



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**RENAN DE SOUZA SOARES**

**SELEÇÃO DE BACTERIAS DA RIZOSFERA DE *Lactuca sativa* CAPAZES DE  
BIOCONVERTER GLICEROL EM 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL**

**GOIÂNIA**  
**2016**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Nome completo do autor: Renan de Souza Soares

Título do trabalho: SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE *Lactuca sativa* CAPAZES DE BIOCONVERTER GLICEROL EM 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do (s) arquivo (s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

---

Data: 27/ 07 / 2016

---

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

### 1. Identificação do material bibliográfico:

Dissertação       Tese

### 2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Renan de Souza Soares

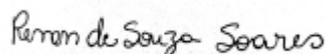
Título do trabalho:

**SELEÇÃO DE BACTERIAS DA RIZOSFERA DE *Lactuca sativa* CAPAZES DE BIOCONVERTER GLICEROL EM 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL**

### 3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Data: 01 /06 /2022

---

Assinatura do (a) autor (a) <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**RENAN DE SOUZA SOARES**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE *Lactuca sativa* CAPAZES DE  
BIOCONVERTER GLICEROL EM 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

**GOIÂNIA  
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Souza Soares, Renan

Seleção de bactérias da rizosfera de *Lactuca sativa* capazes de bioconverter glicerol em 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol [manuscrito] / Renan Souza Soares. - 2016.  
XCV, 95 f.

Orientador: Prof. José Daniel Gonçalves Vieira.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Pró reitoria de Pós-graduação (PRPG), Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Rizobactérias. 2. Fermentação. 3. Glicerol. 4. Biodiesel. I. Gonçalves Vieira, José Daniel, orient. II. Título.

CDU 502/504



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO Nº 002/2016**

Aos vinte e três dias do mês de maio do ano de dois mil e dezesseis, às oito horas, reuniu-se na Sala de Leitura do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP/UFG, a Banca Examinadora composta pelos Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira – CIAMB, a Prof.ª Dr.ª Daniela de Melo e Silva – ICB/CIAMB, e o Prof. Dr. Geraldo Sadoyama Leal – CBIO/UFG, para, sob a presidência do primeiro, proceder a defesa da Dissertação intitulada: **“Seleção de bactérias da Rizosfera de *Lactuca sativa* capazes de bioconverter glicerol em 1,3-Propanodiol e 2,3-Butanodiol”**, de autoria de Renan de Souza Soares, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (CIAMB), área de concentração em Estrutura e Dinâmica Ambiental. Foi realizada a avaliação oral no sistema de apresentação e defesa de dissertação de autoria do discente. Terminada a avaliação oral, a Banca Examinadora reuniu-se emitindo os seguintes pareceres mediante as justificativas e sugestões abaixo:

Membro da Banca	Parecer (Aprovado/Reprovado)	Assinatura
Dr. José Daniel Gonçalves Vieira	<i>Aprovado</i>	<i>[Assinatura]</i>
Dr.ª Daniela de Melo e Silva	<i>Aprovado</i>	<i>[Assinatura]</i>
Dr. Geraldo Sadoyama Leal	<i>Aprovado</i>	<i>[Assinatura]</i>

**JUSTIFICATIVAS e SUGESTÕES:**

*As sugestões foram enviadas ao candidato nos exemplares de leitura.*

Após a avaliação, o referido candidato foi considerado *Aprovado* na defesa de dissertação. Às *11:30* horas, o Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira, Presidente da Banca Examinadora, deu por encerrada a sessão e, para constar, lavrou-se a presente Ata.

*[Assinatura]*  
Prof.ª Dr.ª Daniela de Melo e Silva  
Membro Titular

*[Assinatura]*  
Prof. Dr. Geraldo Sadoyama Leal  
Membro Titular

*[Assinatura]*  
Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira  
Presidente

## AGRADECIMENTOS

A **Cicera de Souza Soares** e **Antônio Soares da Silva**, os grandes responsáveis pela minha vida e, conseqüentemente, por eu ter trilhado esse caminho profissional tão difícil e gratificante. Depois de anos de trabalho diários dedicados ao sonho de manter meus irmãos e eu na escola para, assim, não só nos construirmos cidadãos de bem, mas pessoas capazes de sonhar tão alto quanto vocês juntos ousaram sonhar, posso afirmar que vocês conseguiram. Como um casal que vivenciou desde muito cedo um contexto social difícil, vocês demonstraram com a alma que não há barreiras para se fazer o que está ao nosso alcance, por tanto, com a alma vocês se tornaram exemplo de vida, de amor, de carinho. Foram as primeiras pessoas que acreditaram em mim, quando nem eu mesmo acreditava, e são as pessoas a quem sempre agradecerei minhas conquistas.

Ao professor **José Daniel Gonçalves Vieira** por ter aceitado ser meu orientador e me auxiliar no percurso de desenvolvimento do trabalho de pesquisa. Muito obrigado pela solicitude e paciência nos meus momentos de dúvida e nas horas em que eu não parava de enviar mensagens te texto cobrando HPLC, correção dos textos, artigos e marcando reuniões.

A **Geraldo Sadoyama Leal** por ter me orientado ainda na graduação e me encorajado a realizar o processo seletivo do mestrado. Muito obrigado pela orientação, pelos fins de semana no laboratório, pela oportunidade de realizar iniciação científica e principalmente por ter me apresentado a microbiologia.

A **Ariana Alves Rodrigues** pela amizade e por ter me ajudado tanto, satisfazendo minhas curiosidades, explicando técnicas, dando conselhos no trabalho e na vida, sendo minha amiga em horas tão difíceis de auto cobrança para obter resultados. Sua força e companheirismo diários me fez acreditar que as coisas dariam certo no final. Muito obrigado pela paciência, pelos sorrisos, abraços e bons dias.

A **Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira** por ser esse exemplo de cientista e colega de trabalho a ser seguido, sempre impecável e dedicado ao extremo ao que se propõem fazer. Muito obrigado por sempre estar disposto a ajudar, mesmo atarefado com os afazeres da carreira docente ou claramente preocupado com seus outros deveres.

A **Geisa Louise Mariz Lima** e **Aliny Gomes Silva** minhas duas companheiras de vida. Geisa sem o seu exemplo de vida eu jamais teria vivenciado parte das minhas experiências, pela sua força de vontade e coragem eu saí de casa e fui morar numa cidade tão tão distante para começar a trilhar minha carreira acadêmica, desde então

crecemos, choramos e amadurecemos juntos. Aliny minha passarinha amiga, seu companheirismo foi muito importante nos meus momentos de preocupação, quando pensei que o mundo estava contra mim. Muito obrigado as duas por ouvir minhas lamentações, me tranquilizar, por sempre estarem dispostas a cederem o ombro amigo.

A **Isabela Gomes dos Santos** e **Thomas Martins de Oliveira** meus dois irmãos de alma. Vocês acompanharam todo meu trajeto profissional, assim como juntos sofremos e rimos muito desde a finalização da graduação. Muito obrigado pela amizade incondicional e pela força, sem o companheirismo dos dois eu jamais teria conseguido coragem para realizar e conquistar muitas coisas que alcancei na minha vida.

A **Alessandra Alves Ramos** minha irmã de outra mãe. Você acompanha essa trajetória desde a quinta série e sempre é um ombro amigo nos momentos que precisei, sua contribuição para esse trabalho foi inestimável. Muito obrigado pela paciência, compreensão, companheirismo e apoio.

Aos meus amigos Lamabianos **Marcus Vinícius Forzani de Araújo, Igor Daniel Alves Ribeiro, Thaís Maitan Vieira, Luann Guilherme Vieira dos Reis, Raylane Pereira Gomes, Aysha Jussara Ivonilde Carrim**. Diariamente me possibilitaram um crescimento profissional e pessoal inestimável. Formamos uma verdadeira família no laboratório, sempre nos ajudando, sofrendo com o experimento do colega que não dá certo, buscando soluções juntos e comemorando pela conquista do outro. A oportunidade de vivenciar o mestrado foi única não apenas pela possibilidade da obtenção de um título, mas por ter me dado a oportunidade de conhecer cada um de vocês.

As professoras **Daniela de Melo e Silva** e **Lara Stefania Netto de Oliveira Leão Vasconcelos** por terem contribuído no desenvolvimento do meu trabalho durante a qualificação. Muito obrigado pela solicitude em participar de uma fase tão importante da minha carreira acadêmica.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais** pela oportunidade de realização do mestrado, a **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos e a **FAPEG** pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Muito obrigado a todos que direta ou indiretamente possibilitaram a materialização desse momento.

