginosas	26
3.6 - A produção de pequi no estado do Tocantins.....	28
3.7 – Potencialidades do pequi	32
4 - MATERIAIS E METODOS	36
4.1 Local do experimento e coleta das amostras	36
4.2 Isolamento das leveduras da polpa e semente do pequi	36
4.3 Pré-seleção das leveduras	37
4.4 Identificação das leveduras com características oleaginosas	37
4.6 Meio de crescimento contendo soro de leite e manipueira para a determinação de lipídeos	39
<i>4.6.1 – Seleção das leveduras.....</i>	<i>39</i>
4.7 - Extração e determinação do acúmulo de lipídeos	40
4.8 – Analise estatística	40
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 - Das leveduras identificadas como oleaginosas	41
5.2 – Da produção de biomassa das leveduras oleaginosas cultivadas no soro do leite e manipueira.....	42
5.3 - Da extração e determinação do acúmulo de lipídios das leveduras oleaginosas	44
5.4 – Identificação das leveduras oleaginosas 22, 9 e 38.	47
6 - CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1- INTRODUÇÃO

Devido ao aumento do uso das fontes de energia fóssil, ao aumento dos preços e à preocupação ambiental, os biocombustíveis têm sido considerados uma alternativa para mitigar esses problemas, oferecendo potencial para suprir as necessidades humanas com menor impacto ambiental (SOUZA et al., 2020).

O biodiesel é um biocombustível obtido por meio da interação química entre triglicerídeos e um álcool de cadeia curta, na presença ou ausência de um catalisador. Entre seus principais benefícios estão a alta biodegradabilidade, a não toxicidade, a baixa emissão de poluentes em comparação com o diesel de petróleo e a compatibilidade com motores de injeção de diesel convencionais (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Existem quatro gerações de biocombustíveis, conheça um pouco mais sobre cada uma delas: Primeira Geração: Para a produção dos biocombustíveis de primeira geração são utilizados açúcares, amidos ou óleos vegetais; Segunda Geração: É possível utilizar todas as formas de biomassa lignocelulósica (macromoléculas orgânicas complexas), inclusive resíduos agrícolas e industriais, árvores e determinadas espécies de grama. Os biocombustíveis de segunda geração podem reduzir em 90% as emissões de gás carbônico na atmosfera, em comparação aos combustíveis fósseis; Terceira Geração: O foco dos biocombustíveis de terceira geração é a intervenção direta na produção de biomassa no campo da genômica; Quarta Geração: Os biocombustíveis de quarta geração têm foco na retirada de gás carbônico da atmosfera, armazenando-o em seus troncos, galhos e folhas. A biomassa abundante em carbono é transformada em combustível e gases utilizando técnicas de segunda geração. Além de serem combustíveis e gases renováveis, são considerados carbono-negativo, pois retiram gás carbônico da atmosfera (APROBIO, 2016).

Uma alternativa promissora é a extração de lipídeos de microrganismos, como algas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que oferecem várias vantagens em relação às fontes vegetais. Esses microrganismos não estão restritos a condições climáticas específicas, permitindo produção o ano todo, requerem menos espaço e mão de obra e têm um ciclo de produção mais curto, devido ao ciclo de vida da biomassa microbiana ser menor em comparação com as fontes vegetais. Além disso, como meio de cultura, é possível utilizar águas residuais ou resíduos agroindustriais, contribuindo para uma destinação adequada desses resíduos e promovendo a economia circular.

Uma estratégia para aumentar a competitividade na produção de biodiesel é o uso de meios de cultura para as leveduras, de baixo custo, como o caroço do pequi. Embora a

composição do caroço seja considerada de baixa qualidade devido ao alto teor de ácidos graxos livres, é possível produzir ésteres por meio da reação de esterificação (SOUZA et al., 2020).

O bioprocessamento de resíduos agrícolas é de grande interesse econômico, ambiental e social. Entre estes, destaca-se a manipueira, que é um resíduo da indústria processadora de mandioca, produzida em grande quantidade no Brasil e apesar dos nutrientes que possui é um resíduo pouco aproveitado e muitas vezes descartado de forma incorreta no meio ambiente. (BORGHETTI, 2009).

O soro de leite é o subproduto líquido obtido quando a caseína e gordura são separadas a partir da coagulação do leite (FRIGON et al., 2009). Trata-se do principal subproduto gerado na produção de queijos não só pela elevada carga orgânica como pelo grande volume, relacionado com a produtividade de cada tipo de queijo e também com o tipo de leite processado (CARVALHO et al., 2013).

Já os lipídios das leveduras lipogênicas, utilizados na produção de biodiesel, são compostos por triglicerídeos, fosfolipídios, esteróis e ácidos graxos livres. A composição específica desses lipídios pode variar de acordo com a espécie de levedura e as condições de cultivo. O conhecimento detalhado da composição dos lipídios dessas leveduras é fundamental para otimizar a produção de biodiesel e desenvolver estratégias de engenharia metabólica visando aumentar a eficiência e a produtividade desse biocombustível sustentável (SOUZA et al., 2020).

O bioma cerrado é uma área de destaque na preservação da biodiversidade global e possui uma flora extremamente rica, incluindo diversas espécies frutíferas com alto potencial de aproveitamento tecnológico. Uma dessas espécies é o *Caryocar brasiliense* Cambess, conhecido como pequi ou piqui, que ocorre em vários estados brasileiros. Essa árvore oferece múltiplas formas de aproveitamento, como madeira para móveis e construção civil, casca para tinturaria, folhas na medicina popular e alimentação animal, amêndoas e fruto para uso culinário, medicina popular e extração de óleo, que pode ser empregado em cosméticos e saboaria (TRAESSEL & OESTERREICH, 2018; DE ALMEIDA et al., 2018).

Assim, a fim de reduzir a dependência de fontes fósseis de energia e minimizar os impactos ambientais associados à produção de biocombustíveis, o objetivo dessa pesquisa é apontar as usalidades das leveduras oleaginosas isoladas do fruto do pequi, com potenciais em acumular lipídios em suas celulares, a fim de apontarmos uma alternativa sustentável de utilização de resíduos agroindustriais para uma nova fonte energética.

2- OBJETIVOS

2.1 - Geral

Isolar leveduras oleaginosas do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*) e selecionar as com potenciais para a produzir lipídios capazes de serem convertidos em fontes energéticas.

2.2 - Específicos

- Isolar leveduras oleaginosas da polpa e semente do fruto do pequi;
- Selecionar as leveduras oleaginosas com a técnica de coloração Sudan Black;
- Avaliar o acúmulo de lipídios das leveduras isoladas do pequi utilizando soro de leite e manipueira como meio de crescimento para obtenção de biomassa;
- Apontar a usabilidade das leveduras oleaginosas do fruto do pequi.

3 - REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 - Biodiesel

Os investimentos na diversificação da matriz energética abrangem a busca por fontes preferencialmente renováveis e mais baratas devido aos aspectos econômicos e ambientais. Nesse contexto, o biodiesel, por ser um combustível alternativo e renovável, merece atenção e surge como uma alternativa para atender a demanda energética mundial e substituir o óleo diesel. O biodiesel é um combustível que pode ser produzido a partir de óleos vegetais, gorduras animais e óleos de origem microbiana (algas, fungos e bactérias). As matérias-primas são convertidas em biodiesel por meio de uma reação química envolvendo álcool e um catalisador. Atualmente, vários tipos de sistemas têm sido estudados para desenvolver a reação de esterificação de forma mais rápida e econômica (GOMES, 2023).

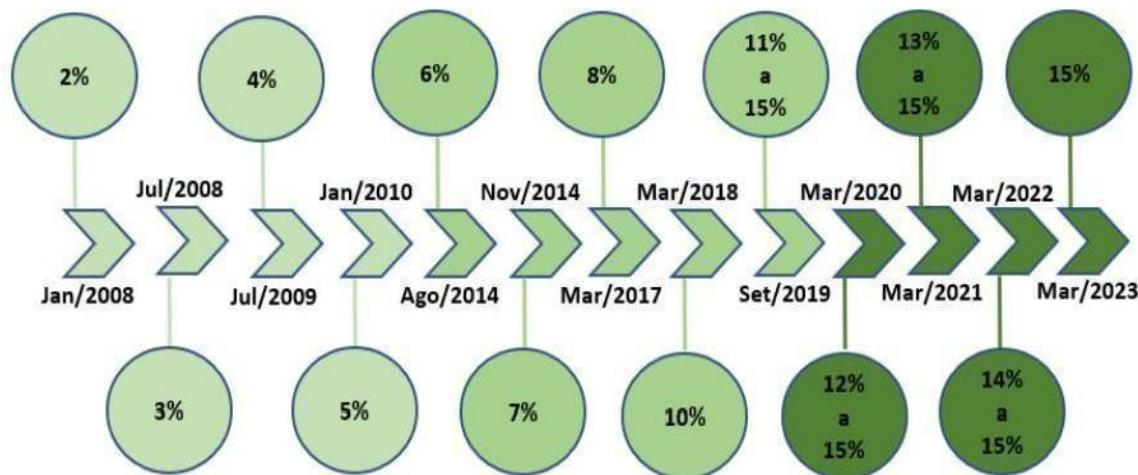
A inserção da utilização dos biocombustíveis no Brasil vem desde a década de 70, a priori, objetivando superar crises econômicas. Devido ao alto preço do petróleo, em 1983 o governo brasileiro, através do então Ministério da Indústria e Comércio, criou o Programa Nacional de Energia de Óleos Vegetais (Projeto OVEG) com o intuito de realizar pesquisas de adição de níveis de biodiesel puro ao diesel de origem mineral. Em 2002, foi criado o PROBIOFISEL, coordenado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, visando mobilizar todos os setores envolvidos no desenvolvimento de biocombustíveis para avaliar a viabilidade técnica, econômica e socioambiental, entretanto, foi descontinuado, pois não priorizava a agricultura familiar, sendo ajustado posteriormente (RAMOS et al., 2011).

Em 2003, teve inicio os primeiros estudos para a criação de uma política para a produção do biodiesel no Brasil, através da Comissão Executiva Interministerial do Biodiesel (CEIB) e do Grupo Gestor (GG) pelo governo federal. Em dezembro de 2004, foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), objetivando introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira resultando na primeira fase, a definição de um arcabouço regulatório fomentando a inclusão social e o desenvolvimento regional (ANP, 2022).

A comercialização até então era opcional, porém, a partir da Lei nº 11.097/2005 em seu artigo 2º, tornou-se obrigatório a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, inicialmente, com mistura de 2% no diesel fóssil a partir de 2008 (ANP, 2022).

No decorrer dos anos, esse percentual foi ampliado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE). A série histórica de ampliação e perspectiva do percentual de biodiesel na produção de óleo diesel tipo B, conforme estabelecido pela Lei nº 13.263, 23/03/2016 e pela Resolução CNPE nº 16, de 29/10/2018, é explanada na Figura 1.

Figura 1: Linha do tempo de ampliação e perspectiva obrigatória do percentual de biodiesel na produção de óleo diesel tipo B estabelecido na Resolução CNPE nº 16, de 29/10/2018.



Fonte: ANP, 2021.

Como forma de mitigar os impactos na economia devido à pandemia de Covid-19, foram realizadas alterações dos percentuais obrigatórios de Biodiesel no óleo Diesel B ora estabelecidos pelo CNPE nos anos de 2020, 2021 e 2022. Com isso, através da Resolução nº 824, de 13 de agosto de 2020, ficou estabelecida a redução excepcional e temporária do percentual de mistura obrigatória do biodiesel ao óleo diesel dos atuais 12% (B12) para 10% (B10) no bimestre de setembro e outubro, sendo que a partir de novembro o incremento foi de 11% (B11) como medida de manutenção da continuidade do abastecimento nacional (ANP, 2020).

Já no ano de 2021, até o final do primeiro trimestre, ocorreu o aumento do percentual de mistura mandatório no diesel oriundo de petróleo para 13% em volume, sendo que em maio, este percentual foi reduzido para 10% (B10) e em setembro para 12% (B12) e, por fim, 10% (B10) em novembro (EPE, 2022).

Em 2022, como forma de proteger os interesses do consumidor quanto ao preço, qualidade e oferta dos produtos, o Ministério de Minas e Energia (MME), através do CNPE, decide manter o percentual obrigatório de biodiesel no diesel em 10% (B10), sendo que, pelo cronograma estabelecido na resolução 16/2018 do próprio CNPE, em 2022, o percentual deveria subir para 14% (B14) a partir de março até atingir 15% (B15) em 2023. O MME justificou tal decisão baseada na implantação de medidas para a contenção do preço do diesel com a manutenção da Política Nacional de Biocombustíveis, RenovaBio, um programa do Governo Federal regulamentado em março de 2018 para expandir a produção de biocombustíveis no Brasil, baseada na previsibilidade, na sustentabilidade ambiental,

econômica e social, e compatível com o crescimento do mercado, conferindo previsibilidade, transparência, segurança jurídica e regulatória ao setor (EPBR, 2021). Para o ano de 2023, foi prevista a mistura obrigatória de 15% (B15) a partir de abril, cumprindo assim, o cronograma estabelecido na resolução 16/2018 do CNPE (BIODIESELBR, 2023).

3.2 - A cadeia produtiva do biodiesel

O Biodiesel é uma mistura de ésteres de cadeia longa derivado de ácidos graxos obtidos, na sua grande maioria, por meio de reações de transesterificação em óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois na presença de um catalisador (SANTIN, 2013). Possui propriedades similares ao óleo diesel mineral, sendo um produto atóxico, biodegradável e renovável, sendo considerado menos prejudicial ao meio ambiente quando comparado com o diesel, pois não é utilizado enxofre no processo produtivo (CANESIN et al., 2014).

Por ser detentor de uma grande extensão territorial, o Brasil apresenta uma ampla diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel, como a soja, o girassol, a mamona, o milho, o pinhão-manso, o caroço de algodão, a canola, o babaçu, o buriti, o dendê, a macaúba e o amendoim, além das de origem animal como o sebo bovino e as gorduras de frango e de suínos. Óleos de descarte, óleos de vísceras de peixes e óleos usados para cocção de alimentos (óleo de fritura) também são utilizados como matérias-primas alternativas.

No entanto, é importante ressaltar que as propriedades químicas e físicas da matéria-prima estão diretamente associadas à tecnologia e ao rendimento do processo de conversão e, por conseguinte, às variações na qualidade final do produto para fins combustíveis. Mais de 350 espécies de plantas com potencial para utilização na produção de biodiesel já foram identificadas globalmente (ATABANI et al., 2012).

A cadeia produtiva do biodiesel envolve diversas etapas, desde a seleção e cultivo de matérias-primas até a produção e distribuição do biocombustível final. Aqui está uma descrição detalhada das principais etapas da cadeia produtiva do biodiesel (PORTAL BIODIESEL, 2019). Com referência a fontes consultadas:

- **Seleção das matérias-primas:** A escolha das matérias-primas é um passo fundamental na produção de biodiesel. Diversas fontes vegetais e animais podem ser utilizadas, seleção leva em consideração fatores como disponibilidade, custo, teor de lipídios, qualidade do óleo, sustentabilidade e impacto ambiental.
- **Cultivo e colheita das matérias-primas:** Para as matérias-primas de origem vegetal é necessário o cultivo agrícola. Isso envolve preparação do solo, plantio,

irrigação, controle de pragas e doenças, e colheita das plantas. No caso de matérias-primas de origem animal, como gorduras animais, a obtenção ocorre por meio de processos de abate e processamento de animais.

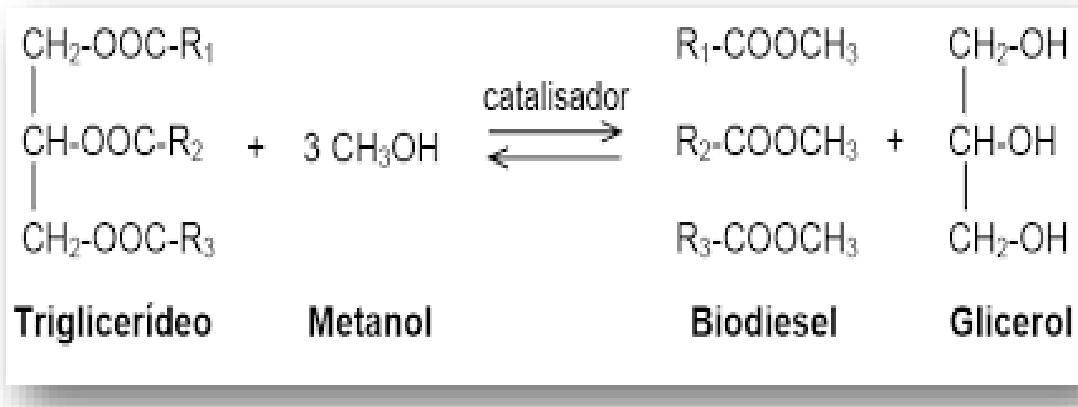
- **Extração dos óleos ou gorduras:** Após a colheita ou obtenção das matérias-primas, é necessária a extração dos óleos ou gorduras. Isso pode ser feito por meio de métodos mecânicos, como prensagem ou moagem, ou por processos químicos, como a extração com solventes. O objetivo é separar os lipídeos das partes sólidas ou líquidas indesejadas.
- **Refino dos óleos:** Os óleos ou gorduras extraídos passam por um processo de refino para remover impurezas, como resíduos sólidos, ácidos graxos livres, pigmentos e compostos indesejáveis. O refino geralmente envolve etapas como degomagem, neutralização, descoloração e desodorização, garantindo a qualidade do óleo a ser utilizado na produção de biodiesel.
- **Transesterificação:** A transesterificação é a reação química responsável pela conversão dos óleos ou gorduras em ésteres metílicos ou etílicos, que são os principais componentes do biodiesel. Nessa etapa, os lipídeos reagem com um álcool de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, na presença de um catalisador, como hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio. A transesterificação produz biodiesel e gera glicerina como subproduto.
- **Purificação do biodiesel:** O biodiesel produzido na etapa de transesterificação passa por um processo de purificação para remover impurezas remanescentes, como catalisadores, glicerina residual, água e sabões. Isso pode ser feito por meio de lavagem, decantação, centrifugação ou processos de filtração.
- **Armazenamento e distribuição:** O biodiesel purificado é armazenado em tanques adequados para garantir sua qualidade e estabilidade. Em seguida, o biocombustível é distribuído para postos de combustíveis, indústrias ou outros consumidores. A logística de distribuição envolve transporte, armazenamento intermediário e abastecimento dos pontos de venda.

Essa é uma visão geral da cadeia produtiva do biodiesel, mas vale ressaltar que pode haver variações e diferentes abordagens em termos de processos e tecnologias utilizadas, dependendo da região e das especificidades de cada planta de produção de biodiesel (PORTAL BIODIESEL, 2019).

A produção de biodiesel pelo método de transesterificação, representando as três

reações reversíveis e consecutivas, que ocorre a formação do di- e mono-acil-glicerídeos como produtos intermediários a partir de um tri-, seguem ilustradas na figura 2. Esse exemplo é via rota metilica, mas também pode ser realizado via rota etilica (SILVA, 2019).

Figura 2: Reação de transesterificação para produção de biodiesel.



Fonte: SILVA, 2019.

A reação de transesterificação produz glicerol, sua produção corresponde a equivalente 10% em volume do total produzido na reação, logo um co-produto do biodiesel que possui um valor comercial, que pode ser aproveitado por indústrias, tais como a de produtos de limpeza e cosméticos (CHOEDIKIATSAKUL et al., 2014; SILVA et al., 2017).

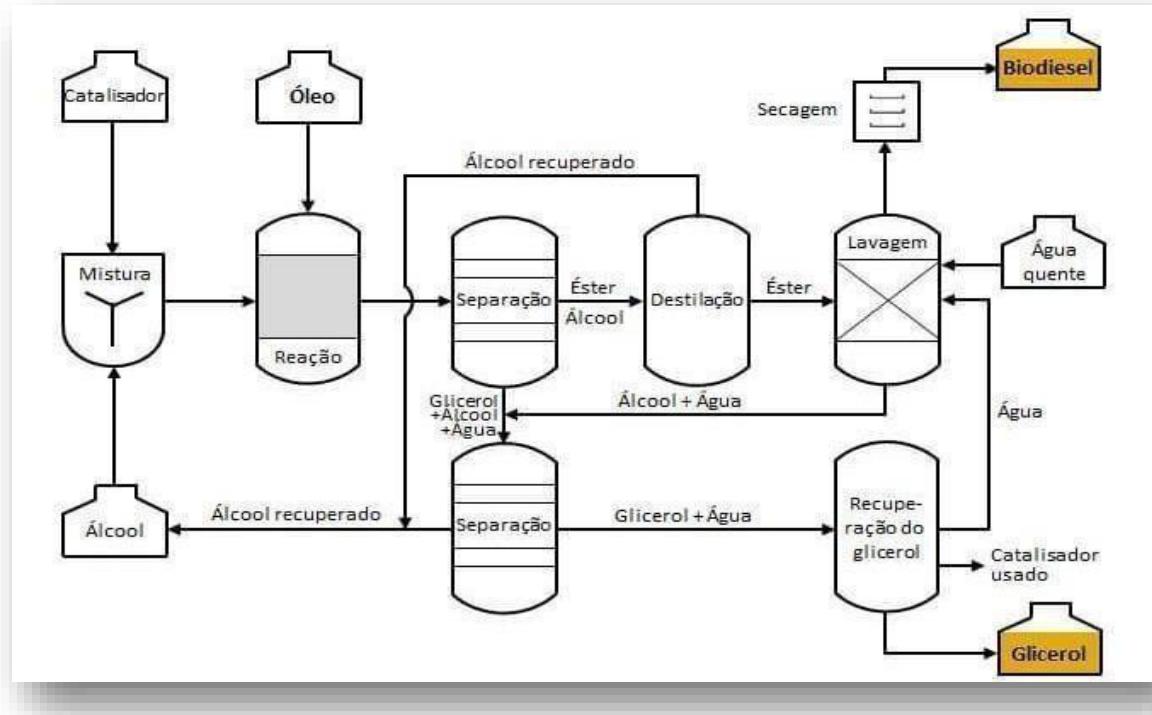
Segundo Bergmann e colaboradores (2013), em geral, pode-se afirmar que ésteres alquílicos de ácidos graxos podem ser produzidos a partir de qualquer tipo de matéria-prima oleaginosa, mas nem toda matéria-prima pode ser utilizada para a obtenção de um produto que atenda às especificações internacionais do biodiesel. Isso ocorre porque algumas delas apresentam propriedades não ideais que são transferidas para o biocombustível, o que o torna inadequado para uso direto (B100) em motores do ciclo Diesel.

Para que seja feito numa escala industrial, será preciso ter uma estrutura mínima de equipamentos que possam reproduzir o processo de produção de biodiesel da forma mais comumente praticada pela indústria no Brasil e no mundo, com base na literatura científica (KNOTHE, 2017).

A matéria-prima (ou óleo de entrada) é adicionada ao reator junto com o álcool e o catalisador (que podem ser previamente misturados, antes do inicio da reação, como mostra o fluxograma da figura 3 abaixo, ou podem ser adicionados ao reator de forma separada). Após a finalização da reação, a mistura é enviada para o tanque de separação e após o processo de decantação, o glicerol é separado do éster, no qual o glicerol é separado do éster (nome

técnico dado ao biodiesel antes do processo ser concluído) (DE OLIVEIRA, 2021).

Figura 3: Processo de transesterificação para a produção de Biodiesel no Brasil



Fonte: De Oliveira, 2021.

Segundo Quitella e equipe (2009), um dos biocombustíveis que mais tem sido utilizados/pesquisados por vários países é o biodiesel, que é uma fonte renovável e biodegradável; se alicerça num tripé:

- 1 - Ambiental (melhoria das condições climáticas por redução das emissões e utilização de gases de efeito estufa pela matéria-prima);
- 2- Social (desenvolvimento rural associado à produção de matéria-prima);
- 3- Energético (independência de fornecedores - consumidores produzindo sua própria energia).

Neste sentido, o Brasil possui um leque de diversidades regionais referentes a clima e solo, tornado uma condição satisfatória para o cultivo de várias oleaginosas, sendo a soja a mais produzida no país. Entretanto, a maior parte das oleaginosas com potencial para produzir biodiesel são de origem alimentícia podendo estes causar impactos negativos devido à concorrência e à escassez de alimentos, tornando-os mais caros (MELLO et al., 2020).

3.2.1 – Biodiesel à base de lipídeos

Os lipídeos são compostos encontrados nos organismos vegetais, animais e também nos microrganismos. Baseados nas diferenças estruturais, existem três categorias principais de lipídeos: os triacilgliceróis, os fosfolipídeos e os esteróis (PELCZAR JR et al., 1997).

Os lipídeos encontram-se enquadrados em duas frações: os saponificáveis e os insaponificáveis. Os mono, di e triacilgliceróis pertencem aos saponificáveis, cuja hidrólise resulta na formação de ácidos graxos e glicerol, os monoacilgliceróis contém uma única molécula de ácido graxo ligada ao glicerol, os diacilgliceróis contêm duas moléculas e os triacilgliceróis contêm três moléculas de ácidos graxos ligadas ao glicerol. Os carotenoides, esteróis, álcoois e hidrocarbonetos pertencem a classe dos insaponificáveis (SILVA, 2014).

Os triacilgliceróis são a classe mais abundante dentro do grupo dos lipídeos e são uma importante fonte de reserva de energia para os animais, principalmente nos adipócitos que são células especializadas no armazenamento de gorduras. São lipídeos formados pela ligação de três moléculas de ácidos graxos com o glicerol, um triálcool de três carbonos, através de ligações do tipo éster encontrados em gorduras e óleos (PELCZAR JR et al., 1997).

Os fosfolipídeos são lipídeos complexos encontrados na membrana celular, onde desempenham importante papel estrutural. Diferem dos triglicerídeos pelo fato de somente duas moléculas de ácidos graxos estarem ligadas à molécula de glicerol e por um grupo fosfato estar ligado ao glicerol (PELCZAR JR et al., 1997).

A relação entre a quantidade dessas classes de compostos, bem como os tipos de ácidos graxos dos quais são formados, depende da fonte do óleo ou da gordura e da região onde foram produzidas. Os óleos e gorduras também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico (CASTRO et al., 2004).

De um modo geral, biocombustível pode ser definido como todo produto útil para a geração de energia, e pode ser obtido total ou parcialmente de biomassa, de fontes renováveis, de produtos vegetais ou compostos de origem animal (TOLMASQUIM, 2003).

A seleção de matéria-prima é imprescindível para definição do custo-benefício do biodiesel produzido, pois influenciará em diversas variáveis como rendimento, composição e qualidade. Outro fator importante a ser considerado é a disponibilidade e fonte da matéria-prima a ser utilizada (SILVA, 2019).

3.3 – Resíduos agroindustriais com potencial de potencializar fontes energéticas.

A indústria de alimentos tem favorecido o desenvolvimento do setor industrial

brasileiro, tendo como destaque o setor de laticínios devido ao crescimento constante e contribuição para o progresso econômico. O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de leite, sendo produzidos mais de 34 bilhões de litros por ano, com produção em 98% dos municípios brasileiros, e com maior presença entre as pequenas e médias propriedades (MAPA, 2022). Entretanto, esse avanço industrial resulta na geração de grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos que necessitam de tratamento antes de serem lançados no meio ambiente.

O setor de laticínios apresenta uma diversidade de derivados do leite, e devido suas possibilidades, a indústria láctea apresenta destaque dentre os outros setores industriais que contribuem para o desenvolvimento econômico do país. A produção mundial estimada para 2022 é de 937 milhões de toneladas, um aumento expressivo em relação a 2021 (887 milhões de toneladas), para o mesmo ano é esperado que a produção de lácteos alcance um total de 88 milhões de toneladas (FAO, 2022).

Já a utilização da manueira como meio de cultura em processo biotecnológico para a obtenção de lipídios, resulta em agregação de valor ao resíduo e consequentemente reduz o descarte inadequado no ambiente, favorecendo desenvolvimento sustentável nas indústrias geradoras deste substrato. Além disso, contribuiria com a redução do impacto ambiental ocasionado pelo seu descarte inadequado na natureza. O baixo custo deste substrato de fermentação também é um fator de destaque, sendo fundamental para assegurar a viabilidade econômica do processo, permitindo com que os lipídios de origem biológica possam competir no mercado com os seus análogos químicos (SILVA, 2016).

3.3.1 - Soro de leite como meio de crescimento para leveduras oleaginosas

O ácido láctico possui ampla aplicação como matéria-prima para várias indústrias de alimentos, farmacêutica, de couro e indústrias têxteis. No entanto, o preço do ácido láctico é ainda elevado para a sua utilização econômica na produção como meio de cultura. Desta forma, diversos pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de abordagens efetivas para a sua produção, buscando substratos de baixo custo, microrganismos eficientes e a otimização do processo de fermentação (TOSUNGNOEN et al., 2014; PINHO et al., 2019).

O custo da matéria-prima é considerado um dos principais fatores que interferem na produção de ácido láctico. Assim, vários materiais têm sido considerados como substratos alternativos, incluindo subprodutos de indústrias agrícolas, de alimentos e biomassas naturais não utilizadas (BAI et al., 2016; BONK et al., 2017). Resíduos agroindustriais vêm sendo utilizados, não só como fonte de carbono, mas também como fonte orgânica de nitrogênio, o qual é utilizado nos processos anabólicos e catabólicos, e está disponível na forma de

aminoácidos, peptídeos e componente inorgânicos (PINHO et al., 2019).

Nesse sentido, o soro de leite se apresenta como uma boa alternativa, uma vez que apresenta uma composição rica em lactose, proteínas, gorduras, vitaminas e sais minerais, atendendo à maioria dos requisitos nutricionais dos microrganismos fermentadores, especialmente as bactérias do ácido láctico (PINHO et al., 2019).