A felicidade pode ser encontrada inclusive nos momentos mais escuros; só é preciso se lembrar de acender a luz.

**Alvo Percival Wulfric Brian Dumbledore**  
**(J. K. Rowling)**

## RESUMO

A produção de coprodutos é um dos principais contratempos da cadeia produtiva do biodiesel. Um dos coprodutos de produção mais representativa é o glicerol. Nesse aspecto, o presente estudo possui o objetivo de contextualizar o uso e produção de combustíveis fósseis e biocombustíveis, com destaque o biodiesel, e investigar o potencial biotecnológico de rizobactérias de alface (*Lactuca sativa*) na bioconversão do glicerol em produtos de valor agregado. Para esse fim, foi realizado um levantamento bibliográfico acerca do uso de combustíveis fósseis e desenvolvimento do mercado do biocombustível, além das potencialidades biotecnológicas da utilização do glicerol em processos fermentativos e, a partir de amostras de solo rizosférico, foi realizado a bioprospecção de micro-organismos com a capacidade de utilizar glicerol como fonte única de carbono e o bioconverter em 2,3-Butanodiol e 1,3-Propanodiol. Como forma de preservar a manutenção e o desenvolvimento das atividades urbanas é necessária uma mudança na matriz energética, uma vez que os combustíveis fósseis se mostram insustentáveis a longo prazo, seja por ser um recurso finito ou por ocasionar impactos ambientais e na saúde humana. Por meio da implementação de políticas que visaram investir na pesquisa e produção de biodiesel o Brasil se destaca como grande produtor do composto. No segmento experimental, dentre os micro-organismos amostrados e identificados houve destaque à família *Enterobacteriaceae*. Todos os isolados apresentaram perfil bioquímico/fisiológico heterogêneo e pertencentes a gêneros notadamente empregados em pesquisas na bioconversão do glicerol. Três amostras foram identificadas como produtoras simultâneas dos compostos de interesse, AG3 foi o melhor produtor simultâneo de 2,3-BD e 1,3-PD, 0.522 g.L<sup>-1</sup> e 0.735 g.L<sup>-1</sup> respectivamente. AG6 destacou-se na produção de 1,3-PD, 0.842 g.L<sup>-1</sup>. Portanto, a sustentabilidade proporcionada pelos biocombustíveis, em destaque o biodiesel, traz uma perspectiva promissora ao futuro energético e a utilização de coprodutos gerados pela cadeia produtiva do biodiesel pode contribuir na valorização do biodiesel. Rizobactérias de *Lactuca sativa* possuem potencialidade biotecnológica para bioconversão do glicerol, constatação promissora para o desenvolvimento do setor de biodiesel e biorrefinarias.

**Palavras-chave:** Rizobactérias; Fermentação; Glicerol; Biodiesel.

## ABSTRACT

The coproducts production is one of the main setbacks in the biodiesel's productive chain. One of these coproducts, the most representative is the glycerol. In this aspect, this study aim to contextualize the use and production of fossil fuels and biofuels, mostly biodiesel, and to investigate the biotechnological potencial of lettuce's (*Lactuca sativa*) rhizobacteria on glycerol bioconversion into value-added products. For such purpose, it was conducted a literature search about the use of fossil fuels and the biofuels market development, besides the biotechnological potential of the use of glycerol in fermentative processes. From rhizosphere soil samples, it was bioprospected micro-organisms with the ability to utilize glycerol as the sole carbon source and in bioconvert 2,3-butanediol and 1,3-propanediol. In order to preserve the maintenance and development of urban activities a change in the energy matrix is necessary since fossil fuels are a finite resource and shown to be unsustainable or cause impacts in environment and human health. Through the implementation of policies that aimed to invest in research and production of biodiesel Brazil stands out as a major producer of the compound. In the experimental segment, among the sampled and identified microorganisms, the family *Enterobacteriaceae* was highlighted. All isolated presented biochemical / physiological profile heterogeneous and belonging to genera notably used in the glycerol bioconversion. Three samples were identified as simultaneous producers of compounds of interest, simultaneously AG3 was the best producer of 2,3-BD and 1,3-PD, 0522 g.L<sup>-1</sup> and 0.735 g.L<sup>-1</sup>, respectively. AG6 stood out in the production of 1,3-PD, 0842 g.L<sup>-1</sup>. Therefore, the sustainability provided by biofuels, highlighting biodiesel, brings a promising perspective to future and the use of co-products generated by the biodiesel production chain can contribute to the appreciation of biodiesel. *Lactuca sativa*'s rhizobacteria have the biotechnological potential for bioconversion of glycerol, promising discovery for the development of biodiesel and biorefinery sector.

**Keywords:** Rhizobacteria; Fermentation; Glycerol; Biodiesel.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
<b>B5</b>	Mistura de 5,0% (v/v) de Biodiesel no Diesel
<b>B6</b>	Mistura de 6,0% (v/v) de Biodiesel no Diesel
<b>B7</b>	Mistura de 7,0% (v/v) de Biodiesel no Diesel
<b>B50</b>	Mistura de 50% (v/v) de Biodiesel e Diesel
<b>B100</b>	Biodiesel Puro
<b>COVs</b>	Compostos Orgânicos Voláteis
<b>CTAB</b>	Brometo de Hexadeciltrimetil Amônio
<b>D100</b>	Diesel Puro
<b>GEI</b>	Green Economy Initiative
<b>IPTSP</b>	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
<b>ISR</b>	Resistência Sistêmica Induzida
<b>LAMAB</b>	Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>OD</b>	Densidade Óptica
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PGPRs</b>	Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas
<b>PNPB</b>	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
<b>PNUMA</b>	Programa da Nações Unidas para o Meio Ambiente
<b>Probiodiesel</b>	Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel
<b>RDP</b>	Ribosomal Database Project
<b>UFG</b>	Universidade Federal de Goiás
<b>ULSD</b>	Diesel com Baixo Teor de Enxofre
<b>UNFCCC</b>	Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança Climática
<b>VP</b>	Voges-Proskauer
<b>1,3-PD</b>	1,3-Propanodiol
<b>2,3-BD</b>	2,3-Butanodiol
<b>3-HPA</b>	3-Hidróxi-propioanaldeído

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b>	Transesterificação de triglicerídeos com etanol, utilizando NaOH como catalisador para produzir ésteres etílicos (biodiesel) e glicerol.....	23
<b>Figura 3.2</b>	Metabolismo do glicerol por <i>Klebsiella pneumoniae</i> , gerando produtos de interesse industrial.....	25
<b>Figura 4.1</b>	Relação filogenética entre rizobactérias isoladas e cepas tipo com maior similaridade. Na análise foram utilizados método Neighbor-joining, modelo de Jukes-Cantor e os valores de <i>bootstrap</i> são baseados em 2000 repetições. <i>Thermococcus coalescens</i> foi utilizado como grupo externo.....	51
<b>Figura 4.2A</b>	Curva de crescimento dos isolados de rizobactérias AG1 e AG3 ao longo de 72 horas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicerol (OD <sub>600nm</sub> ).....	53
<b>Figura 4.2B</b>	Curva de crescimento dos isolados de rizobactérias AG4 e AG5 ao longo de 72 horas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicerol (OD <sub>600nm</sub> ).....	54
<b>Figura 4.2C</b>	Curva de crescimento dos isolados de rizobactérias AG6 e AG7 ao longo de 72 horas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicerol (OD <sub>600nm</sub> ).....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b>	Produção de 2,3-BD e 1,3-PD por diferentes cepas bacterianas a partir da metabolização do glicerol.....	27
<b>Tabela 4.1</b>	Identificação dos micro-organismos mais prováveis a partir da sequência parcial do gene 16S rDNA.....	51
<b>Tabela 4.2</b>	Produção e rendimento da fermentação do glicerol em concentração de 20g.L <sup>-1</sup> .....	55