Vários estudos utilizam o soro de leite para viés biotecnológicos e alimentar, como por exemplo a produção de enzima lactase (BOSSO et al., 2019), aplicação em espessantes (FANG et al., 2019), produção de bioetanol microbiano (MURARI et al., 2019), produção de hidrogênio (RAMA et al., 2019) e substrato para crescimento de bactérias probióticas (KRUNIC et al., 2019).

Com o desenvolvimento de novas técnicas, o soro de leite vem sendo estudado e tratado como substrato alternativo para a produção de coprodutos de alto valor comercial (etanol, proteína de célula única, ácido láctico, butanol e outros bioproductos) utilizando microrganismos capazes de metabolizar diretamente o soro de leite, como por exemplo, levedura pertencente ao gênero *Kluyveromyces* sp (MURARI et al., 2019).

3.3.2 - Manipueira como meio de crescimento para leveduras oleaginosas

A manipueira, que em tupi-guarani quer dizer “o que brota da mandioca”, é o resíduo líquido originado a partir do processo de prensagem da raiz da mandioca durante a fabricação da farinha. A composição química da manipueira é variável, dependendo da espécie da mandioca, das condições climáticas do local, o que ocasiona dados contrastantes na literatura (SANTOS, 2017).

De maneira geral, um terço do amido da mandioca permanece na manipueira. Então encontram-se presentes na solução fósforo, potássio, cálcio e magnésio, além de micronutrientes essenciais para a manutenção da nutrição de microrganismos, plantas e alguns animais (DE JESUS et al., 2016).

Silva et al (2018) avaliou o efeito da variação da concentração de manipueira sobre a produção de biomassa e lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, e o cultivo com 100% de manipueira apresentou o melhor coeficiente de conversão de açúcares redutores em biomassa, mostrando assim que a manipueira é bom substrato para o crescimento de levedura.

A origem da fonte de nitrogênio também interfere na produção de lipídios durante a fermentação, sendo que fontes orgânicas ou inorgânicas são usadas com diferentes influências sobre o acúmulo de lipídios nas células (YAN, 2014).

O nitrogênio proveniente de fontes inorgânicas é bom para o crescimento celular,

porém não é adequado para a produção de lipídios. Por outro lado o nitrogênio orgânico, presente em peptona, é eficiente para o acúmulo de óleos, porém pouco eficazes para o desenvolvimento da biomassa celular (JHONRAVINDAR, 2018).

3.4 – Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, tipicamente esféricos ou ovais. Da mesma forma que os fungos filamentosos, as leveduras são amplamente distribuídas na natureza. Podem ser isoladas do ambiente terrestre, aquático e aéreo. As plantas são o habitat preferido das leveduras, no entanto, ambiente extremos como baixo potencial hídrico e temperatura baixa pode ser habitado por leveduras (SILVA, 2022).

Esses microrganismos pertencem ao reino Fungi e apresentam características típicas como presença de parede celular rígida, forma oval ou redonda, núcleo organizado com membrana nuclear, se reproduzem através de reprodução sexuada por meio de células especializadas (formação de esporos) e por reprodução assexuada (brotamento) (KURTZMAN & FELL, 1998).

Existem mais de 700 espécies foram prospectadas a partir de diferentes substratos, seja no meio ambiente ou até mesmo em seres humanos e animais. As diferentes espécies apresentam características patogênicas ou não, diversidade metabólica e são capazes de assimilar diversos compostos orgânicos, garantindo grande capacidade de manipulação para produção de enzimas (SANTOS, 2012).

É importante ressaltar que diferentes espécies de leveduras têm preferências por diferentes ambientes de crescimento. Algumas são mais adaptadas a ambientes aeróbicos, enquanto outras prosperam em ambientes anaeróbicos. Além disso, a seleção de nutrientes e a manipulação das condições ambientais são estratégias comuns para promover o crescimento e a produtividade das leveduras em diferentes aplicações. O crescimento das leveduras é influenciado por diversos fatores como temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e presença de oxigênio (ALBERTSet al., 2017). Aqui estão alguns exemplos de ambientes de crescimento comuns para as leveduras, conforme a literatura consultada:

- **Ambientes naturais:** As leveduras são amplamente encontradas na natureza, como em solos, água doce e salgada, frutas e flores. Elas podem se desenvolver em ambientes com diferentes níveis de acidez, umidade e nutrientes. Por exemplo, algumas leveduras são capazes de fermentar a frutose presente nas frutas, o que contribui para a produção de álcool durante o processo de

fermentação natural.

- **Indústria de alimentos e bebidas:** As leveduras são amplamente utilizadas na indústria de alimentos e bebidas para a produção de pães, cervejas, vinhos e produtos lácteos fermentados. Nesses ambientes, as leveduras são cultivadas em condições controladas para otimizar sua capacidade de fermentação e produção de compostos desejáveis, como álcool e dióxido de carbono.
- **Processos de fermentação:** As leveduras desempenham um papel fundamental em processos fermentativos, nos quais transformam açúcares em álcool e dióxido de carbono. Esses processos ocorrem em ambientes como fermentadores industriais, tanques de fermentação e barris de envelhecimento. As leveduras são selecionadas e cultivadas em condições específicas para garantir uma fermentação adequada e a obtenção dos produtos finais desejados.
- **Biorreatores e fermentação em escala laboratorial:** Esses ambientes cultivam leveduras em escala reduzida. Por ser um ambiente controlado, permite estudar o crescimento e o metabolismo das leveduras em condições precisas, incluindo temperatura, pH, oxigenação e disponibilidade de nutrientes. Essas pesquisas são essenciais para a compreensão dos processos metabólicos das leveduras e o desenvolvimento de aplicações industriais.

3.4.1 - Leveduras oleaginosas

Por muitas décadas, a maioria das pesquisas relacionadas ao estudo de leveduras lipogênica tem sido voltada para espécies como *Y. lipolytica*, *Lipomyces*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus* e *Rhodosporidium toruloides*. Entretanto, há dezenas de espécies oleaginosas que foram descobertas ao longo dos anos, mas tem sido menos estudadas. Abordando-se uma faixa mais ampla de leveduras lipogênicas, é possível realizar a seleção de leveduras e substratos específicos, tolerância à osmose, ao pH adverso e à inibição (SITEPU et al., 2014).

O estado Tocantins, por suas características ambientais, temperatura, umidade e solo, favorece o crescimento de microrganismos, como leveduras, sendo, portanto, um ambiente propício para a bioprospecção de novas cepas. Essas linhagens selvagens podem ser isoladas e estudadas para obter informações sobre suas características e possíveis aplicações (SILVA et al., 2019).

As leveduras oleaginosas têm sido estudadas como uma fonte microbiana de óleo para

oleoquímicos, incluindo combustíveis, plataformas químicas através de tecnologias integradas de biomassa, e ingredientes de alimentação (WOODBINE, 1959). Uma levedura é considerada lipogênica quando a razão, em peso seco, dos lipídios totais em relação à biomassa é igual ou maior a 20% (SITEPU et al., 2014).

As leveduras lipogênicas têm recebido um especial interesse devido à sua capacidade de crescer rapidamente, atingindo elevadas densidades numa variedade de fontes de carbono (substratos), entre as quais se incluem matérias-primas residuais de baixo custo, provenientes da agricultura e da indústria (LOPES, 2018).

As células das leveduras oleaginosas são capazes de acumular lipídios celulares em quantidades superiores a 20% da sua biomassa quando cultivadas em meios com excesso de carbono disponível, mas quantidades limitadas de outros nutrientes, especialmente azoto. Os lipídios produzidos são constituídos em sua maioria por ácidos graxos insaturados de cadeia longa, com 16-18 carbonos, semelhantes à composição de alguns óleos vegetais (SPIER et al., 2015; MUNCH et al., 2015).

Os lipídios provenientes de leveduras oleaginosas podem atuar como fonte alternativa de matéria prima na produção de biodiesel. Muitas vantagens estão envolvidas no uso de leveduras oleaginosas para a produção de lipídios, como a alta taxa de crescimento em biorreatores, a capacidade de assimilar diversas fontes de carbono e não serem afetadas por limitações de espaço, clima ou variações de luz (SILVA et al., 2018). Entre as leveduras mais citadas na literatura, como oleaginosas, figuram as do gênero *Rhodotorula* e da espécie *Yarrowia lipolytica* (SIGNORI et al., 2016).

As vantagens das leveduras oleaginosas, estão na sua capacidade de crescimento rápido, alta produtividade de lipídeos, adaptação para produzir biomassa em biorreatores convencionais e a não concorrência com espaço e produção de alimentos, além da flexibilidade de expansão e facilidade de manipulação genética para posterior otimização em escala industrial. (JOHNRAVINDAR et al., 2018).

Durante a fase de crescimento do microrganismo, o nitrogênio é necessário para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, enquanto a fonte de carbono é utilizada para processos energéticos e anabólicos. Quando a fonte de nitrogênio cessa, a taxa de crescimento do microrganismo diminui, e em oleaginosos a fonte de carbono é convertida em lipídios, que são acumulados dentro das células (AMARETTI et al., 2010).

Geralmente almeja-se o uso de linhagens que apresentam uma melhor cinética de desenvolvimento, com uma maior velocidade de crescimento, necessitando de menores tempos de cultivo, que não produzam substâncias indesejáveis e que tenham a capacidade de

metabolizar substratos de custo reduzido. O uso da biomassa ou de algum metabólito da fermentação, para fins alimentícios, requer a adoção de microrganismos seguros, certificados como GRAS (Generally Recognized As Safe) (POLI et al., 2013).

Leveduras são bastante úteis para a produção renovável e sustentável de óleos biodegradáveis com potencial para serem utilizados em combustíveis, produtos químicos e gêneros alimentícios. Muitas descobertas foram feitas no início da década sobre a produção de óleo a partir de leveduras, que impulsionaram novos estudos incluindo a descoberta de espécies que produzem grandes quantidades de lipídios, assim como condições que permitem tal produção, através da conversão de resíduos de produtos em óleos microbianos, no uso de pequena ou grande escala (SAWANGKEAW, 2013).

Algumas pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo genético para melhoria na compreensão do metabolismo lipídico. Apesar desta não ser uma levedura oleaginosa, as enzimas envolvidas no processo de síntese e de degradação de triacilglicerois são muito similares entre as espécies, principalmente em leveduras (CZABANY; ATHENSTAEDT; DAUM, 2007).

Existem diferentes aplicações comerciais para o uso de lipídios sintetizados a partir de leveduras oleaginosas. A utilização mais comum é a energética, nomeadamente na produção de biocombustíveis, mas também existem outras aplicações, por exemplo na indústria alimentar.

Segundo Ferreira e colaboradores (2012), que isolou bactérias lácticas e leveduras da polpa do pequi, onde 25 isolados de leveduras foram identificados por testes bioquímicos. Identificaram leveduras como *Candida*, *Cryptococcus* e *Yarrowia* com predominância de *Candida krusei* (48% dos isolados). E segundo Soares e colaboradores (2015), que avaliou a biodiversidade de microrganismo com interesse industrial obtidos do pequi. Isolaram-se na fase de decomposição do fruto 17 microrganismos e 35 microrganismos foram recuperados da fração solo sob o pequi coletado.

3.5 – Aplicação Biotecnológica das Leveduras Oleaginosas

A biotecnologia surgiu como ferramenta para a fabricação de produtos ou processos, para a utilização específica que derivam de sistemas biológicos, células vivas, ou seus derivados. A biotecnologia pode ser usada para converter fontes renováveis de carbono em produtos relacionados à transportes, saúde e alimentação (D'AMBROSIO et al., 2017).

As leveduras são essenciais em diversos processos biotecnológicos devido sua alta capacidade de fermentação, versatilidade metabólica e baixo risco ambiental e a saúde humana. Portanto, as leveduras são organismos com grande potencial para diversas aplicações, sendo de

suma relevância ambiental, econômica, social e política (NANDY & SRIVASTAVA, 2018). Estudos mostram o potencial biotecnológico desta última espécie quanto à produção de enzimas, ácido cítrico e consumo de oleatos, alcanos, ácidos graxos e glicerol bruto (MENDES-SILVA et al., 2018).

O biodiesel derivado de lipídios e os combustíveis para aviação, recentemente ganharam muito interesse como combustíveis alternativos sustentáveis, devido à sua alta densidade de energia, características de queima limpa, respeito ao meio ambiente e biodegradabilidade. Atualmente, os lipídios produzidos em escala industrial são os obtidos de plantas e animais. No entanto, na última década, houve um aumento exponencial com foco em microrganismos capazes de acumular lipídios (ROBLES-IGLESIAS et al., 2023).

Um dos benefícios naturais desses microrganismos, como por exemplo as leveduras oleaginosas, não possui influências pelas estações do ano nem pelo clima. Além disso possuem propriedades específicas de acumular lipídeos dentro de compartimentos celulares em um curto período de tempo, que varia de 5 a 9 dias, dependendo da espécie da levedura. As mesmas, possuem capacidade de utilizar um grande número de substratos renováveis e materiais baratos, como resíduos agrícolas e industriais (YAN et al., 2014; PATEL et al., 2017).

A ideia de explorar a biomassa lignocelulósica não comestível como matéria-prima para leveduras oleaginosas pode reduzir muito o custo de produção do biodiesel. Além disso, os lipídios acumulados pelas leveduras oleaginosas assemelham-se quimicamente aos óleos vegetais e gorduras animais (PATEL et al., 2016; PATEL et al., 2017).

Durante anos, sabe-se que as leveduras oleaginosas podem acumular lipídios como óleos unicelulares. É importante notar também que nem todos os microrganismos podem armazenar lipídios como triacilglicerol (TAG). Os mecanismos pelos quais as leveduras lipogênicas podem produzir TAGs através da conversão de um determinado substrato são essencialmente dois: síntese *de novo* e síntese de *ex novo* (PAPANIKOLAOU & AGGELIS, 2011).

Quando o microrganismo está sob estresse, apresentando alta relação C/N com carência de nitrogênio, ocorre a síntese *de novo*. A síntese *do ex novo*, por outro lado, envolve a hidrólise de substratos hidrofóbicos para produzir ácidos graxos e glicerol que são então transportados para dentro da célula para serem remontados em TAGs (PAPANIKOLAOU & AGGELIS, 2011; ROBLES-IGLESIAS et al., 2023).

Leveduras são bastante úteis para a produção renovável e sustentável de óleos biodegradáveis com potencial para serem utilizados em combustíveis, produtos químicos e gêneros alimentícios. Muitas descobertas foram feitas no início da década sobre a produção de

óleo a partir de leveduras que impulsionaram novos estudos incluindo a descoberta de espécies que produzem grandes quantidades de lipídios, assim como condições que permitem tal produção através da conversão de resíduos de produtos em óleos microbianos em pequenas e grandes escalas (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013).

As leveduras oleaginosas mais conhecidas incluem os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Yarrowia*. Estas leveduras são capazes de acumular em média 40% de lipídios com relação à sua biomassa, entretanto em condições de limitação de nutrientes este acúmulo pode atingir 70%. O conteúdo e o perfil lipídico produzido diferem de espécie para espécie. *Cryptococcus curvatus* e *Cryptococcus albidus* acumulam 58% e 65% de lipídios, respectivamente. A composição lipídica também difere já que *Cryptococcus curvatus* acumula grandes quantidades de ácido palmítico, já o principal ácido graxo acumulado por *Cryptococcus albidus* é o ácido oleico (BEPOULOS et al., 2009).