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	<b>BIODIESEL E MEIO AMBIENTE: Utilização biotecnológica de micro-organismos na bioconversão do glicerol em compostos de valor agregado</b> .....	15
	<b>Resumo</b> .....	15
	<b>Abstract</b> .....	15
3.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
3.2	<b>BIOCOMBUSTÍVEIS: Meio Ambiente e Saúde</b> .....	16
3.3	<b>BIODIESEL NO BRASIL</b> .....	21
3.4	<b>GERAÇÃO DE COPRODUTOS NA CADEIA PRODUTIVA DE BIODIESEL</b> .....	22
3.5	<b>BIOPROSPECÇÃO COMO FERRAMENTA DE APROVEITAMENTO DO GLICEROL</b> .....	24
3.6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	28
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
4	<b>BIOCONVERSÃO DE GLICEROL EM 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL POR RIZOBACTÉRIAS DE <i>Lactuca sativa</i></b> .....	44
	<b>Resumo</b> .....	44
	<b>Abstract</b> .....	44
4.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	45
4.2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	46
4.2.1	Isolamento de rizobactérias.....	46
4.2.2	Identificação molecular das bactérias isoladas .....	47
4.2.3	Determinação da tolerância microbiana a diferentes concentrações de glicerol .....	48
4.2.4	Determinação de uma metodologia de triagem rápida de rizobactérias produtoras de 2,3-butanodiol .....	48
4.2.5	Fermentação do glicerol e determinação dos produtos de fermentação .....	49
4.2.6	Análise estatística .....	49
4.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	50
4.3.1	Isolamento e identificação de morfoespécies .....	50
4.3.2	Avaliação de crescimento em diferentes concentrações de glicerol .....	52
4.3.3	Triagem de produção de 2,3-butanodiol e processo fermentativo .....	55
4.4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	58
	<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
	<b>ANEXO I – Meios de Cultura</b> .....	66
	<b>ANEXO II – CONTIGs: Sequências de DNA</b> .....	68
	<b>ANEXO III – Cromatogramas</b> .....	72
	<b>ANEXO IV – Regras de Submissão</b> .....	80

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Compostos a base de petróleo são largamente utilizados como fonte de energia. Contudo estes recursos são finitos e tornam-se mais caros ao longo do tempo, além de sua utilização possuir alto impacto ao meio ambiente e, conseqüentemente, na saúde pública. Portanto, a fim de diminuir a dependência mundial de combustíveis fósseis, reduzir a emissão de gases poluentes e produzir combustíveis a partir de bases renováveis, diversos países iniciaram pesquisas e produção de biocombustíveis (LOPEZ et al., 2009; MASCARENHAS, 2009; TAVARES, 2008; WILLKE; VORLOP, 2008).

Na busca de diversificação da matriz energética embasada no desenvolvimento sustentável de biocombustíveis o biodiesel ganha destaque, entretanto, assim como a produção de outros biocombustíveis, sua viabilização é atrelada a conseqüente produção de vários rejeitos, atualmente denominados de coprodutos. A exploração desses compostos, anteriormente descartados, para produção de outros bens comerciáveis é uma forma de tornar o biodiesel um produto mais competitivo no âmbito econômico e “ambiental amigavelmente”, visto que a possibilidade de amenizar seus impactos ambientais (LEONETI; ARAGÃO-LEONETI; OLIVEIRA, 2012).

Para a fabricação de biodiesel diversas matérias-primas podem ser utilizadas como fonte de óleo, sendo as principais os óleos de girassol, soja, palmáceas e gorduras (ANUAR; ABDULLAH, 2016; BHUIYA et al., 2016; VEGA-LIZAMA et al., 2015). Entretanto, durante o processo químico de transesterificação há a produção de intermediários e coprodutos, independente da fonte de óleo vegetal e da técnica de produção do combustível renovável. Dentre eles o mais representativo é o glicerol, com uma produção média de 10% do total na cadeia produtiva de biodiesel. Portanto, com a produção mundial crescente de biodiesel, grande quantidade de glicerol é produzida anualmente (ALMEIDA, 2011; MEKHILEFA; SIGAA; SAIDURB, 2011).

Tornar o valor comercial do biodiesel mais atrativo que os derivados do petróleo e reduzir o impacto ecológico e econômico de sua produção, pode ter grande contribuição do incentivo às pesquisas na bioprospecção de micro-organismos. Identificar e analisar micro-organismos, genes, enzimas e intermediários metabólicos, entre outros constituintes biológicos, que possuem papel nesse processo de bioconversão pode auxiliar na produção de bioprodutos de valor agregado (SACCARO JUNIOR, 2013). Bioprospectar micro-organismos que utilizam o glicerol como fonte de carbono em seu metabolismo heterotrófico pode fortalecer economicamente a indústria

produtora de biodiesel e, conseqüentemente, reduzir a produção de coprodutos potencialmente poluidores, além de beneficiar a produção de biocombustíveis, fonte energética menos poluidora e renovável (PALMA; PALMA, 2012).

Atributos microbianos que o tornam adaptados aos mais variados ambientes acabaram por diversificar as linhagens de micro-organismos, disponibilizando, assim, inúmeras oportunidades de pesquisa de bioprospecção (MITCHELL; PILPE, 2011). Por meio do desenvolvimento de características adaptativas as plantas conseguiram manter relações com um variado número de cepas microbianas na chamada rizosfera. A rizosfera corresponde a região do solo influenciado pelas raízes dos vegetais, portanto, o solo adjacente aos sistemas radiculares (ZAIDI et al., 2015). O grupo microbiano presente neste habitat, principalmente as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPRs), possui uma competência e capacidade de biodisponibilizar nutrientes e promover o crescimento vegetal (GARDNER; ACOSTA-MARTINEZ; SENWO; DOWND, 2011; HAMPP; HARTMANN; NEHLS, 2012; OLIVEIRA et al., 2009). Entretanto, pouco se conhece sobre suas outras possíveis aplicabilidades biotecnológicas (CATTELAN, 1999).

Dentre os compostos produzidos pelas PGPRs os compostos orgânicos voláteis (COVs) compreendem um conjunto de compostos capazes de favorecer o crescimento vegetal de forma direta ou indireta. Esse grupo, que abrange o 2,3-butanodiol (2,3-BD), dentre outros, possuem diferentes funções benéficas aos vegetais, como permitir uma melhor adaptação das plantas ao ambiente por meio de atenuação do estresse a seca e altas concentrações de sais, além de induzir o crescimento vegetal e a resistência a patógenos (LUGTENBERG, 2015; MAHESHWARI et al., 2012; NAKAJIMA et al., 2005). Como exemplo dessa capacidade microbiológica a rizosfera de alface (*Lactuca sativa*) é identificada por abrigar uma diversidade microbiana capaz de produzir esses compostos voláteis e manter, portanto, uma relação ecológica positiva com o vegetal (LUGTENBERG, 2015).

Como ambiente pontuado com muitas oportunidades a serem avaliadas a nível biológico, a rizosfera de *Lactuca sativa* apresenta os gêneros microbianos *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Bacillus* previamente estudados como suas PGPRs naturais (FERREIRA et al., 2011; KOHLER et al., 2006; LEVEAU, 2014). Há, neste aspecto, uma equivalência entre as PGPRs identificadas na rizosfera de alface e cepas microbianas estudadas como bioconversoras do glicerol, como as amostras pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* produtoras de biopolímeros (SATHIANACHIYAR;

DEVARAJ, 2013). Há identificação de isolado de *Bacillus subtilis* (BISWAS et al., 2012) produtor de 2,3-butanodiol (2,3-BD) e o isolado de *Bacillus amyloliquefaciens* (YANG et al., 2015) produtor de 2,3-BD com capacidade industrial. Em pesquisas relacionadas a bioconversão de glicerol por meio de fermentação, destaca-se a capacidade de algumas cepas microbianas para bioconversão do coproduto em produtos de grande interesse comercial como 1,3-propanodiol (1,3-PD) e de 2,3-BD, assim como as PGPRs produtoras de COVs, além de ácido láctico, ácido cítrico, bioetanol e butanol (ALMEIDA, 2011).