Por muitas décadas a maioria das pesquisas relacionadas ao estudo de leveduras oleaginosas tem sido voltadas para espécies como *Y. lipolytica*, *Lipomyces*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus* e *Rhodosporidium toruloides*. Entretanto há dezenas de espécies oleaginosas que foram descobertas ao longo dos anos, mas tem sido menos estudadas. Abordando-se uma faixa mais ampla de leveduras oleaginosas, é possível realizar a seleção de leveduras e substratos específicos, tolerância à osmose, ao pH adverso e à inibição (SITEPU et al., 2014).

3.6 - A produção de pequi no estado do Tocantins

O pequi é uma árvore típica do cerrado brasileiro, sendo o seu fruto, o pequi (*Caryocar brasiliense*), comestível e bem aceito pela população deste bioma (RIBEIRO, 2010). Seu potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel também tem sido explorado, devido à sua composição lipídica favorável. O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando mais de 2 milhões de quilômetros quadrados, distribuídos por 10 estados e o Distrito Federal. Concentrado principalmente na porção central do país, o bioma possui zonas de transição com a Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Pantanal, e suas formações vegetais podem ser agrupadas em três classes principais: campestres, savânicas e florestais (SEAGRO, 2021) e a ocorrência do pequi se dá principalmente nos estados de Minas Gerais e Tocantins.

É de conhecimento popular que muitas famílias das regiões do estado do Tocantins, tais como, Paraiso, Pugmil, Chapada de Areia, Babaçulândia, Araguaína e Jalapão, vivem da coleta

e venda do fruto e produção do óleo de pequi (figura 4). Os valores cobrados pelo óleo extraído do pequi podem variar de cidade para cidade, dentro do estado do Tocantins (SILVA, 2017). No mercado municipal de Araguaína e Babaçulândia, por exemplo, 100 mL do óleo de pequi custa em torno de R\$ 10,00 (dez reais), enquanto no Jalapão o custo é de R\$ 20,00 (vinte reais). A venda do óleo de pequi nestas três cidades ocorre durante todo ano, mesmo sendo curta a temporada de colheita, devido a demanda em toda região (SILVA, 2017).

Figura 4: Ranking da extração vegetal em toneladas de frutos do pequi no Brasil.



Fonte: IBGE, 2021.

Foi apresentado um projeto de lei à Assembleia Legislativa do Estado do Tocantins, que torna o Pequi Tocantinense patrimônio cultural, gastronômico e ambiental do estado. Ressaltando que o pequi faz parte da identidade cultural do Tocantins e está presente na mesa e na vida de grande parte dos tocantinenses (SENADO,2021).

A lista de produtos da sociobiodiversidade, definida pela Portaria Interministerial nº 284 de 2018, compreende 101 espécies, incluindo duas espécies de pequi, *Caryocar brasiliense* e *C. coryaceum*, e são conceituados como:

Bens e serviços (produtos finais, matérias primas ou benefícios) gerados a partir de recursos da biodiversidade, voltados à formação de cadeias produtivas de interesse dos povos e comunidades tradicionais e de agricultores familiares, que promovam a manutenção e valorização de suas práticas e saberes, e assegurem os direitos decorrentes, gerando renda e promovendo a melhoria de sua qualidade de vida e do ambiente

em que vivem (BRASIL, 2018).

No Tocantins, o pequi é encontrado principalmente na região central, sul e sudeste do Estado. O fruto possibilita o aproveitamento de diversos formas. As famílias costumam usufruir do fruto em pratos típicos da culinária regional e no processamento para fazer doces, licores e conservas (SEAGRO, 2021).

Com sabor e cheiro peculiar, o pequi fruto típico do cerrado brasileiro, ganha destaque na culinária e em seus diversos derivados. A partir do mês de outubro começam a cair os frutos, que além de enriquecer os pratos, rendem um lucro a mais para muitas famílias. O fruto pode ser encontrado em feiras livres ou nos pequizeiros nas praças de Palmas e em terrenos baldios. O pequizeiro, que é uma das espécies mais marcantes da vegetação do cerrado, é tradição na mesa dos tocantinenses (SEAGRO, 2021).

O pequi é uma árvore que floresce e produz frutos durante um período específico do ano. O ciclo de floração e frutificação do pequi pode variar dependendo da região e das condições climáticas, mas geralmente ocorre entre os meses de setembro a novembro. A fase de floração do pequi é marcada pelo surgimento de inflorescências, que são agrupamentos de flores amarelas em forma de cachos. As flores do pequi são pequenas e possuem um aroma adocicado característico. Durante essa fase, ocorre a polinização das flores, que pode ser realizada por insetos, como abelhas e vespas, ou por outros mecanismos de polinização. Após a polinização, ocorre o desenvolvimento frutos do pequi (figura 5). Os frutos são inicialmente verdes e, à medida que amadurecem, adquirem uma coloração amarelo-alaranjada. Eles têm uma casca dura e espinhosa, que protege a polpa interna e as amêndoas (SEAGRO, 2021).

Figura 5: Arvore, florescência e fruto do pequi.

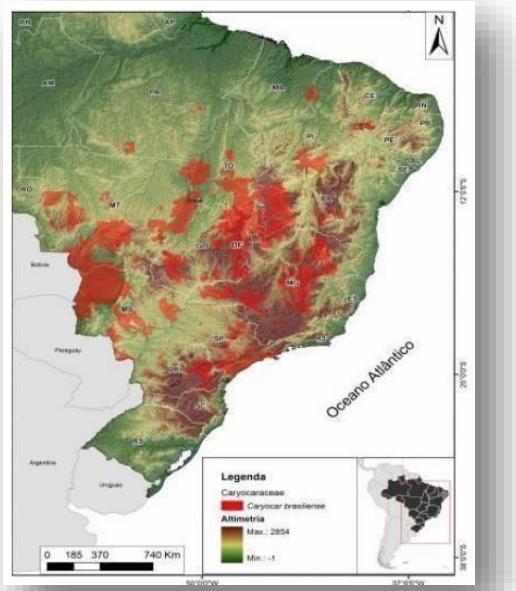


Fonte: SEAGRO, 2021.

O período de colheita do pequi geralmente ocorre entre os meses de janeiro a março, quando os frutos estão maduros e se soltam facilmente da árvore. É importante destacar que a floração e a colheita do pequi podem variar em diferentes regiões e de acordo com as condições climáticas específicas de cada ano. Além disso, existem variedades de pequi, algumas com ciclos de floração e frutificação ligeiramente diferentes. Acolheita do pequi é realizada manualmente, sendo necessário ter cuidado devido aos espinhos presentes na casca do fruto. Após a colheita, os frutos podem ser consumidos in natura, utilizados na culinária regional em diversos pratos típicos ou processados para a extração do óleo de pequi, que possui diversas aplicações industriais (RIBEIRO, 2021).

A fruta do pequi é pouco explorada em escala agroindustrial e comercial, resultando em grande perda de safra sob as árvores ou nas estradas do estado. No entanto, alguns extrativistas, agricultores familiares e vendedores conseguem lucrar com a fruta, especialmente aqueles que a revendem para caminhoneiros que retornam sem carga do norte do Tocantins, Pará e Maranhão. Esses vendedores conseguem faturar entre R\$ 12 mil e R\$ 15 mil diariamente entre as cidades de Oliveira de Fátima e Gurupi. No norte de Minas, região de Cerrado, o pequi é o principal produto florestal não madeireiro. A região possui 55 municípios, cobrindo uma área de 210 mil hectares (128.602 Km²), o que é cerca de 50% menor em extensão e número de municípios em comparação com o Tocantins (figura 6). No entanto, ela responde por 70% da produção nacional, colhendo 203 mil toneladas da fruta em 2019. É importante ressaltar que o Tocantins produz ainda mais, mas não possui dados contabilizados (RIBEIRO, 2021).

Figura 6: Distribuição do fruto do pequi no Brasil.



Fonte: CNCFlora, 2012.

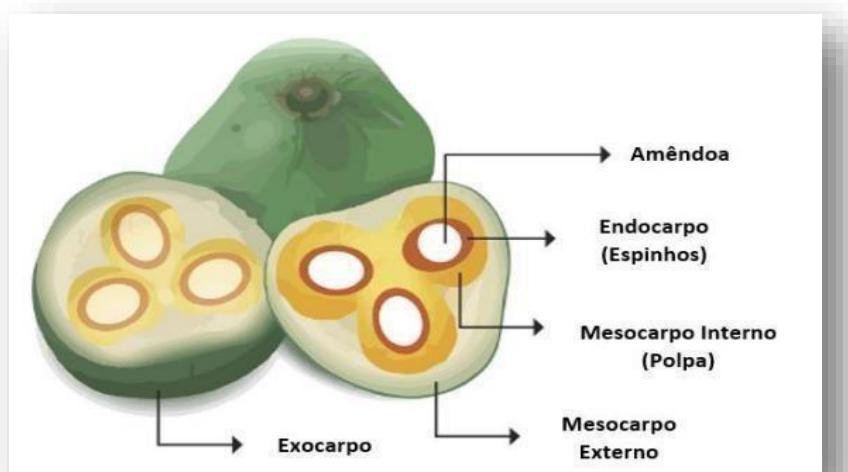
3.7 – Potencialidades do pequi

Quanto aos aspectos morfológicos, o pequizeiro se apresenta como uma árvore grande, medindo de 8 a 12 m de altura. Esgalhada, tortuosa, de tronco curto (5 m de comprimento) e recoberto por casca espessa (em torno de 10 mm), acinzentada, áspera, e com fissuras. Os frutos têm a coloração verde, globosos, de tamanhos variados, podendo pesar em torno de 100 g. O pequi pode possuir em seu interior um a quatro caroços, que apresentam um endocarpo de espinhos delgados e agudos, com polpa de cor amarelo alaranjada, farinhento e oleaginosa (GUIMARÃES, 2015). O fruto do pequi é constituído pelo exocarpo ou pericarpo, de coloração esverdeada ou marrom-esverdeada, mesocarpo externo, polpa branca com coloração pardo-acinzentada e mesocarpo interno, que constitui a porção comestível do fruto, possuindo coloração amarelada (FLAUZINO & MAYER, 2020).

A “casca” do pequi (epicarpo e mesocarpo externo) pode ser utilizada para a fabricação de sabão, ração animal e tinturaria, necessitando, porém, de pesquisa em métodos tecnológicos adequados. Processada em farinha, a casca do fruto apresenta teores consideráveis de fibra alimentar (39,97%), o que sugere potencial para uso como alimento funcional (CAMPOS, et al, 2019).

O endocarpo, que é espinhoso, protege a semente, ou amêndoas, que é revestida por um tegumento fino e marrom, sendo, também, uma porção comestível conforme a figura 7. Esta amêndoas é comestível, mas pouco explorada. As amêndoas do pequi possuem fatores antinutricionais como inibidores de tripsina, taninos e fitatos, entretanto com o processo de torrefação ocorre uma diminuição desses compostos, tornando-a uma alternativa alimentar, bem como uma fonte de renda para as famílias que trabalham com o pequi (ANTUNES et al, 2016).

Figura 7: Estrutura morfológica do fruto do pequi.



Fonte: Guimarães, 2015.

A utilização da amêndoia em produtos alimentícios ainda é baixa com relação a polpa, porém a mesma pode ser encontrada na produção de farofas salgadas, a qual necessita passar pelo processo de torra para ser utilizada. A amêndoia também é utilizada na produção de óleo branco (PRADO, 2019).

O pequi agrega um grande valor econômico, principalmente devido ao uso na culinária, na fabricação de polpas, como fonte de vitaminas, e na extração de óleos, os frutos são utilizados na alimentação humana e na indústria caseira (CORREIA & DUTRA, 2014)

Atualmente a maior demanda da fruta está em atender ao setor alimentício, onde a polpa é consumida e o caroço oleaginoso é descartado, sendo mais um ponto importante para obtenção de biocombustível a partir dessa biomassa. Os processos aos quais os resíduos do pequi podem ser aplicado para obtenção de biocombustíveis são os mais variados possíveis, dependendo do produto final desejado e da matéria-prima de origem (SILVEIRA, 2012).

O setor agrícola brasileiro produz diversas culturas, que incluem, cereais, leguminosas, nozes, hortaliças e frutas, sendo que o fruto do pequi tem características econômicas e importância cultural para a população do cerrado, principalmente para os que trabalham com agricultura familiar e comunidades agroextrativistas (IBGE, 2022; GHESTI et al., 2022). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, a produção de pequi atingiu 63.520 toneladas em 2020, com grande relevância nas regiões, norte (25.232 toneladas) e sudeste (32.928 toneladas) (IBGE, 2022).

Devido à complexidade da estrutura morfológica do fruto do pequi, por possuir vários espinhos e menor moagem, a maioria das sementes de pequi é descartada como resíduo agroindustrial, o que representa graves problemas ambientais que exigem alternativas mais sustentáveis para o gerenciamento do resíduo. Portanto a semente do pequi é uma matéria-prima com potencial para a conversão em energia (GHESTI et al., 2022) .

O óleo de pequi possui alta concentração de carotenoides. Seu potencial antioxidante torna o óleo dessa oleaginosa, uma opção atraente para a produção de biodiesel e biolubrificante, uma vez que essas substâncias irão conferir maior estabilidade oxidativa e térmica aos bioprodutos, mas ainda há poucas pesquisas na área (FERREIRA et al., 2019). Dados obtidos pela Embrapa mostram a utilização da cultura do pequi para a produção de biodiesel aliada à proteção do meio ambiente, e motiva a sua utilização como recurso para biocombustíveis (FERREIRA et al., 2019; ANTUNES et al., 2006).

A aplicação de novas tecnologias de conversão e o uso de combustíveis de base biológica podem contribuir para a reciclagem do dióxido de carbono atmosférico e o controle

dos gases de efeito estufa (DE MEIRA et al., 2021). O processo de conversão termoquímica é facilmente acessível para transformar frutas oleaginosas cruas em biocombustíveis com maior poder calorífico (CRUZ et al., 2020).

O pequi, com sua composição rica em lipídios, oferece condições favoráveis para o crescimento de microorganismos lipidogênicos, como as leveduras. A utilização desse fruto, como substrato para a produção de biodiesel, apresenta um potencial promissor, permitindo a produção de biocombustíveis de forma sustentável e contribuindo para a busca por fontes energéticas renováveis e ambientalmente conscientes (NASCIMENTO, 2018).

Os principais ácidos graxos no óleo da polpa de pequi são oléico e palmítico, 60% e 34%, respectivamente e também possui propriedades fitoterápicas e nutracêuticas, devido a presença de diversos antioxidantes naturais como as vitaminas C e E, compostos fenólicos, carotenoides e óleos essenciais, que podem atuar na proteção do DNA, lipídeos e proteínas, contra os danos causados por espécies reativas (AZEVEDO & RODRIGUEZ, 2004).

Com base nos estudos da literatura, os quatro componentes majoritários na amêndoia de pequi (*Cariocar brasiliense*), são: os lipídeos (51,5%), as proteínas (25,3%), os carboidratos (8,3%) e a fibra alimentar (2,2%), apresentando um baixo teor de umidade (8,7%) e um teor elevado de minerais representado pelas cinzas (4,0%). Já com relação a composição química dos triglicerídeos referentes aos ácidos graxos, são encontrados os seguintes: ácido oleico (47-60%) e o ácido palmítico (31-40%) como componentes majoritários, ao passo que o ácido linoleico (0,96-2,38%) e o ácido esteárico (2,61-4%) são encontrados em menor quantidade na composição (Figura 8) (LIMA et al., 2007; LIMA, 2019; FERREIRA, 2019).

Figura 8: Composição de ácidos graxos dos óleos de soja, pequi e mamona.

Ácido graxo	Óleo de Soja		Óleo de Pequi	Óleo de Mamona
			% wt	
Palmítico	C16:0	11,69	35,52	2
Esteárico	C18:0	3,14	1,86	2
Oleico	C18:1	21,69	59,19	2-7
Ricinoleico	C18:1;OH	-	-	82-90
Linoleico	C18:2	57,28	2,45	2-8
Linolênico	C18:3	6,20	-	-
Outros	-	-	0,98	-
Saturado	—	14,83	37,38	≤14
Insaturado	—	85,17	61,64	≥86

Fonte: RIBEIRO FILHO & FLEXA, 2023.

Com relação ao material graxo, altas concentrações de ácido oleico são encontrados tanto no óleo do caroço quanto da polpa, que devido as suas características peculiares de estabilidade oxidativa e presença de carotenoides, tornam-se fatores bastante interessantes para a produção do biodiesel (GUIMARÃES, 2015).

A quantidade obtida do óleo vegetal do pequi é dependente de alguns fatores como: fatores climáticos, espécie, colheita e modo de extração, sendo utilizado para diversas aplicações destacando-se a indústria de alimentos, aplicações medicinais, indústria de cosméticos e de biocombustíveis (OSTER, 2013).

As características de atividade antioxidantas observadas por substâncias constituintes do seu óleo tornam o uso do pequi bastante interessante para fins de produção de biodiesel, uma vez que o processo de oxidação é consideravelmente reduzido, sendo destaque em relação à maioria dos óleos vegetais que apresentam este processo como fator limitante. Com isso, o óleo de pequi eleva a estabilidade química dos bioproductos para diversas aplicações específicas (FERREIRA, 2019).

4- MATERIAIS E METODOS

4.1 Local do experimento e coleta das amostras

O experimento foi conduzido em condição in vitro, no Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada - LMGA, na Universidade Federal do Tocantins - UFT, campus Palmas – TO. Quanto as amostras avaliadas, foram coletadas de modo aleatório nas proximidades do campus; onde foram realizadas as coletas em três árvores.

Cada amostra coletada continha três frutos, que foram capturados ainda no pé para que não sofressem alterações de microrganismos e/ou deformações como queda, e locados em saco plástico estéril sem que tenham tocados ao chão e/ou sofridos alguma alteração microbiológica e mecânica de colheita. As avaliações tiveram inicio após a chegada das amostras no laboratório, não sendo armazenados para que não sofressem nenhuma alteração pela liberação de etileno durante o armazenamento.

Os frutos coletados foram devidamente identificados e separados. Os mesmos foram lavados por duas vezes em água corrente e em seguida submersos a solução contendo 1% de hipoclorito de sódio (NaClO) por 10 minutos, em seguida foram lavados novamente em água corrente a fim de retirar o máximo possível de outros microrganismos, como bactérias, que poderiam influenciar no isolamento das leveduras da casca do pequi.

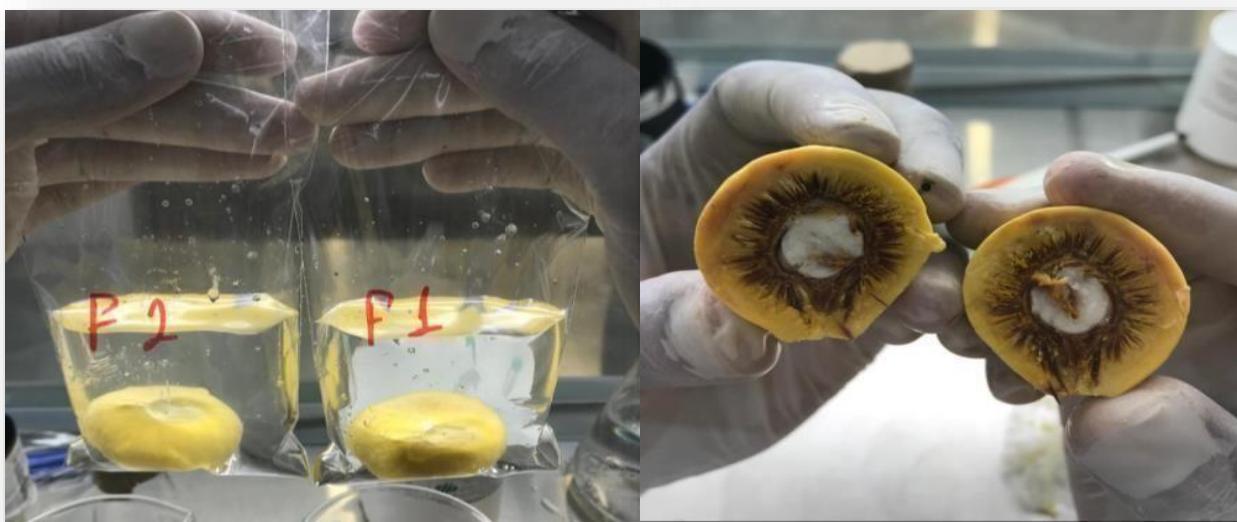
4.2 Isolamento das leveduras da polpa e semente do pequi

Os materiais, após esterilizados, foram colocados em sacos plásticos estéril devidamente identificados e submersos em 400 ml de solução salina (NaCl) para a polpa e 100 ml de solução salina para a semente, durante 02 (dois) minutos.

Feito isso, as amostras foram mergulhadas em Banho Ultrassônico (modelo Clean 1600) contendo água destilada, por 2 minutos (figura 9). Em seguida foram diluídos em tubos contendo solução salina até alcançarem a concentração de 10^{-3} e 10^{-4} para serem repassados as placas de petri em replicata.

Cada placa de petri com meio Sabouraud anteriormente preparado, receberam 10ml da solução contendo o material isolado, onde foi incubado na estufa à 30°C por durante 96 horas até o crescimento de todas as colônias possíveis, a fim de obter o isolamento das colônias de leveduras com características distintas para as próximas etapas de purificações.

Figura 9: Isolamento de leveduras da polpa e semente do pequi. Onde F1: fruto 1 e F2: fruto 2.



Fonte: Autor, 2022.

4.3 Pré-seleção das leveduras

Após o isolamento das leveduras para a realização do teste de quantificação das leveduras que apresentam características oleaginosas, e depois do crescimento de todas as colônias possíveis, as leveduras anteriormente purificadas, foram inoculadas novamente em placas de pétri com meio de cultivo proposto por Evans e Ratledge (1983) composto por (g/L): 30,0 glicerol P.A.; 7,0 KH₂PO₄; 2,0 Na₂HPO₄; 1,5 MgSO₄.7H₂O; 0,1 CaCl₂; 0,08 FeCl₃.6H₂O; 0,02 ZnSO₄.7H₂O; 0,8 extrato de levedura, pH 5,5; utilizando glicerol puro como fonte de carbono no preparo do meio, acrescidos com 2% de ágar, em replicata. As placas foram incubadas por 96 horas a 30°C até que as colônias atingissem aproximadamente 2-3 mm de diâmetro.

4.4 Identificação das leveduras com características oleaginosas

Na identificação das características oleaginosas, utilizou-se o protocolo segundo Evans & Ratledge, (1983) que segue descrito:

A solução foi preparada conforme recomendação do fabricante onde foi utilizado 0,8% de coloração Sudan Black para 1 litro de álcool etílico 95% adicionados a um elenmeyer e agitados até que atingisse uma solução totalmente homogênea. Onde cada placa receberia 30ml da solução preparada (figura 10):

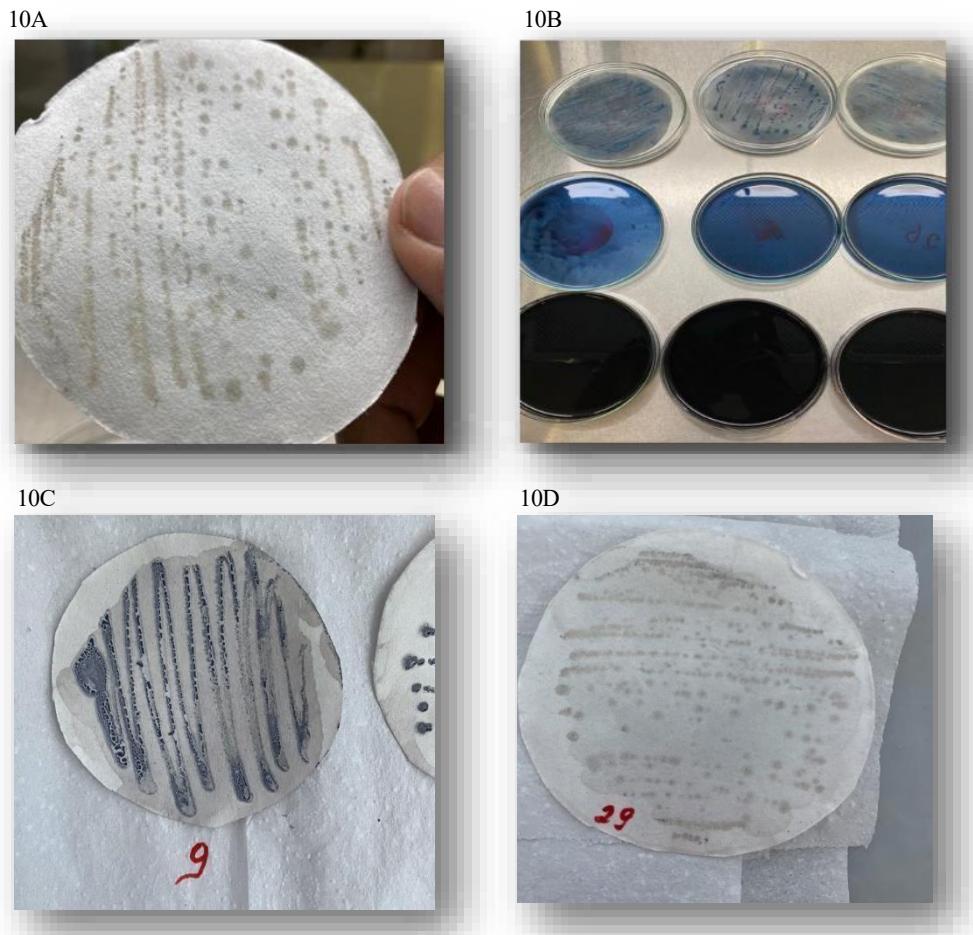
- Foi pressionado um papel filtro (9 cm de diâmetro Whatman N° 1) na placa original e removida a réplica de impressão.
- O papel de filtro foi levado a estufa por 20 minutos a 50°C para que o papel

secasse sem a perda do material copiado (figura 10A).

- Em seguida, o papel filtro foi mergulhado em outra placa de pétri contendo 30ml do corante Sudan Black B (0,08% p/v em 95% álcool) e deixado corar por 20 minutos (figura 10D).
- Após o término, o papel filtro foi lavado com álcool 95%, para a remoção do excesso do corante, de forma suave por 3 minutos.
- Em seguida, o papel filtro foi colocado em uma terceira placa contendo álcool 95% e deixado para descolorir por 5 minutos (figura 10B)..
- Por fim, o papel foi retirado da placa contendo álcool e deixado na câmara de fluxo laminar para que secasse (figura 10C).

Desse modo, as colônias com alto teor de lipídios apareceram em azul escuro/roxo e as colônias com baixo teor de lipídios, azul-celeste ou não coradas conforme (figura 10).

Figura 10: Etapas da realização do teste utilizando o corante sudan black para a qualificação das leveduras olegionasa. Onde: 10A: Réplica de impressão da levedura para o teste. 10B: Placas contendo o sudan black para identificação das leveduras lipogênicas. 10C: Levedura identificada como lipogênica utilizando a técnica com sudan black. 10D: Levedura identificada como não lipogênica utilizando a técnica com sudan black.



Fonte: Autor, 2022.

4.5 Preparo e meio de crescimento das leveduras oleaginosas

Após a qualificação das leveduras oleaginosas, elas foram mantidas em meio líquido YEDP, composto por: extrato de levedura 10 g; peptona 20 g; glicose 20 g; dissolvidos em água e acerto do pH para 6,5; foram adicionados 5 ml do meio em cada tubo e foram então autoclavados a 121°C e 1 atm de pressão, durante 20 min (BARNETT et al., 1983). Após a autoclavagem, os tubos foram colocados no fluxo laminar horizontal (Pachane), com a luz UV ligada, para a proteção contra agentes contaminantes durante a manipulação.

Em seguida, com a luz desligada as leveduras foram inoculadas, cada uma em um tubo, e incubadas em BOD (Biochemical oxygen demand) a temperatura de 28°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), durante três dias, quando foram utilizadas para inoculação em meios produtores de lipídios (BARNETT et al., 1983).

4.6 Meio de crescimento contendo soro de leite e manipueira para a determinação de lipídeos

O meio foi preparado utilizando 25 mL de soro de leite, 25 mL de manipueira e 0,5 g de extrato de levedura, para cada 100 mL⁻¹. Para o preparo do soro de leite, foi utilizada uma proporção de 1L de leite para 0,0008mL de coagulante lácteo a base de ácido acético, ácido cítrico e ácido lático. Para o preparo da manipueira, foi utilizado 1kg de mandioca fresca para 1L de agua filtrada. Após a mistura do soro de leite, da manipueira e do extrato de levedura, ajustou-se o pH para 6,5.

Foram realizadas duas repetições para cada uma das leveduras com características lipogênicas identificadas, colocando aproximadamente 60 mL do meio anteriormente preparado em cada frasco Erlenmeyer com capacidade de 125 mL, que foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C, em 1atm, adaptado de Cazetta et al. (2005). Em seguida, as leveduras anteriormente crescidas no meio YEDP foram adicionadas junto ao meio contendo soro de leite, manipueira e extrato de leveduras.

4.6.1 – Seleção das leveduras

As leveduras foram incubadas com agitação (mesa com agitação orbital 180 RPM. MARCONI), por sete dias, em seguida foram centrifugadas (centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206- R. FANEM) e realizada uma separação do meio restante e da biomassa produzida, onde foi seca a 105°C por 12 horas (estufa de secagem e esterilização, modelo 315 SE. FANEM).