Devido a esse cenário, a utilização de coprodutos da indústria diversifica as possibilidades de alcance do desenvolvimento sustentável e uma relação mais harmoniosa entre a necessidade de produção de biocombustíveis e a manutenção do meio ambiente (MARELLI et al., 2015). Dessa forma, a bioprospecção de rizobactérias de *Lactuca sativa*, capazes de utilizar glicerol como fonte única de carbono, pode apresentar uma oportunidade de avaliação e seleção de novas linhagens de microorganismos melhores fermentadores do coproduto, uma vez que cepas pertencentes a esse grupo microbiano possuem a capacidade natural de produção de compostos de alto interesse industrial. Portanto, o presente estudo pretende investigar o potencial biotecnológico de novas rizobactérias de *Lactuca sativa* de produção simultânea de 2,3-BD e 1,3-PD a partir da fermentação do glicerol.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o potencial biotecnológico de rizobactérias de *Lactuca sativa* na bioconversão do glicerol.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar micro-organismos rizosféricos de alface (*Lactuca sativa*) capazes de utilizar glicerol como fonte única de carbono;
- Testar uma metodologia rápida para a identificação de bactérias produtoras de 2,3-butanodiol (2,3-BD);
- Avaliar a resistência dos micro-organismos isolados a diferentes concentrações de glicerol;
- Determinar a capacidade de produção simultânea de 1,3-propanodiol (1,3-PD) e 2,3-butanodiol (2,3-BD) pelas morfoespécies isoladas em meio de cultura contendo glicerol como fonte única de carbono;

### **3 BIODIESEL E MEIO AMBIENTE: Utilização biotecnológica de rizobactérias na bioconversão do glicerol em compostos de valor agregado**

Soares, R. S.<sup>1</sup>, Vieira, J.D.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMAB), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Campus I, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, 74605-050

#### **RESUMO**

A inviabilidade de utilização de combustíveis fósseis a longo prazo abriu espaço para o desenvolvimento e impulso do mercado dos biocombustíveis, levando ao início dos avanços de uma matriz energética renovável. Entretanto, a produção de biodiesel é sujeita a uma representativa coprodução de glicerol, composto que perdeu valor de mercado devido a altas quantidades oriundas da produção do biocombustível. Como alternativa para o aproveitamento do coproduto excedente ressalta-se sua utilização como fonte de carbono em biorefinarias, para produção de compostos de valor agregado. Nessa perspectiva, buscamos apresentar como se deu a evolução da preocupação mundial acerca da sustentabilidade ambiental e os modos de produção, o consequente desenvolvimento do mercado do biocombustível e as potencialidades biotecnológicas da utilização do glicerol em processos fermentativos.

**Termos para indexação:** Biodiesel, glicerol, compostos de valor agregado e processos fermentativos.

***BIODIESEL AND ENVIRONMENT: The biotechnological use of rhizobacteria in glycerol bioconversion in value-added compounds.***

#### **ABSTRACT**

The impractical use of fossil fuels in long-term boosted and developed the biofuels market, resulting to the initial advances of renewable energy matrix. However, biodiesel production is subjected to an expressive glycerol co-production, a compound that lost its market value due to high amounts arising from biofuel production. As an alternative use, the overplus coproduct can be utilized as carbon source in biorefineries for the production of value-added compounds. From this perspective, we seek to show how was the evolution of the global concern about environmental sustainability and the modes of production, the consequent development of the biofuel market and biotechnological potential of using glycerol in fermentation processes.

**Index terms:** Biodiesel, glycerol, value-added compounds and fermentation processes

### **3.1 INTRODUÇÃO**

A utilização de fontes energéticas renováveis, a partir de biomassa como matéria prima, possui grande incentivo no mundo através de implementações de políticas

regionais e internacionais a fim de diminuir os impactos ambientais produzidos pela utilização dos combustíveis fósseis e obter créditos de carbono, atividade comercial industrial em que empresas incapazes de diminuir sua emissão de carbono compram créditos de empresas que diminuem sua emissão abaixo da meta (DEPPERMANN et al., 2016). Este incentivo permitiu um amplo aumento mundial na produção do biodiesel, cerca de  $7,5 \times 10^9$  milhões de galões/ano foram produzidos no ano de 2013 (ZHANG et al., 2016). O glicerol é o principal coproduto da produção do biodiesel e encontra neste processo a sua fonte mercadológica fundamental. Entretanto, o aumento da manufatura do biocombustível eleva em excesso o contingente de glicerol coproduzido, tornando o mercado consumidor incapaz de assimilá-lo por completo. Este problema que fez o preço do produto cair no mercado, não tornando rentável seu processo de purificação e venda (LAPUERTA; RODRÍGUEZ-FERNANDEZ; GARCÍA-CONTRERAS, 2015).

Os contratempos causados pelo excesso de produção de glicerol como seu manuseio, transporte e descarte, se estenderam para novas propostas de utilização desse excedente, dentre os principais, destaca-se sua utilização como fonte de carbono em processos fermentativos. Sua bioconversão é atrativa em razão do seu baixo preço e do metabolismo microbiano ser capaz de produzir diferentes compostos de alto valor agregado que, portanto, aumentariam o interesse mercadológico do glicerol e agregaria valor a cadeia produtiva do biodiesel (ALMEIDA, 2011). Nessa perspectiva, torna-se de grande importância a identificação e melhoramento de novas linhagens microbianas capazes de metabolizar glicerol e o bioconverter em compostos de valor agregado.

### **3.2 BIOCOMBUSTÍVEIS: Meio Ambiente e Saúde**

Universalmente aplicado em diferentes setores, o petróleo qualifica-se como a principal fonte de energia utilizada no mundo (SONG et al., 2015). Este recurso é a matéria-prima para a produção de derivados que, por exemplo, sustentam os meios de transporte mais comuns e geram energia e produtos semimanufaturados para o setor industrial (TAVARES, 2008). Entretanto, a utilização de recursos fósseis passa por uma recente avaliação acerca do seu custo, disponibilidade e impacto sobre a qualidade ambiental e, conseqüentemente, sobre a vida humana. Diante de tais preocupações, as vias de produção baseadas em matrizes energéticas renováveis, ganharam destaque nos últimos anos (LOPEZ et al., 2009). Dentre a busca de fontes de energia novas e

renováveis, a produção de biocombustíveis passou por um forte desenvolvimento em todo o mundo (WILLKE; VORLOP, 2008).

Diversas pesquisas científicas importantes auxiliaram na melhor compreensão sobre aumento da temperatura global, fenômenos climáticos e suas relações com a atividade humana. Essas discussões acerca da problemática ambiental repercutiram, primeiramente, em publicações como a de Manabe e Wetherald (1967) que comprovaram a existência de uma relação entre o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico e a conseqüente elevação da temperatura. Wang et al. (1976) que confirmaram que gases produzidos por atividades antropogênicas possuem a capacidade de alterar o clima. Ramanathan (1988) faz um importante debate sobre as evidências e complexidades dos mecanismos existentes na Teoria do Efeito Estufa a partir do início do desenvolvimento industrial. Inclui-se também neste tema, as pesquisas desenvolvidas por King (1993) e Parmesan (1996) que associam a perda de biodiversidade com as mudanças climáticas. Portanto, práticas baseadas, principalmente, no uso prevalente de combustíveis fósseis mostrou-se insustentável a longo prazo e durante muito tempo encobriu alternativas potencialmente menos agressivas ao ambiente e ao bem-estar humano. O que acarretou no consumo inconseqüente dos recursos ambientais e na desvalorização do capital natural (D'AVIGNON; CARUSO, 2011). Diante dessas investigações científicas estava posto, portanto, um cenário que mobilizou reuniões entre várias nações na tentativa de discutir a continuidade do desenvolvimento industrial e tecnológico e sua sustentabilidade ambiental.

Discussões sobre maneiras de, a longo prazo, diminuir a concentração de material particulado e gases do efeito estufa e/ou tóxicos no ar dos grandes centros urbanos, locais onde ocorrem as maiores taxas de emissão e formas sustentáveis de desenvolvimento foram os principais temas abordados em diversos encontros internacionais. Inicialmente, a consolidação do desejo mundial de conduzir esforços para tentar encontrar resolução para a problemática ocorreu com a criação do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, o PNUMA (do inglês *United Nations Environment Programme*-UNEP) e a consolidação e comprometimento com o Protocolo de Kyoto, durante a Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre a Mudança Climática (*The United Nations Framework Convention on Climate Change*-UNFCCC) no Rio de Janeiro/RJ, Brasil, em 1992. Nos debates subseqüentes em diferentes países, tornou-se consensual que a atividade humana, principalmente a desenvolvida após a Revolução Industrial, contribuiu fortemente para o desenvolvimento de adversidades

ambientais diretamente relacionadas ao desequilíbrio ambiental, tanto em escalas regionais, quanto em escala global (LAU; LEE; MOHAMED, 2012).

O Protocolo de Kyoto marca materialmente o impulso global para a redução da emissão de gases agravantes do efeito estufa e, conseqüentemente, um parcial interesse mundial de seguir em direção à sustentabilidade. Apesar do termo sustentabilidade possuir diferentes definições é consensual que os padrões de desenvolvimento humano não podem extrapolar a capacidade de o planeta absorver e conseguir se reestruturar (ARNOLD, 2015). Na visão de Veiga (2014), a sustentabilidade compreende a dinamicidade do “Sistema Terra”, caracterizada por ciclos de modificações entre transformações e adaptações ao longo de seu processo histórico, por isso, é necessário prudência e responsabilidade para compreender riscos e incertezas antes de interferir nesse processo natural.