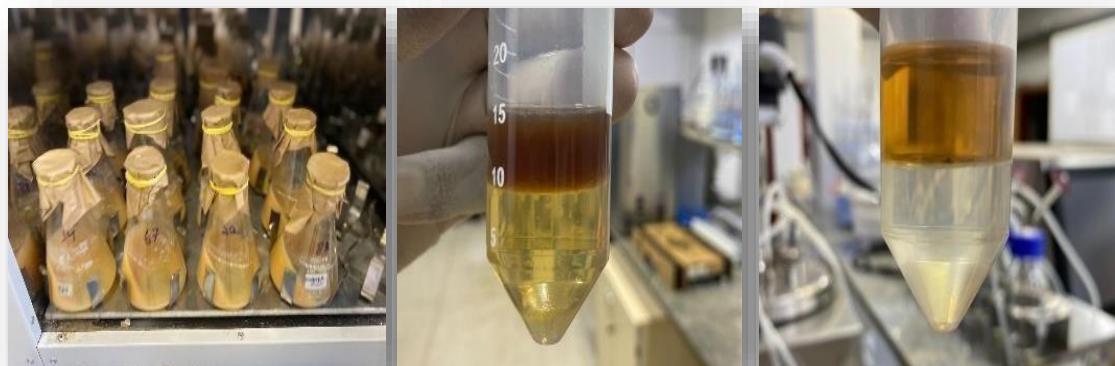
4.7 - Extração e determinação do acúmulo de lipídeos

A extração de lipídeos contidos na biomassa das leveduras, foi realizada utilizando a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959); onde a biomassa seca, previamente centrifugada, passou por digestão ácida para rompimento da parede celular da levedura.

Para a realização da digestão ácida foram utilizados 300 mg da biomassa seca que foi finamente triturada em um tubo, adicionados 5 mL de HCl 2M e diluídas em banho maria a 80 °C por 1 hora. Logo após, a biomassa resultante foi resfriada e centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos.

A extração dos lipídeos foi realizada pela solução de 10 ml de clorofórmio e 5 ml de metanol na proporção de 2:1, respectivamente. Em seguida, a mistura foi centrifugada e verificou-se a formação de um sistema trifásico, composto de uma fase inferior líquida (clorofórmio) um sólido interfacial (biomassa) e uma fase líquida superior (metanol e água). A fase inferior do centrifugado foi retirada (figura 11).

Figura 11: Processo de extração do lipídio da biomassa obtida, resultando em uma solução trifásica.



Fonte: Autor, 2022.

O procedimento foi repetido duas vezes para a extração dos lipídeos remanescentes da amostra. Ao final, um sistema trifásico foi formado e os lipídeos encontravam-se na parte inferior dissolvidos no clorofórmio, que foi evaporado e os lipídeos medidos em peso seco.

4.8 – Analise estatística

Para a compilação e comparação dos valores obtidos, foi realizada análises estatísticas no programa SISVAR – 2011, seguidos da análise de variância do teste TUKEY a 0,05% de significância.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Das leveduras identificadas como oleaginosas

Foram isoladas e identificadas 73 leveduras após o término da purificação com até 96 horas após o isolamento do material. Sendo 66 leveduras obtidas da polpa e 07 leveduras obtidas da semente do pequi, onde, foram avaliadas, em duplicatas, no entanto apenas 15 leveduras foram qualificadas como sendo leveduras lipogênicas, todas isoladas da polpa do pequi. Já as leveduras isoladas da semente do pequi, não apresentaram características macroscópicas de leveduras oleaginosas (tabela 1). A semente do pequi é difícil de descascar devido à complexidade apresentada pela estrutura morfológica da semente do pequi, que apresenta uma grande quantidade de espinhos e pelo estágio de maturação que a semente se encontrava.

Tabela 1: Desempenho das leveduras isoladas do pequi, em diferentes materiais testados com o corante Sudan Black. Identificando a quantidade de leveduras que coloriram

REGIÃO ISOLADA	TOTAL ISOLADA	COLORIU	NÃO COLORIU	IDENTIFICAÇÃO DA LEVEDURA	INTENSIDADE DA COLORAÇÃO
				2	***
				9	***
				13	*
				14	**
				21	*
				22	***
				26	***
POLPA	66	15	51	28	**
				36	**
				38	**
				43	*
				49	*
				55	**
				57	**
				60	***
SEMENTE	7	0	7	-	-
TOTAL:	73	15	58		

As diferentes intensidades de coloração das colônias foram indicadas de maneira qualitativa por: * fraco; **médio; ***forte para cada uma das duplicatas.

Através da coloração e da microscopia óptica é possível realizar a análise de grandes áreas e números de amostras em curto espaço de tempo, além de ser de fácil manipulação e pouco dispendiosa. A coloração de corpos lipídicos em fungos usando o corante sudan black é uma análise qualitativa, visando investigar micro-organismos oleaginosos. Embora essa técnica não permita uma visão precisa do conteúdo celular lipídico, fornece parcialmente as informações sobre a capacidade de acúmulo lipídico das leveduras testadas. Essas leveduras foram caracterizadas quanto a intensidade da cor.

De acordo com os resultados da tabela 1, é possível observar que existe uma distribuição das leveduras com características de organismo oleaginoso no ecossistema do cerrado, destacando-se as leveduras isoladas da polpa do pequi. Podemos notar ainda, que as leveduras 2, 9, 22, 26 e 60, apresentaram as maiores intensidades na coloração com Sudan Black, em relação as demais.

Cordeiro (1997) isolou leveduras de flores coletadas na China e selecionou, utilizando Sudan Black, oito que apresentavam potencial para produzir lipídeos, estudando a xilose como substrato.

Com o teste utilizando Sudan Black, podemos detectar leveduras lipogênicas, representando de forma qualitativa, o acúmulo de lipídeos nas células, pois o corante se liga aos lipídeos e atravessa a membrana citoplasmática, tingindo o citoplasma e os corpos lipídicos (CLs), que são inclusões de reserva lipídica. Assim, as regiões com mais lipídeos ficam mais escuras.

Contudo, o corante Sudan Back embora seja lipofílico não é específico para corar os lipídeos não polares como os Triacilglicerois (TAG). Em leveduras oleaginosas o TAG é estocado nos CLs. Portanto, o Sudan Back marca tanto o TAG quanto os lipídeos estruturais, tais como, os fosfolipídeos. Assim sendo, faz-se necessário uma análise posterior específica para corar especificamente o TAG. Uma vez que, os ácidos graxos de interesse biotecnológico para produção do biodiesel localizam-se nos CLs (POLI et al, 2014)

5.2 – Da produção de biomassa das leveduras oleaginosas cultivadas no soro do leite e manipueira.

Após identificarmos quais leveduras da polpa do pequi possuíam possibilidade de acúmulo de lipídeos, estas foram crescidas em meio contendo soro de leite, manipueira e extrato de leveduras. Segundo Adhikari et al. (2009) observaram um aumento de rendimento das leveduras com emprego de proteína de soro de leite e caseinato de sódio, como materiais de crescimentos.

Segundo os mesmos autores, isso ocorre pelo fato da proteína migrar preferencialmente para a interface da gota de ar, impulsionada por sua atividade de superfície. Isso corrobora para que as leveduras tenham sobrevivido crescendo e produzindo biomassas por 96h no meio contendo soro do leite e maniqueira a 30°C. Abaixo, segue a tabela 2 com as médias obtidas na produção de biomassa.

Tabela 2: Resultados da produção de biomassa de leveduras crescidas no meio contendo soro de leite, maniqueira e extrato de levedura.

Leveduras	Biomassa Produzida														
	2	9	13	14	21	22	26	29	36	38	43	49	55	57	60
(g)	0,83	2,09	0,07	1,16	0,91	2,58	0,47	0,08	1,02	1,97	0,94	0,04	0,78	0,96	0,88

Fonte: Dados do trabalho, 2023.

Podemos observar que as leveduras 9 e 22 apresentaram as maiores produção de biomassas, quando comparada com as demais leveduras. Anupama & Ravindra (2000) ressaltam a utilização de leveduras por suas altas taxas de crescimento, pela facilidade de separação do meio fermentativo, devido as maiores dimensões celulares e capacidade de floculação, e por suprirem suas necessidades por carbono e nitrogênio a partir de diversas matérias-primas consideradas resíduos das indústrias alimentícias e agroindústria.

Giec e Kosikowski (1982) observaram a eficiência de dez espécies de levedura que fermentam a lactose disponível no permeado do soro de leite, objetivando a produção e o rendimento da biomassa. As leveduras estudadas foram a *Kluyveromyces fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. lactis*, *Bretanomyces anomalus* e a *Candida blankii* e suas diferentes linhagens. Os experimentos foram conduzidos em meio suplementado com 0,5% de sais de sulfato de amônio - (NH4)2SO4 e fosfato monobásico de potássio - K2HPO4. Os resultados mostraram que altas taxas de aeração aumentaram significativamente o rendimento da biomassa e apontaram a *K. fragilis* ATCC 8582 como sendo a levedura de maior eficiência, alcançando 8 e 11 gL-1 de biomassa em 5 e 12% de lactose, respectivamente.

A maniqueira obtida da mandioca é um meio rico em ámido amplamente utilizada, e consiste em dois tipos principais de biopolímeros: a amilose e a amilopectina (ZUH, 2017).

Uma alternativa para superar as limitações dos amidos nativos, e assim, aumentar a utilidade deste polímero nas aplicações industriais é mediante sua modificação (SILVA et al., 2006).

A modificação das cadeias laterais não polares do amido proporciona um aumento na afinidade óleo-água (KREMPPEL et al., 2019). Uma das principais modificações químicas dos amidos é a incorporação do componente lipofílico anidrido octenilsuccinato (AOS), que confere ao amido a capacidade de adsorver na interface óleo-água e, assim, atuar como um estabilizador de emulsão (SILVA et al., 2016).

Analizando os qualitativamente a intensidade das levedura que apresentam caracteristicas de microorganismos lipogênicos na tabela 1, podemos notar que as leveduras 9 e 22 apresentaram uma cor intensa com relação a sua caracterização utilizando o corante sudan black, o que pode influenciar nas leveduras que mais produziram biomassa conforme tabela 3. Já as leveduras 13 e 49 foram as que apresentaram umas das menores intensidades de cores e menores produção de biomassa.

Onde os valores de biomassas produzida foram inferiores aos encontrados por Espinosa-Gonzalez et al., (2014) que, estudaram a produção de biocombustível por microalgas *Chlorella protothecoides* utilizando o permeado do soro de leite. Os experimentos foram conduzidos em sistema descontínuo e descontínuo alimentado, utilizando-se 182 gL⁻¹ de lactose, pH 5,5, e adição de nutrientes como o fósforo, magnésio e cálcio. A produção de biomassa alcançou 9,1 ± 0,2 gL⁻¹ em sistema descontínuo, e 17,2 ± 1,3 gL⁻¹ em descontínuo alimentado.

5.3 - Da extração e determinação do acúmulo de lipídios das leveduras oleaginosas

Houve diferença significativa nos valores médios quanto ao acúmulo de lipídio nas biomassas de leveduras oleaginosas, isoladas da polpa do pequi. Para tanto, é realizado um cálculo de lipídeos totais em porcentagem, em que considera-se a biomassa final na qual foram extraídos os lipídeos (CASTANHA, 2012). Equação:

$$\text{Lipídeos totais (LT) (\%)} = [\text{Massa total de lipídeos (g)} \times 100] / \text{biomassa (g)}.$$

Obtivemos então o cálculo da concentração de lipídios das leveduras selecionadas, a fim de verificar o acúmulo de lipídios por essas leveduras oleaginosas (tabela 3).

Tabela 3: Resultados da análise de variância das médias do acúmulo de lipídeos das leveduras isoladas do pequi.

Acúmulo de lipídeos em relação a biomeça produzida das leveduras isoladas do pequi															
LEVEDURAS	2	9	13	14	21	22	26	29	36	38	43	49	55	57	60
BIOMASSA (G)	0,83 ^F	2,09 ^B	0,07 ^H	1,16 ^C	0,91 ^E	2,58 ^A	0,47 ^E	0,08 ^H	1,02 ^{CD}	1,97 ^B	0,94 ^{DE}	0,04 ^H	0,78 ^G	0,96 ^C	0,88 ^{EF}
EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS (%)	15,4 ^D	27,5 ^B	0	21,4 ^{BC}	7,5 ^F	47,5 ^A	3,9 ^G	1,4 ^H	11,4 ^D	26,3 ^B	5,5 ^{FG}	0	8,4 ^F	14,4 ^D	11,3 ^{DE}

Os valores seguidos de letras iguais, não se diferem significativamente ao nível de 95% de confiança, de acordo com a ANOVA seguida do teste Tukey.

Muitos microrganismos acumulam corpos lipídicos no citosol, incluindo microalgas, protozoários, bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo microrganismos utilizados para a produção de lipídeos, considerados oleaginosos, devido à produção de 20% de sua biomassa em lipídeos e podendo chegar à capacidade de acumular até 70% em óleos unicelulares, esses microrganismos são denominados de oleaginosos e com grande potencial biotecnológico (RATLEDGE, 1996; ZHENG, et al., 2012; RAMALHO & SUAREZ, 2013; MORA 2014).

O teor de lipídio encontrado na levedura 22 (47,5%) figura 12, pode ser comparado de modo positivo com o acúmulo encontrado por Almeida (2016), que observou na levedura comercial *C. viswanathii*, ao utilizar diferentes fontes de carbono e condições limitantes de nitrogênio em cultivos submersos, uma maior produção de lipase utilizando azeite de oliva (26,78 U/ml), maior acúmulo de lipídio com trioleína (44,6%), suplementados com extrato de levedura.

Figura 12: Lipídeos acumulados de leveduras oleaginosas crescidas no soro do leite e manipueira.



Fonte: Autor, 2022.

Valores similares de acúmulos de lipídios por leveduras foram obtidos por Siqueira (2015), onde a cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* LBCM 17 exibiu a maior porcentagem de acumulação de lipídeos cerca de 36,60%, seguida pela cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* LBCM 17 com 27,90%.

Obteve-se resultados similares aos de Delabio et al. (2016), estudando leveduras para a produção de lipídios como matéria-prima para biodiesel, onde a levedura *R. Graminis* CBS 2826 apresentou maior produção de lipídios totais equivalente a 25,60%, no meio de crescimento contendo: esgoto, vinhaça, caldo de bambu e extrato de levedura.

O acúmulo de lipídios obtido com a levedura 22 (47,5%), também foi similar ao obtido por Abilhôa et al., (2018), que apontou o potencial de acúmulo de lipídios da leveduras *S. boulardii*, posto que, apresentou produção de biomassa de 15,60 g.L-1 e acúmulo de 55 % de lipídeos. Tornando ainda mais aceitável os dados encontrados nessa pesquisa.

Já a levedura *S. cerevisiae* apresentou acúmulo de 11% de lipídios. Valores que também se assemelham aos obtidos com as demais leveduras. Desta forma, observa-se o grande potencial da biomassa microbiana oriunda de *S. boulardii*, no que diz respeito a produção de biocombustíveis, já que as leveduras oleaginosas possuem o poder de acumular lipídeos e possuem capacidade de produzir ácidos graxos similares aos dos óleos vegetais (ABILHÔA et al., 2018).

As leveduras 13 e 49 não foram consideradas lipogênicas, por não apresentarem porcentagens de acúmulo de lipídeos. Pode ser explicado por fatores, devido a fisiologia da levedura, limitação de nutrientes, pH e temperatura do meio e produção de metabólitos (como etanol e citrato), que interferem diretamente no acúmulo lipídios que, por sua vez, interfere na síntese de proteínas e ácidos nucleicos (NELSON; COX, 2014).