Nessa perspectiva o termo “economia verde” surgiu como uma das formas de viabilizar a sustentabilidade dos processos de desenvolvimento. O termo é designado para atividades econômicas que conseguem associar concomitantemente o bem-estar humano e igualdade social com a redução da degradação ambiental e redução do comprometimento dos recursos naturais (NKONYA; ANDERSON, 2015). A economia verde, portanto, procura contribuir para a estabilidade entre as atividades humanas e a manutenção e, quando necessária, para a recuperação do capital natural, tratando-o como um bem crucial para o desenvolvimento de benefícios globais (D'AVIGNON; CARUSO, 2011).

Como estratégia de incentivo a economia verde o PNUMA promoveu no ano de 2008 a Iniciativa Economia Verde (sigla em inglês GEI- *Green Economy Initiative*) com a finalidade de incentivar estratégias globais para promoção da economia verde. No ano de 2011, o GEI publicou o relatório sobre o real emprego e desenvolvimento da economia verde, denominado “Rumo à Economia Verde: caminhos para o desenvolvimento sustentável e a erradicação da pobreza”, e nele os organizadores apontaram algumas sugestões a diferentes setores da economia para se alcançar a transição entre a atual prática econômica e a economia verde. Dentre as recomendações cabíveis ao setor energético, o principal ponto foi a adoção de combustíveis renováveis de baixa emissão de carbono como forma fundamental para atingir a economia verde (PAVESE, 2011; PNUMA, 2011).

Em consequência dos biocombustíveis serem classificados como “ambientalmente amigáveis”, além da sua contribuição para diminuir a dependência

energética não renovável, minimizar a emissão de poluentes e controlar a concentração de gases de efeito estufa, os investimentos na sua produção concentram-se, principalmente, em dois tipos de combustíveis: o bioetanol e o biodiesel, que juntos representam mais de 90% do uso mundial de biocombustíveis. O bioetanol é um líquido destilado produzido por meio de processos fermentativos de açúcares presentes em plantas ou cereais, podendo ser utilizado em motores adaptados ou misturado à gasolina (DUFEY, 2006; LEITE; LEAL, 2007). Por sua vez, o biodiesel é um éster metílico ou etílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, caracterizado por possuir caráter similar à de combustíveis para motores a diesel (ENCARNAÇÃO, 2008; ITO et al., 2005).

Nas pesquisas para o desenvolvimento de um biocombustível capaz de concorrer com os derivados de compostos fósseis, o biodiesel ganhou destaque. De acordo com Huo e colaboradores (2008), o composto conquistou grande interesse devido a possibilidade de sua produção em larga escala baseada na utilização de biomassa renovável. Sua produção é realizada por reação química de transesterificação empregando-se como matéria-prima óleos vegetais ou gordura animal (MEKHILEFA; SIGAA; SAIDURB, 2011; SILVA; MACK; CONTEIRO, 2009; ZUNIGA et al.; 2014).

Diferentes vegetais podem e são empregados como fonte de óleo para a indústria do biodiesel, como a colza, soja, girassol, pinhão manso (*Jatropha curcas*), frutos de diferentes espécies de palmáceas, dentre outros. A escolha do vegetal mais propício para a melhor produção de biodiesel obedece a critérios específicos da região produtora, como disponibilidade de áreas para plantio e clima. Grande parte dos países europeus e Estados Unidos, por exemplo, utilizam colza e soja, países asiáticos os frutos de palmáceas e o pinhão manso e no Brasil preferencialmente a soja (ALMEIDA, 2011; MEKHILEFA; SIGAA; SAIDURB, 2011).

O mercado de combustíveis renováveis é cada vez mais competitivo, entretanto, é necessário mais que investimentos privados para o seu pleno desenvolvimento. É imprescindível a participação de políticas governamentais para, assim, o produto se consolidar e atrair investidores interessados em sua expansão. Além disso, pesquisas envolvendo o desenvolvimento de tecnologias renováveis e sua aplicação no setor de energia possui muitos benefícios a longo prazo. Entre eles podemos destacar a proteção econômica frente as inconstâncias do mercado dos combustíveis fósseis e, conseqüentemente, sua contribuição para a redução de preço e índice de utilização

desses compostos, que juntos contribuem com a maior parcela de produção de gases nocivos que acometem o meio ambiente (PNUMA, 2011).

As consequências da utilização de combustíveis fósseis não se restringem apenas ao ambiente natural, mas a mais de meio século é estudado e estruturado o conhecimento acerca da influência da poluição gerada da sua queima para a saúde humana, algumas vezes reflexo de seu próprio impacto ao meio natural (CHUANG et al., 2013; MUSTAFIC, et al. 2012). Atividades industriais e o aumento na frota de veículos, gerados pelo consequente aumento populacional, são os dois fatores mais influentes na qualidade do ar das grandes regiões urbanas (ATASH, 2007). Material particulado suspenso no ar devido a queima de combustíveis fósseis pode ser associada com risco de morbidade e mortalidade, provocando desde problemas respiratórios a cardiovasculares (MUSTAFIC, et al. 2012; SMITH; AXON; DARTON, 2013). Indivíduos altamente expostos a poluição de forma rotineira, como motoristas, possuem riscos à saúde maior que a população geral, indiretamente influenciadas ou atingidas em menor grau pela poluição (CHUANG et al., 2013). Bauer et al. (2010), por exemplo, conseguiram identificar uma correlação entre a exposição de indivíduos a longo prazo às partículas de poluição suspensas no ar (material particulado) e doenças cardiovasculares agudas, como a aterosclerose. Nesse aspecto, Shindell et al. (2011) ao avaliarem um panorama futuro, advertem que se faz necessário a aplicação de parâmetros que consigam basear padrões de emissão aceitáveis de gases poluentes, para assim, combater problemas ambientais e de saúde pública.

Kisin et al. (2011) ao analisarem o material particulado suspenso produzido por motores em minas subterrâneas, observaram que a combustão do biodiesel de óleo de soja puro (B100) ou em uma mistura de 50% com diesel (B50) liberam menores concentrações de carbono elementar e o material particulado suspenso produzido pela sua combustão possui menor massa quando comparada com a originada pelo diesel com baixo teor de enxofre (ULSD). Leme et al. (2011), após testes com células humanas de linhagem Jurkat e HepG2, inferiram que, quando comparado com o diesel íntegro (D100), o acréscimo de 5,0% de biodiesel na composição comercial do diesel (B5) não torna maior os efeitos citotóxicos do composto resultante. Portanto, benefícios práticos podem ser identificados na utilização do biodiesel como fonte energética em relação a seu equivalente derivado de recursos fósseis.

### **3.3 BIODIESEL NO BRASIL**

Historicamente, estudos brasileiros sobre a utilização de óleo vegetal ou animal como matéria prima para produção de compostos automotivos iniciou-se a partir de 1940 (POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007). Desde então, o país é evidenciado como um dos maiores produtores de biodiesel do mundo, principalmente em razão do investimento governamental em pesquisas relacionadas a produção e implantação mercadológica do produto final. Para essa articulação de pesquisa, produção e consumo do composto foi de grande importância a implantação do Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel (Probi biodiesel) em 2002 e em 2004 o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) e do Selo Combustível Social. O Probi biodiesel foi implantado com o objetivo de promover o desenvolvimento científico e tecnológico do composto no país, levando a construção de redes de pesquisas e conseqüentemente a valorização do mercado nacional do combustível renovável diminuindo as importações. O PNPB e o Selo Combustível Social contribuíram para o aumento da produção nacional objetivando o desenvolvimento regional de localidades produtoras e a geração de vagas de emprego e renda, beneficiando, assim, a agricultura familiar do país e os pequenos produtores (BERGMANN et al., 2013; GARCEZ; VIANNA, 2009; POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007).