O soro do leite e a manipueira utilizados, configuram-se como potenciais meios de crescimentos para as leveduras isoladas devido ao rendimento de conversão da fonte de carbono em biomassa e lipídios. Embora esteja um pouco distante de competir com o meio sintético e comerciais, principalmente nos níveis de acúmulo de lipídios, é possível aumentar as taxas de produção de óleos otimizando-se os processos e, dessa forma, aumentar os níveis de produção de biomassa e lipídios.

Segundo Silva e colaboradores (2018), o uso de um meio de cultivo à base de manipueira, suplementado de alguns nutrientes, possibilitou uma boa produção de biomassa e de lipídios, assim como um considerável rendimento dos lipídios em biomassa seca.

A manipueira mostrou-se como uma boa alternativa para a produção de lipídios microbianos, podendo ser utilizada em processos fermentativos, agregando valor ao resíduo e minimizando impactos ambientais por ela provocados.

Melhorias no processo de produção de lipídios microbianos, como a redução indo-se uma densidade celular mais elevada e com um maior acúmulo de óleo, podem resultar dos custos, melhor utilização das fontes de carbono, mais rápido crescimento microbiano, em um processo de produção economicamente viável (SITEPU et al., 2014).

5.4 – Identificação das leveduras oleaginosas 22, 9 e 38.

DADOS FUTUROS.

6 - CONCLUSÃO

Foram obtidas 15 leveduras isoladas do fruto do pequi com características de microorganismos oleaginósos com a técnica de coloração sudan blcak. Onde, a levedura 22 isolada da polpa do pequi, foi a que apresentou um maior percentual de acúmulo de lipídeos, utilizando o soro de leite e a manipueira como meio de crescimento para a obtenção de biomass;

A levedura 22, foram as que apresentaram uma das maiores intensidades de cor no teste coloração utilizando o corante Sudan Black e apresentou a maior produção de biomassa em meio contendo soro do leite, manipueira e extrato de levedura;

Dessa forma, a conversão de uma fonte de carbono originária do soro do leite e da manipueira em biomassa e lipídios, mostrou-se bastante eficientes, com resultados positivos e satisfatórios.

REFERÊNCIAS

ADHIKARI, B.; HOWES, T.; BHANDARI, B.R.; LANGRISH, T.A.G. Effect of addition of proteins on the production of amorphous sucrose powder through spray drying. *Journal of Food Engineering*, 94, 144–153, 2009.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; Obra originalmente publicada sob o título *Essential cell biology*, 4th edition. ISBN: 9780815344544. Artmed Editora, 12 de jun. de 2017 - 864 páginas

ALMEIDA, A. F.; Acúmulo De Lipídios Intracelulares E Imobilização De Lipase Por Candida Viswanathii: Potencial Para Hidrolise De Gordura De Frango. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins. 2016.

AMARETTI, A.; RAIMONDI, S.; SALA, M.; RONCAGLIA, L.; LUCIA, M.; LEONARDI, A.; ROSSI, M. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microbial Cell Factories*, v. 9, p. 73-78, 2010.

ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnol. Adv.* v. 18, p. 459–479, 2000.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. RESOLUÇÃO ANP Nº 45, DE 25.8.2014 - DOU 26.8.2014.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Especificação Do Biodiesel. Atualizado: Terça, 15 de setembro de 2020. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/biodiesel-bio>>. Acesso em: 10 de abril de 2023.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Nota Técnica Conjunta Nº 10/2021/ANP – Proposta de um novo modelo de comercialização de biodiesel. Rio de Janeiro, 14 de abril de 2021. Disponível em: < <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/ntconj2021.pdf>>. Acesso em: 10 de abril de 2023.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Painel Dinâmico de Produtores de Biodiesel. Atualizado em 24/03/2022 16h22. Disponível em: < <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/painel-dinamico-de-produtores-de-biodiesel>>. Acesso em: 10 de abril de 2023.

ANTUNES EC, NETO TOZ, FILHO NRA, CASTRO SS. Utilização do pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) como espécie recuperadora de ambientes degradados no cerrado e fornecedora de matéria-prima para a produção de biodiesel. In: I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. Brasília, DF, Brazil.2006. Available: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/pequi1_000g6vgwdq802wx5ok0wtedt3zzxcrff.pdf

ANTUNES, E. C.; ZUPPA, T. O.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; CASTRO, S. S.; Utilização do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) como espécie recuperadora de ambientes degradados no

cerrado e fornecedora de matéria prima para a produção de biodiesel. 2016.

APROBIO - ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE BIOCOMBUSTÍVEIS DO BRASIL; As 4 gerações de biocombustíveis. Disponível em: <https://aprobio.com.br/noticia/as-4-geracoes-de-biocombustiveis>. Acessado em 09 de julho de 2023.

ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2012, 16, 2070.

AZEVEDO, M. C.H.; RODRIGUEZ, A. D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, San Diego, v.117, p. 385-396, 2004.

BAI, ZHONGZHONG et al. D-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 with simultaneous utilization of cottonseed meal and corncob residue. *Bioresource Technology*, v. 207, p. 346-352, 2016.

BEPOULOS, A. et al. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 24, p. 7779–89, 2008.

BEPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 4, p. 1193–1206, 2011.

BARNETT, A., GOLDSTEIN, J. AND TASNA, R. I.: Apomorphine-induced hypothermia in mice: A possible dopaminergic effect. *Arch. mt. Pharmacodyn. Ther.* 198: 242-247, 1983.

BERGMANN, J. C.; TUPINAMBÁ, D. D.; COSTA, O. Y. A.; ALMEIDA, J. R. M.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2013, 21, 411

BORGHETTI, I. A. Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira. 2009, 103 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BIODIESELBR. Demanda de biodiesel pode atingir 9,5 bi de litros com B15 em 2023, diz EPE. BiodieselBR.com – epbr 27 jan. 2023. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/regulacao/politica/demanda-de-biodiesel-pode-atingir9-5-bi-de-litros-com-b15-em-2023-diz-epe-270123>>. Acesso em: 15 mar. 2023.

BLIGH, E.G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911–917, 1959.

BONK, Fabian et al. Exploring the selective lactic acid production from food waste in uncontrolled pH mixed culture fermentations using different reactor configurations. *Bioresource Technology*, v. 238, p. 416-424, 2017.

BOSSO, A et al. Substrate consumption and beta-galactosidase production by *Saccharomyces*

fragilis IZ 275 grown in cheese whey as a function of cell growth rate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 21, p. 101335, 2019.

BRASIL.; Ministério do Meio Ambiente. Portaria interministerial nº 284, de 30 de maio de 2018. Institui a lista de espécies da sociobiodiversidade, para fins de comercialização in natura ou de seus produtos derivados, no âmbito das operações realizadas pelo Programa de Aquisição de Alimentos-PAA. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 10 jul. 2018. Seção 1, p. 92.

CAMPOS, S. A.; Baru. pequi. jatobá: saiba como a Central do Cerrado escoa frutos colhidos por camponeses. *De olho nos ruralistas*, Sobradinho-DF, 15 jan. 2019. Disponível em: . Acessado em 10 de abril de 2022.

CANESIN, E. A. et al. Caracterização de Óleos Residuais para Produção de Biodiesel. *Elétron. J. Biotechnol.* Vol.17 nº1 Valparaíso ene. 2014. Versão On-line ISSN 0717-3458. Disponível em: . Acesso em: 28 ago. 2020.

CARRAZA. L.R; D'ÁVILA, J.C.C.; Aproveitamento integral do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*). *Manual Tecnológico*, 2º edição, Brasília-DF, 2010.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of The Total Environment*, v. 445–446, p. 385-396, 2013.

CASTANHA, R.F. Utilização do soro do queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas. USP. Piracicaba. 2012.

CASTRO, et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 27, n.1, p. 146-156, fev. 2004.

CAZETTA, V. E; et al.; Aplicação de vinhaça e do extrato de palhíço de cana-de-açúcar no controle de plantas daninhas . Tese (Mestre em Agronomia, na área de concentração: Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CHOEDIKATSAKUL, I.; NGAOSUWANB, K.; CRAVOTTOC, G.; ASSABUMRUNGRAT, S.; Biodiesel production from palm oil using combined mechanical stirred and ultrasonic reactor, *Ultrasonics Sonochemistry*. v. 21, p.1585-1591, 2014.

CORDEIRO, E. F.; Efeito das condições de cultivo na composição de ácidos graxos produzidos pelas leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae*. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1997.

CORREIA, F. P; DUTRA. R. S.; Pequi: Tradição e Patrimônio Goiano. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Gestão Ambiental)- Faculdade Católica de Anápolis. 2014.

CRUZ et al.; Biofuels from oilseed fruits using different thermochemical processes: opportunities and challenges. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 14, n. 3, p. 696-719, 2020.

D'AMBROSIO, VASIL; JENSEN MICHAEL, K.; Lighting up yeast cell factories by transcription factor-based biosensors. *FEMS yeast research*, v. 17, n. 7, 2017.

DE ALMEIDA et al. Óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) métodos de extração, constituição química e propriedades medicinais. *Diversitas Journal*, v. 3, n. 3, p. 557-563, 2018.

DE ANDRADE SILVA, C. A. OKA, M. L.; FONSECA, G. G.. Physiology of yeast strains isolated from Brazilian biomes in a minimal medium using fructose as the sole carbon source reveals potential biotechnological applications. *3 Biotech*, v. 9, n. 5, p. 191, 2019.

DE JESUS, M. V. et al. Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. *Scientia Plena*, v. 12, n. 5, 2016.

DELABIO, A. L.; REMÉDIO, R. R.; CAZASSA, S.; MONTEIRO, R. T. R.; HARDER, M. N. C.; bioenergia em revista: diálogos, ano 2, n. 2, p. 26-38, jul./dez. 2016.

DE MEIRA et al. Insights into the reuse of urban forestry wood waste for charcoal production. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 23, p. 2777-2787, 2021.

DE OLIVEIRA FLAUZINO, CAMILLA APARECIDA; MAYER, CASSIA ROBERTA MALACRIDA. Os espinhos do pequi. *Aprendendo Ciência* (ISSN 2237-8766), v. 9, n. 1, p. 36-40, 2020.

DE OLIVEIRA et al.; Estudo Da Estabilidade Oxidativa Do Biodiesel A Partir Do Óleo De Pequi Após Diferentes Tempos De Fritura. *Revista Tecnológica*, v. 29, n. 2, p. 460-474, 2020.

DE OLIVEIRA, F.C.; Como é o processo de produção de biodiesel. *Sustenare* (internet). 2021. Disponível em: <<https://www.sustenare.com.br/como-e-o-processo-de-producao-de-biodiesel/>>. Acesso em: 10 de junho de 2023.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE. Balanço Energético Nacional 2022. Relatório Síntese / Ano Base 2021. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoesdados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-675/topico631/BEN_S%C3%ADntese_2022_PT.pdf>. Acesso em: 09 de abril de 2023.

EPBR. CNPE reduz mistura de biodiesel para 10% em 2022. Nayara Machado, 29 de novembro de 2021, em Biocombustíveis, Política energética. Disponível em: <<https://epbr.com.br/cnpe-reduz-mistura-de-biodiesel-para-10-no-periodo-2022/#:~:text=O>>. Acesso em: 09 de abril de 2023.

ESPINOSA-GONZALEZ, I.E.; PARASHAR, A.; BRESSLER, D.C. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. *Bioresource Technology*, n. 155, p. 170–176, 2014.

EVANS, C.T. AND RATLEDGE, C. (1983); A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids* 18, 623 629.

FANG, T.; GUO, Mingruo. Physicochemical, texture properties, and microstructure of yogurt using polymerized whey protein directly prepared from cheese whey as a thickening agent. *Journal of dairy science*, v. 102, n. 9, p. 7884-7894, 2019.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Milk and milk products.

Rome, 2022. Disponível em: www.fao.org/cb9427en_milk. Acesso em 07 de julho de 2023.

FERNANDES, M. L. P; SILVA, E. M.; Prospecção de bactérias e leveduras lipolíticas do estado do Tocantins promissoras em aplicações industriais. In: 9º Seminário De Iniciação Científica. Resumos. Universidade Federal de Tocantins. Palma. 2013.

FERREIRA et al. Investigation of the thermal degradation of the biolubricant through TGFTIR and characterization of the biodiesel – Pequi (*Caryocar brasiliensis*) as energetic raw material. *Fuel* 245 (2019) 398–405.

FERREIRA et al. Isolation and identification of yeasts and lactic acid bacteria in pulp pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) as potential biocontrol agents. *Revista Higiene Alimentar*, v. 26, n. 212/213, p. 168-172, 2012.

FRIGON, J. C.; BRETON, J.; BRUNEAU, T.; MOLETTA, R.; GUIOT, S. R. The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 18, p. 4156-4163, 2009.

GHESTI et al. Towards a sustainable waste-to-energy pathway to pequi biomass residues: Biochar, syngas, and biodiesel analysis. *Waste Management*, v. 143, p. 144-156, 2022.

GAZETA DO CERRADO. Tocantins é destaque no extrativismo do pequi e do coco babaçu | Gazeta do Cerrado. Gazeta do Cerrado. Disponível em: <<https://gazetadocerrado.com.br/tocantins-e-destaque-no-extrativismo-do-pequi-e-do-coco-babacu/>>. Acesso em: 13 abr. 2023.

GIEC, A.; KOSIKOWSKI, F. V. Activity of lactose fermenting yeasts in producing biomass from concentrated whey permeates. *Journal of Food Science*, v. 47, p. 1892-1907, 1982.

GOMES, R. C. S.; Biodiesel X Diesel: Uma revisão sobre a produção e aplicações. 2023. 41 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Petróleo) - Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, Santos, 2023.

GUIMARÃES, M. G.; Produção de biocombustível líquido a partir de resíduo agroindustrial: caroço do pequi. 2015. Monografia (Graduação em Química Tecnológica)- Universidade de Brasília, Brasília- DF. 2015.

HUANG, J. Z.; SHI, Q. Q.; ZHOU, X. L.; LIN, Y. X.; XIE, B. F.; WU, S. G.; Studies on the breeding of *Mortierella isabellina* mutant high producing lipid and its fermentation conditions. *Microbiology*, v. 25 n. 4, p. 187–191, 1998.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. PEVS – Produção da Extração Vegetal e da Sivicultura. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-sivicultura.html?=&t=resultados> Acesso em 06 fev. 2022

JOHNRAVINDAR et al.; Lipid accumulation potential of oleaginous yeasts: A comparative evaluation using food waste leachate as a substrate. *Bioresource technology*, v. 248, p. 221-228, 2018.

JAKUBOWSKI, H. B.: Lipids in Water. CHAPTER 1 - LIPID STRUCTURE. Biochemistry Online: Table of Contents, 2016. Disponível em: <<https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/lipidstruct/ollipidwater.html>> Acesso em: 10 de junho de 2023.

KNOTHE, G.; RAZON, L.; Biodiesel fuels. *Progress in Energy and Combustion Science* 58 (2017) 36–59.