Empenhado em incentivar a produção de biodiesel nacional, o governo federal brasileiro estabeleceu metas para um aumento progressivo da concentração do composto na mistura com o diesel segundo determinações da Medida Provisória nº 647, de 28 de maio de 2014, que aumentou a concentração de biodiesel na mistura de diesel comercializado ao consumidor final de 5% (B5) para 6% (B6) em julho de 2014 e consecutivamente 7% (B7) em novembro do mesmo ano (BRASIL, 2014). Entretanto, reflexos do investimento nacional na produção do biodiesel puderam ser percebidos antes mesmo da implementação da MP 647, o volume de biodiesel produzido em 2007 foi cerca 500 vezes maior que o produzido em 2005. Nesse cenário bastante promissor o estado de Goiás consolidou-se como um dos principais produtores e a região Centro-Oeste, a maior região produtora do país (BRASIL, 2013; BERGMANN et al., 2013).

Tendo em consideração o potencial benefício apresentado pelo incentivo à produção de biodiesel em direção a sustentabilidade ambiental, muitos critérios devem ser analisados pelo governo brasileiro. Castanheira et al. (2014), ao caracterizar a produção de biodiesel no Brasil, advertem que são necessárias políticas adequadas de

integração da produção de bioenergia com a indústria alimentícia e a utilização correta das áreas agricultáveis do país para, que assim, os benefícios ambientais e econômicos da atividade sejam realmente sentidos.

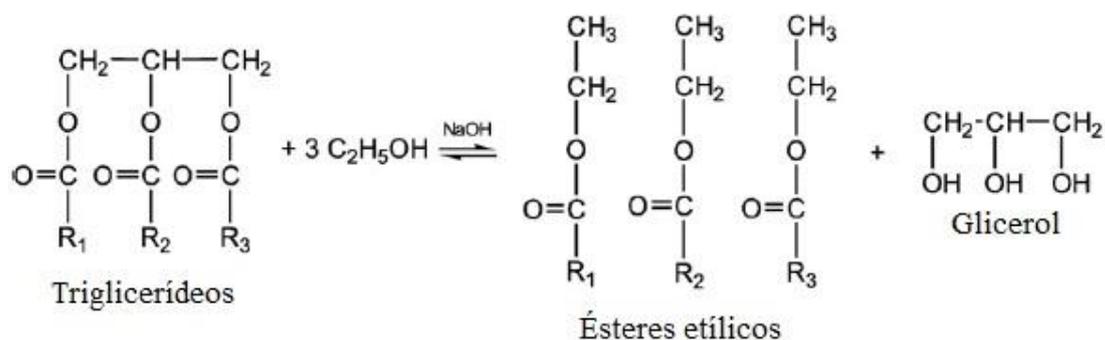
### **3.4 GERAÇÃO DE COPRODUTOS NA CADEIA PRODUTIVA DE BIODIESEL**

Uma das principais barreiras para a legitimação plena do biodiesel como combustível comercial é circunstanciada pelos seus custos de produção. Sendo assim, com a finalidade de transpor esse obstáculo e agregar valor ao produto final, diferentes autores defendem a exploração comercial ou biotecnológica dos coprodutos gerados ao longo do processo de produção do combustível renovável (ALMEIDA, 2011; ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012).

Substancialmente, três tipos principais de coprodutos são produzidos durante a fabricação do biodiesel, compreendendo as tortas, farelos e o glicerol. As tortas e farelos, gerados pela prensagem das oleaginosas para extração de óleo, são empregadas na produção de ração animal ou na fabricação de fertilizantes. Por último, gerado a partir da reação de transesterificação da matéria prima, o glicerol bruto é o coproduto obtido de forma mais representativa, compreendendo em média 10% do volume total da cadeia produtiva do biodiesel (ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012; ALMEIDA, 2011; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

Nos processos de transesterificação, comumente utilizados para geração de biodiesel a partir de óleo vegetal, ocorre uma reação entre o óleo e álcoois (metanol ou etanol) com o emprego de um catalisador (KOH ou NaOH) para a produção de ésteres metílicos ou etílicos (HUO et al. 2008; ZUNIGA et al., 2014). Durante a reação verifica-se a troca do grupo acilo (R-CO-) presente nos ácidos graxos que compõe o óleo para o álcool, gerando como produtos ésteres de ácidos graxos e glicerol (ANG; TAN; LEE, 2014) (Figura 3.1).

O glicerol apresenta ampla utilização em setores industriais como na produção de fármacos, alimentos, cosméticos, resinas alquídicas e outros. É um composto orgânico tri-álcool, constituído por apenas três carbonos e de consistências viscosa, incolor, higroscópico e solúvel em água. É denominado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) de 1,2,3-propanotriol e, comercialmente, quando purificado, é nomeado glicerina (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011; RIVALDI et al. 2008).



**Figura 3.1** Transesterificação de triglicerídeos com etanol, utilizando NaOH como catalisador para produzir ésteres etílicos (biodiesel) e glicerol. Fonte: Silva, Mack e Contreiro (2009)

Como resultado da alta produção do biodiesel há um consequente aumento na geração de glicerol, portanto, o preço de mercado do coproduto sofreu muitas quedas devido sua produção acima da capacidade de consumo. Em decorrência desse fato, a purificação do glicerol bruto tornou-se onerosa, não compensando o valor de venda, principalmente para pequenos e médios produtores de biodiesel (ALMEIDA, 2011; ALBARELLI; SANTOS; HOLANDA, 2011; POTT; HOWE; DENNIS, 2014).

Apesar da ampla aplicação da glicerina em setores industriais, a quantidade necessária para abastecimento do mercado consumidor é pequena quando comparada com a alta produção. Como elucidação, a produção de biodiesel brasileira apenas no ano de 2012, de acordo com o anuário estatístico da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), foi de 2,7 milhões de m<sup>3</sup>, sendo a região Centro-Oeste responsável por 42,8% deste total, e a produção de glicerol equivalente a 274,7 mil m<sup>3</sup> (BRASIL, 2013).

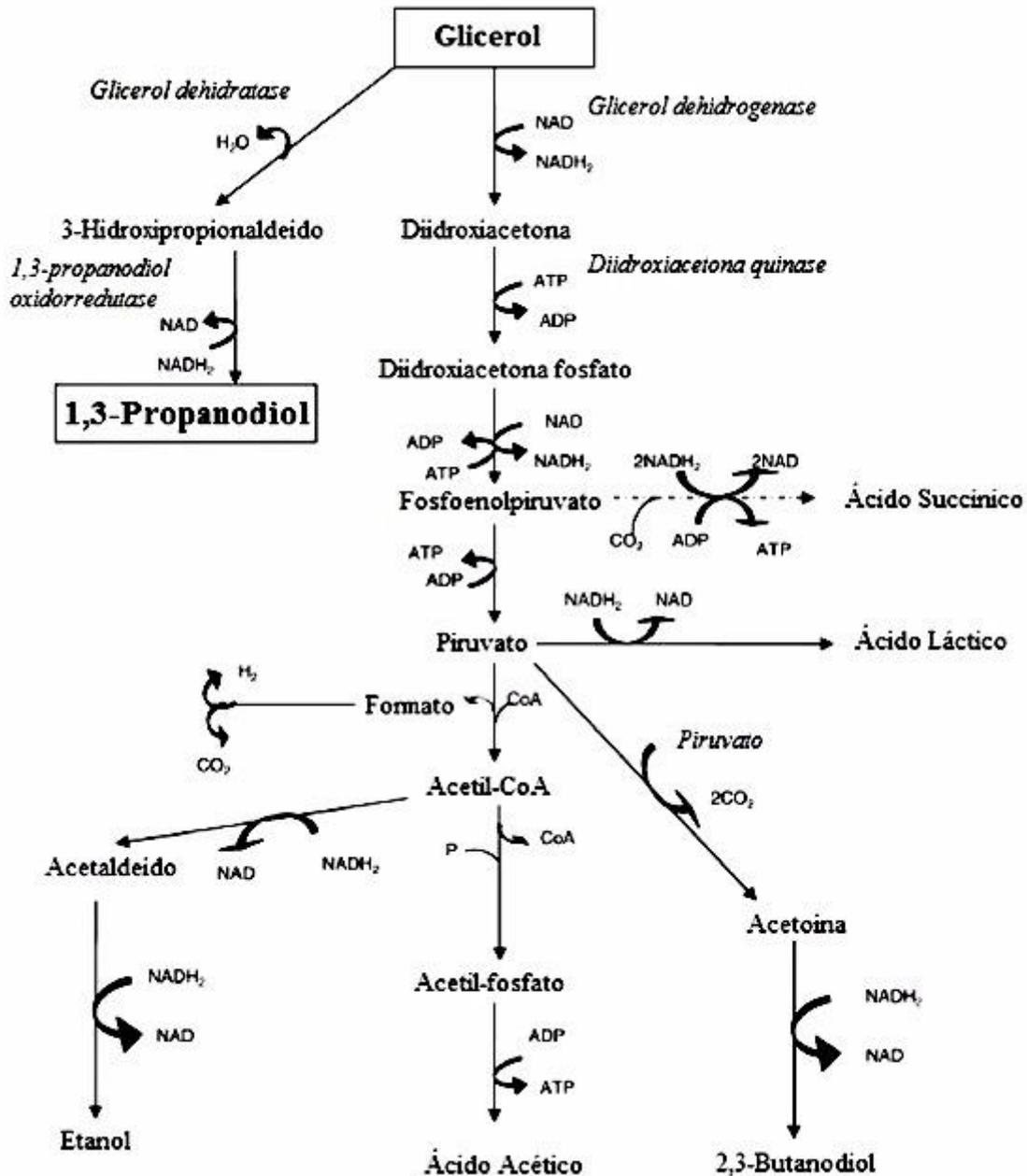
O glicerol possui em sua constituição bruta variados contaminantes, podendo totalizar 20% de seu volume integral, como álcool, sais, ésteres, óleo residual, entre outros (ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012; BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011). Contaminantes que diminuem o preço do produto, encarecem sua purificação à glicerina e em decorrência de sua relevância, aumentam o potencial contaminante do composto. Araújo, Gomes e Tavares (2011), em um estudo que avaliou a ecotoxicidade do glicerol bruto em ambientes aquáticos, chegaram à conclusão que a manipulação, descarte ou transporte inadequado do produto pode produzir sérios impactos a biota local. Portanto, deve ser considerado de grande preocupação a forma como é realizada a disposição final do glicerol bruto, quando o mesmo é lidado como resíduo e não coproduto, uma

vez que possui características que podem agredir nocivamente o ambiente (LEONETI; ARAGÃO-LEONETI; OLIVEIRA, 2012).

### **3.5 BIOPROSPECÇÃO COMO FERRAMENTA DE APROVEITAMENTO DO GLICEROL**

A crescente produção do biodiesel é seguida pela, também, crescente produção de glicerol bruto, portanto, os estoques do coproduto excedem sua capacidade de consumo num mercado específico, seja bruto ou purificado. Em vista disso, diferentes pesquisadores apoiam a iniciativa de investimento em identificação e aperfeiçoamento de micro-organismos que utilizam o glicerol como fonte de carbono, permitindo, dessa forma, o desenvolvimento de novas tecnologias em processos fermentativos, promovendo a produção de produtos necessários ao setor industrial com a vantagem de minimizar ou eliminar completamente a produção de intermediários tóxicos ou poluidores (ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; ZENG; SABRA, 2011).

O termo bioprospecção refere-se ao processo de localizar e identificar na biodiversidade de uma localidade, organismos ou constituintes biológicos (genes, proteínas, intermediários metabólicos, entre outros) que possuam potencial econômico (SACCARO JUNIOR, 2013). Particularmente, pesquisas relacionadas a bioprospecção de bactérias que utilizam o glicerol como fonte de carbono, destaca-se a capacidade de alguns grupos microbianos utilizar diferentes rotas metabólicas (Figura 3.2) na bioconversão em produtos comerciais como 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA), 1,3-propanodiol (1,3-PD), 2,3 butanodiol (2,3-BD), dihidroxiacetona, bioetanol, ácido láctico, ácido cítrico e ácido succínico (ALMEIDA, 2011; METSOVITI et al., 2012).



**Figura 3.2.** Metabolismo do glicerol por *Klebsiella pneumoniae*, gerando produtos de interesse industrial. Adaptado de Saxena, Anand, Saran e Isar (2009)

A assimilação de glicerol por micro-organismos é realizada por processos distintos de redução ou oxidação (ZHU; LAWMAN; CAMERON, 2002). Na realização da via metabólica oxidativa, a enzima *glicerol desidrogenase* catalisa a reação de conversão do glicerol em diidroxiacetona, produto que sofre fosforilação pela *diidroxiacetona quinase* e, assim, formar diidroxiacetona fosfato, composto utilizado na via glicolítica ou mediado para produção de outros produtos (SILVA; MACK; CONTEIRO, 2009). A metabolização redutora do glicerol se dá pela enzima *glicerol*

*dehidratase* que o converte em 3-hidroxiopropanaldeído por um processo de desidratação da molécula, produto reduzido pela *1,3-propanaldeído oxidoredutase* em 1,3-propanodiol (SAXENA et al., 2009).

O 3-HPA e o 1,3-PD são utilizados na conservação de alimentos e na formação de polímeros para produção de plásticos com propriedades especiais, como poliéteres e poliuretanos, o 1,3-PD também pode ser utilizado como lubrificante do tipo poliglicol e solvente (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; ZENG; SABRA, 2011). O 2,3-BD é um líquido incolor, inodoro, com alto ponto de ebulição (180- 184°C), baixo ponto de fusão (-60°C) e alta octanagem (27,198 kJ.g<sup>-1</sup>), valor este próximo ao do etanol (29,1 kJ.g<sup>-1</sup>) e maior que o do metanol (22,1 kJ.g<sup>-1</sup>). Possui diversas aplicações, como na fabricação de tintas de impressão, perfumes, explosivos, plastificantes, alimentos e produtos farmacêuticos, aplicações que aumentam o interesse e demanda na sua produção (AFSCHAR, 1993; CELINSKA; GRAJEK, 2009; FLICKINGER, 1980; JI et al., 2009; SYU, 2001; YU; SADDLER, 1983).

Diferentes micro-organismos são aptos a crescer de forma anaeróbia utilizando o glicerol como única fonte de carbono, tal como *Lactobacillus brevis*, *L. buchnerii*, *L. reuteri*, *Bacillus welchii*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Rhodopseudomonas palustres*, *Enterobacter agglomerans* (LEJA, et al. 2014; METSOVITI et al., 2012; MYSZKA et al., 2012; POTT; HOWE; DENNIS, 2014; SAXENA; ANAND; SARAN; ISAR, 2009; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). As bactérias pertencentes ao gênero *Klebsiella* são as mais descritas para este fim (ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012). Estudos sobre a produção de 2,3-butanodiol utilizando *Klebsiella* sp. datam de 1906, portanto, este gênero tem sido apontado como promissor na fermentação do glicerol e, assim, produzir compostos químicos utilizados na indústria ou possíveis compostos combustíveis (SYU, 2001). Entretanto, perante as diferentes condições de produção dos compostos de bioconversão do glicerol e das especificidades intrínsecas dos micro-organismos empregados no processo, há na literatura diferentes faixas de rendimento e produção de compostos alvos (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1.** Produção de 2,3-BD e 1,3-PD por diferentes cepas bacterianas a partir da metabolização do glicerol.

Produto	Organismo/Cepa	Modo de Fermentação	Disponibilidade de Oxigênio	Rendimento	Concentração do Produto (g.L <sup>-1</sup> )	Referências
2,3-butanodiol	<i>Klebsiella</i> sp. Ana-WS5	Batelada	Aeróbio	0,44 mol.mol <sup>-1</sup>	30,14	Yen, Li, Chang, (2014)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> SU6	Batelada	Micro-aeróbio	0,05 mol.mol <sup>-1</sup>	9,54	Sattayasamitsathit, Prasertsan, Methacanon (2011)
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B10-127	Batelada alimentada	Aeróbio	0,42 g.g <sup>-1</sup>	83,3	Yang et al. (2013)
	<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Batelada	Micro-aeróbio	0,33 g.g <sup>-1</sup>	9,54	Shen et al. (2012)
	<i>Klebsiella oxytoca</i> M5al	Batelada alimentada	Micro-aeróbio	0,12 mol.mol <sup>-1</sup>	2,35	Zhang et al. (2011)
	<i>Clostridium freundii</i> FMCC-207	Batelada	Anaeróbia	0,24 g.g <sup>-1</sup>	4,3	Metsoviti et al. (2012)
1,3-propanodiol	<i>Klebsiella oxytoca</i> NRRL-B199	Batelada	Anaeróbia	0,34 g.g <sup>-1</sup>	13,51	Wojtusik et al. (2015)
	<i>Shimwellia blattae</i> ATCC 33430	Batelada	Anaeróbia	0,45 g.g <sup>-1</sup>	13,84	Rodriguez et al. (2016)
	<i>Clostridium butyricum</i> F2b	Batelada	Anaeróbia	0,49 g.g <sup>-1</sup>	43,5	Papanikolaou et al. (2008)
	<i>Clostridium butyricum</i> NRRL B-23495	Batelada	Anaeróbia	0,54 g.g <sup>-1</sup>	9,1	Metsoviti et al. (2012)