KOHLEIN, S. D.; Obese and Slim Yeast Cells. *Microscopic Insights into Cellular Lipid Metabolism*. Science Lab, 2008. Disponível em: <<http://www.leicamicrosystems.com/science-lab/obese-and-slim-yeast-cells/>> Acesso em: 10 de junho de 2023.

KREMPEL, M.; GRIFFIN, K.; KHOURYIEH, H.; Hydrocolloids as Emulsifiers and Stabilizers in Beverage Preservation. *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages*, p.427–465, 2019.

KRUNIĆ, T. Ž.; OBRADOVIĆ, N. S.; RAKIN, M. B.; Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture. *Food Chemistry*, v. 293, p. 74-82, 2019.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; *The yeasts: a taxonomic study*. Fourth Revised and Enlarged Edition. Elsevier, Amsterdam. 1998.

LEITE et al.; Qualidade do fruto do pequi (*Caryocar Brasiliense Camb.*) armazenado sob vácuo em diferentes temperaturas/Quality of pequi fruit (*Caryocar Brasiliense Camb.*) stored under vacuum at different temperatures. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 4, p. 21951-21958, 2020.

LIU, S. J.; YANG, W.B.; SHI, A. H.; Screening of the high lipid production strains and studies on its flask culture conditions. *Microbiology*, v.27, n.2, p.93–97, 2000.

MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Mapa do leite: Políticas públicas e privadas. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em 07 de julho de 2023.

MELLO, B. T. F.; FILHO, L. C; SILVA, C.; Production of biodiesel from hydroesterification reaction. *Revista UNINGÁ Review*, Maringá, v. 35, eRUR3522, 2020. ISSN 2178-2571. doi.org/10.46311/2178-2571.35.eRUR3522. Ciências Exatas, da Terra e Engenharias. 89 Disponível em:<https://library.douglascollege.ca/eds/detail?db=edsdoj&an=edsdoj.5afad24c65934eca92dc1ee9d898f925>. Acesso em: 10 de abril de 2023.

MENDES-SILVA, T. D. C.; BARBOSA, N. P. S. R.; VIDAL, E. E.; Bioprospecção de leveduras oleaginosas do Agreste Pernambucano: síntese de lipídios para a produção de biodiesel a partir do resíduo glicerol bruto. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, p. 092-099, 2018.

MIRANDA, M. R. S.; VERAS, C. A. G.; Aproveitamento de resíduos: um estudo da estimativa da energia de ativação do caroço de pequi para análise de viabilidade como fonte de energia

limpa. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 10, p. 97292-97302, 2021.

MORA, L. S. P.; Avaliação do crescimento de *Botryococcus braunii* em reator tubular empregando diferentes concentrações de fontes de nitrogênio e fósforo. 2014 74f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

MUNCH et al. Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodosporidium babjevae* and *Rhodosporidium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. *Bioresource Technology*, v. 185, p. 49-55, 2015.

MURARI et al. Optimization of bioethanol production from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* URM 7404. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 20, p. 101182, 2019.

NANDY, S. K.; SRIVASTAVA, R. K.; A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microbiological research*, v. 207, p. 83-90, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIELSEN, J.; Systems biology of lipid metabolism: From yeast to human. *FEBS Letters*, v. 583, n. 24, p. 3905–3913, 2009.

NILSSON, A.; NIELSEN, J.; Metabolic Trade-offs in Yeast are Caused by F1F0-ATP synthase. *Scientific reports*, v. 6, n. November 2015, p. 22264, 2016.

OSTER, V. V.; Influência do tempo de extração e da razão amostra: solvente no processo de extração do óleo do caroço do pequi visando a produção de biodiesel. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, 2013.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G.; Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, n. 8, p. 1031-1051, 2011.

PRADO, O. F. N.; Aproveitamento do endocarpo de pequi para desenvolvimento tecnológico de paçoca doce. (2019). Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Rio Verde- GO. 2019.

PATEL et al; Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 62, p. 836-855, 2016.

PATEL et al. Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 77, p. 604-616, 2017.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG N. R.: *Microbiologia conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Pearson, 1997. v. 1. p. 524.

PEQUI - PORTAL EMBRAPA. (2021). Peres, M.R Embrapa.br. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao->

[tecnologica/tematicas/agroenergia/biodiesel/materias-primas/pequi>](http://www.biodieselbr.com). Acesso em: 13 abr. 2023.

PEREIRA, M. P.; FERREIRA, S. C.; Produção de biodiesel: desafios e limitações no campo jurídico. *Revista de Extensão e Estudos Rurais* 2014, 1, 157-182. DOI: <https://doi.org/10.36363/rever112011%25p>.

PINHO et al. Produção de ácido lático em meio à base de efluentes da indústria de alimentos por cultura láctea mista imobilizada. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 22, 2019.

POLI, J. S.; DALLÉ, P.; SENTER, L.; MENDES, S.; RAMIREZ, M.; VAINSTEIN, M.; VALENTE, P.; Fatty acid methyl ester produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *Revista Brasileira de Biociências*, v.11, p. 203–208, 2013.

POLI, J. S; LUTZHOT, H. H.; KARAKASHEV, D. B.; VALENTE, P.; ANGELIDAKI, I.; An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Bioresource Technoloy*. p 388-391.2014.

PORTAL BIODIESEL BR. Disponível em <http://www.biodieselbr.com>. Acesso em: 10 de junho de 2023..

PRASANNA, k. S.; NARVEKAR, J.; NUNCIO, M.; GANUS, M.; SARDESAI, S.: What drives the biological productivity of the Northern Indian Ocean, *Geophysical Monograph Series*, 2009.

QUINTELLA, C. M. A. L. T.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. D. G. A.; COSTA NETO, P. R. D.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. C. D.; Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Quim. Nova* 2009, 32, 793-808.

RAMA et al.; Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal*, v. 98, p. 25-37, 2019.

RAMALHO H; F.; SUAREZ, P.A. Z. A; Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. *Revista Virtual de Química*.V. 5, N.1.p 2-15, 2013

RAMOS et al.;Tecnologias de produção de biodiesel. *Rev. Virtual Quim.* 2011, 3, 385-405. DOI: 10.5935/1984-6835.20110043.

RAVEN, P. H.; *Biology of plants*. New York: Worth Publisher, 1996.

RATLEDGE, C.; Microorganisms for lipids. In: MEESTERS, P. A.; HUIJBERTS, G. N. High-cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 45, n. 5, p. 575-579, 1996.

RIBEIRO, M.; Óleo de pequi: Qualidade físico-química, teor de carotenoides e uso em animais com carença de vitamina A. 2010. 86f. Dissertação (Ciência dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RIBEIRO, LUIZ.; Pequi: Minas, Goiás e Tocantins disputam patrimônio do “ouro do cerrado”.

Estado de Minas e Tocantins. Disponível em: <https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2021/09/12/internas_economia,1304765/pequi-minas-goias-e-tocantins-disputam-patrimonio-do-ouro-do-cerrado.shtml>. Acesso em: 30 de maio 2023.

RIBEIRO FILHO, P.; FLEXA, R. C.; Síntese e características tribológicas de lubrificantes de base biológica obtidos a partir dos óleos de pequi, soja e mamona / Paulo Roberto Campos Flexa Ribeiro Filho. – 2023. 116 f. : il. color.

RODRIGUES, A. A.; MACAGMAN, K. L.; SANTOS, B. C.; ALVES, M. I.; MOURA, A. B.; Selection And Identification Of Bacterial Strains Producing Of The Bioplastic Poly(3-Hydroxybutyrate). Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Campus Ponta Grossa - Paraná – Brasil. ISSN: 1981-3686/ v. 9, n. 1: p. 1771-1785, 2015.

ROBLES-IGLESIAS et al. Factors affecting the optimisation and scale-up of lipid accumulation in oleaginous yeasts for sustainable biofuels production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 171, p. 113043, 2023.

SANTIN, C. M. T.; Síntese de biodiesel pela transesterificação e esterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. Tese (Doutorado). URI - Campus de Erechim. Departamento de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. 213f. Erechim, RS. Setembro de 2013.

SANTOS, P. M.; PROSPECÇÃO, SELEÇÃO E APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE MANDIOCA (Manihot esculenta) NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS DE MANIPUEIRA COM *Saccharomyces cerevisiae*. 81f 2017. Dissertação de Mestrado (Pós – graduação em Biotecnologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2017.

SANTOS, T. T.; Identificação e análise do potencial enzimático de leveduras isoladas do afloramento rochoso do morro da pioneira – Bahia. 2012, 54f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biologia) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das almas, 2012.

SARA, M.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F.; Lipid production by *Yarrowia lipolytica* grown on biodiesel-derived crude glycerol: optimization of growth parameters and their effects on the fermentation efficiency. RSC advances, v. 6, n. 93, p. 90547-90558, 2016.

SCHÜTZHOLD et al. Computational Modeling of Lipid Metabolism in Yeast. v. 3, n. September, p. 1–13, 2015.

SEAGRO; Safra do pequi gera renda e incrementa a culinária tocantinense. Por Elmiro de Deus, 2021. Disponível em: Acessado em 19 de abril de 2023

SENADO, Agencia; PROJETO PREVÊ QUE PEQUI SEJA DECLARADO PATRIMÔNIO CULTURAL IMATERIAL; redação em 07/04/2023. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2021/04/07/projeto-preve-que-pequi-seja-declarado-patrimonio-cultural.com> Acessado em 10 de junho de 2023.

SICARD, D.; LEGRAS, J.L.; Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces*

sensu stricto complex. Comptes Rendus Biologies. 334: 22. 2011.

SIGNORI, L.; AMI, D.; POSTERI, R.; GIUZZI, A.; MEREGHETTI, P.; PORRO, D.; BRANDUARDI, P. 2016. Assessing an effective feeding strategy to optimize crude glycerol utilization as sustainable carbon source for lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Microb Cell Fact.*, v. 15, n. 1, p. 75-93.

SILVA et al. Produção de biomassa e lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando a manipueira como substrato. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 21, 2018.

SILVA, C. I. S.; Otimização das condições de cultivo da levedura *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921 para produção de lípidos carotenóides em frascos agitados. 2014. p. 53. Dissertação (Mestre em Engenharia Alimentar) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

SILVA, M. H. R; GUERRA, O. G; BLINI, R. C. B.; Isolamento de linhagens de levedura de folhas de espécies arbóreas da biodiversidade do cerrado produtoras de amilases. *Colloquium Vitae*. v.. 5, n. Especial, p. 09-15, Presidente Prudente, 2013.

SILVA, J. A. B.; da. Produção de biodiesel e biolubrificantes: avaliação de novos catalisadores e antioxidantes naturais. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. 170.f. Natal-RN, 2019.

SILVA, P. A.; Potencial tecnológico de leveduras Não-Saccharomyces. 2022. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

SILVA, R. J. M. C. L.; Simulação e otimização da purificação do etanol via absorção e da produção de biodiesel via destilação reativa: uma abordagem multivariada. MS thesis. Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

SILVA, R. J. M. C. L.; SOUZA, T.P.C.; SILVA, J.P.; PACHECO, J.G.A.; SILVA, J.M.F. Ethanolic Biodiesel Production: A comparative study between a plug flow reactor and reactive distillation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 34, n. 3 , p. 811-819, 2017

SILVA , T. R.; CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE PEQUI (Caryocar brasiliense) DAS CIDADES DE BABAÇULÂNDIA, ARAGUAÍNA e JALAPÃO (BAJA). Monografia – UFT, Araguaína – TO. 2020.

SILVA, E. K.; AZEVEDO, V. M.; CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D.; MEIRELES, M. A. A.; Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Whey protein isolate versus modified starch. *Food Hydrocolloids*, v.56, p.71–83, 2016.

SILVA, G. O.; TAKIZAWA, F. F.; PEDROSO, R. A., FRANCO, C. M. L; LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. S.; DEMIATE, I. M.; Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. *Ciências Tecnologia Alimentos*, v.26, p.188-197, 2006.

SILVA, J.; Obtenção de lipídios por processo biotecnológico utilizando a manipueira como substrato, João Pessoa: Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, 2016. 83 p. Dissertação (mestrado).

SILVA et al.; Produção de biomassa e lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando a manipueira como substrato. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 21, 2018.

SILVEIRA, I. S.; Pirólise de pequi (*Caryocar brasiliense*) – Avaliação do rendimento e da caracterização química da fração orgânica / Iara Sousa Silveira. - Palmas, 2012. 63f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em 28 de setembro de 2012.

SIQUEIRA, F. S.; Bioprospecção De Leveduras Oleaginosas Capazes De Utilizar O Glicerol Bruto Como Fonte De Carbono. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – Mestrado, 56f. Ouro Preto – MG. 2015.

SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC , R.; LEVIN , D.; BLOCK , D. E.; GERMAN, J. B.; BOUNDY-MILLS, K. L.; Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, v. 32, p. 1336–1360, 2014.

SOARES et al. < b> Assessment of lipolytic activity of isolated microorganisms from the savannah of the Tocantins. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 37, n. 4, p. 471-475, 2015.

SOUZA et al.; Caracterização e Utilização de Óleo Residual de Pequi (*Caryocar brasiliense*) na Produção de Biocombustíveis Líquidos. *Revista Interdisciplinar de Pesquisa em Engenharia*, v. 5, n. 2, p. 41-49, 2020.

SOUZA, K. S. T.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R.; Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 4, p. 497-506, 2014.

SPIER, Franciela; BUFFON, Jaqueline G.; BURKERT, Carlos AV. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: lipid content and fatty acid profile of biomass. *Indian Journal of Microbiology*, v. 55, p. 415-422, 2015.

SAWANGKEAW, R.; NGAMPRASERTSITH, S.; A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 25, p. 97–108, 2013.

TOLMASQUIM, M.T.; Fontes renováveis de energia no Brasil. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

TOSUNGNOEN, S.; CHOOKIETWATTANA, K.; DARARAT, S.; Lactic acid production from repeated-batch and simultaneous saccharification and fermentation of cassava starch wastewater by amylolytic *Lactobacillus plantarum* MSUL 702. *APCBEE procedia*, v. 8, p. 204-209, 2014.

TRAESSEL, G, K.; OESTERREICH, S. A.; Aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos do pequi (*Caryocar brasiliense*). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 20, p. 185-195, 2018.

VANIA. F. M.; ÓLEO DE PEQUI -UM NUTRACÊUTICO COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE: UMA REVISÃO DE LITERATURA Aluna: Lizzie Martins do Nascimento (Matrícula: 12/0125463). [s.l.: s.n.], 2018. Disponível em:

<https://bdm.unb.br/bitstream/10483/21240/1/2018_LizieMartinsDoNascimento_tcc.pdf>. Acesso em: 30 maio 2023.

WOODBINE, M.; Microbial fat: Microorganisms as potential fat producers. *Progress in industrial microbiology*, 1959, vol. 1, p. 181-245.

YAN et al. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. *Applied Energy*, v. 113, p. 1614-1631, 2014.

ZHENG et al. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, p. 5- 50, 2012.

ZHU, F.; Encapsulation and delivery of food ingredients using starch-based systems. *Food Chemistry*, v.229, p. 542–552, 2017.