Apesar da identificação de vários grupos microbianos capazes de metabolizar glicerol, a bioprospecção se depara com algumas dificuldades, como a produção insatisfatória de compostos de interesse por cepas naturais ou produção em quantidade satisfatória por gêneros microbianos notadamente patogênicos. Essas problemáticas são enfrentadas por meio da bioprospecção de novas espécies de bactérias capazes de produzir compostos de interesse ou por meio de ferramentas moleculares. Nesta última, grupos gênicos produtores das enzimas necessárias para o processo bioquímico de metabolização do glicerol são identificados em micro-organismos nativos e transferidos para um outro, menos patogênico e mais ambientado as condições de produção industrial (RIVALDI et al., 2008). Jung e colaboradores (2014), por exemplo, por meio de engenharia genética, conseguiram produzir uma cepa de *Escherichia coli* mutada capaz de direcionar o metabolismo de glicerol para a produção de 3-HPA, conseguindo, assim, maiores concentrações do composto no processo de fermentação. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Pajuelo et al. (2005) também desenvolveram uma cepa recombinante de *Clostridium acetobutylicum* melhor produtora de 1,3-PD a partir de informações genéticas de uma linhagem natural de *Clostridium butylicum*.

Utilizar-se do coproduto da fabricação do biodiesel (glicerol) aumenta as possibilidades de, a longo prazo, permitir o alcance do equilíbrio entre desenvolvimento e meio ambiente. A bioconversão do biodiesel favorece o meio ambiente por meio da obtenção de diversos compostos, além de agregar mais valor à fabricação do combustível, diminuindo a dependência de combustíveis fósseis. Dentre essa nova dimensão de desenvolvimento biotecnológico, o Brasil se destaca como um país de grande diversidade biológica pouco conhecida, conseqüentemente, constitui-se uma oportunidade de avaliação e seleção de novas linhagens de micro-organismos naturais melhor fermentadores do glicerol refinado ou bruto.

### **3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Inconvenientes acarretados pela utilização de combustíveis fósseis promoveu o empenho mundial em mudar a matriz energética para uma base renovável e menos poluente, processo este que concedeu notória relevância ao biodiesel. O volume de biodiesel produzido pelas biorefinarias brasileiras é crescente e o país se destaca no cenário internacional por viabilizar e investir em programas de pesquisa e produção de biodiesel e outros biocombustíveis. Entretanto, além de políticas capazes de alicerçar

esse crescimento de forma efetiva e não prejudicial ao meio ambiente, é necessário potencializar a utilização dos coprodutos gerados no processo de fabricação do biodiesel como ferramenta para minimizar desperdícios e aumentar a lucratividade do biocombustível, tornando-o atrativo. Portanto, a bioprospecção de micro-organismos pode ser uma vertente de pesquisa para o aproveitamento do excedente de glicerol, proveniente da cadeia produtiva do biodiesel. Devido sua heterogeneidade e seu caráter naturalmente dinâmico, os ambientes naturais abrigam uma biodiversidade altamente diversa e única, contudo compreende-se ainda de forma muito escassa suas potencialidades biotecnológicas. A produção de compostos de valor agregado, a partir da bioconversão do glicerol, pode ter impacto positivo na valorização da produção do biocombustível e conseqüentemente no meio ambiente.

## **REFERÊNCIAS**

AFSCHAR, A. S. et al. Microbial production and downstream processing of 2,3-butanediol. **Journal of Biotechnology**, v. 27, p.317-329, 1993.

ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; HOLANDA, M. R. Energetic and economic evaluation of waste glycerol cogeneration in Brazil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 4, p. 691-698, 2011.

ALMAGHRABI, O. A.; MASSOUD, S. I.; ABDELMONEIM, T. S. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 1, p. 57-61, 2013.

ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 48, p. 1-16, 2012.

ALMEIDA, J. R. M. **Microrganismos para produção de químicos a partir da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. 6 p.

AMBROSINI, A. et al. Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 245-264, 2012.

ANUAR, M. R.; ABDULLAH, A. Z. Challenges in biodiesel industry with regards to feedstock, environmental, social and sustainability issues: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 208-223, 2016.

ARAÚJO, P. H. A.; GOMES, L. O.; TAVARES, M. G. O. Análise ecotoxicológica do glicerol bruto, derivado de biocombustível e etanol combustível. In: 63<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC, 2011, Goiânia. **Anais Eletrônicos...** Goiânia: SBPC, 2011. Disponível em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/7699.htm>>. Acesso em: 26 nov. 2014.

ARNOLD, M. Fostering sustainability by linking co-creation and relationship management concepts. **Journal of Cleaner Production**, p. 1-10, 2015.

ATASH, F. The deterioration of urban environments in developing countries: Mitigating the air pollution crisis in Tehran, Iran. **Cities**, v. 24, n. 06, p. 399-409, 2007.

BAL, H. B. et al. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. **Plant and Soil**, v. 366, n. 1-2, p. 93-105, 2013.

BAUER, M. et al. Urban particulate matter air pollution is associated with subclinical atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, n. 22, p. 1803-1808, 2010.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: Um breve histórico de aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 02, p. 306-319, 2011.

BERGMANN, J. C. et al. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411-420, 2013.

BHUIYA, M. M. K. et al. Prospects of 2<sup>nd</sup> generation biodiesel as a sustainable fuel - Part: 1 selection of feedstocks, oil extraction techniques and conversion technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 1109-1128, 2016.

BISWAS, R. et al. Enhanced production of 2,3-butanediol by engineered *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 651-658, 2012.

BORRISS, R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. In: MAHESHWARI, D. K. (Org.). **Bacteria in agrobiology: plant growth responses**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 41-76.

BRASIL. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2013**. Rio de Janeiro: ANP, 2013.

BRASIL. Medida Provisória nº 647, de 28 de maio de 2014, 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 maio 2014. Seção 1, p. 1.

BRESSON, J. et al. The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 200, n. 2, p. 558-569, 2013.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, n. 1-2, p. 3-41, 2014.

CASTANHEIRA, E. G. et al. Environmental sustainability of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 65, p. 680-69, 2014.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p.

CELINSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 715-725, 2009.

CHUANG, H. et al. In-car particles and cardiovascular health: An air conditioning-based intervention study. **Science of the Total Environment**, v. 452-453, p. 309-313, 2013.

COELHO, L. F. et al. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 6, p. 1413-1420, 2007.

DARDANELLI, M. S. et al. Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. **Plant and Soil**, v. 328, n. 1-2, p. 483-493, 2010.

D'AVIGNON, A.; CARUSO, L. A. C. O caráter necessariamente sistêmico da transição rumo à economia verde. **Política Ambiental**, n. 8, p. 24-35, 2011.

DUFÉY, A. **Biofuels production, trade and sustainable development: Emerging issues**. London: International Institute for Environment and Development, 2006. 57p.

ENCARNAÇÃO, A. P. G. **Geração de biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação: Uma avaliação econômica**. 2008. 164f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química, Rio de Janeiro, 2008.

FARAG, M. A. et al. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. **Phytochemistry**, v. 67, n. 20, p. 2262-2268, 2006.

FASCIGLIONE, G. et al. *Azospirillum* improves lettuce growth and transplant under saline conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 12, p. 2518-2523, 2012.

FERREIRA, J. T. P. et al. Isolation and selection of growth-promoting bacteria of the genus *Bacillus* and its effect on two varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **International Research Journal of Microbiology**, v. 02, n. 02, p. 70-78, 2011.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: MAHESHWARI, D. K. **Plant growth and health promoting bacteria**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 21-43.

FLICKINGER, M. C. Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: How far have we come? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22 (suppl.), p. 27-48, 1980.

GARCEZ, C. A. G.; VIANNA, J. N. S. Brazilian biodiesel policy: Social and environmental considerations of sustainability. **Energy**, v. 34, p. 645-654, 2009.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, L. et al. Isolation and selection of plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic resistance in melon. **Plant and Soil**, v. 358, n. 1-2, p. 201-212, 2012.

GARDNER, T; ACOSTA-MARTINEZ, V.; SENWO Z; DOWD, S. E. Soil rhizosphere microbial communities and enzyme activities under organic farming in Alabama. **Diversity**, v. 3, p. 308-328, 2011.

GOSWAMI, D. et al. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 66-75, 2014.

GROBELAK, A.; NAPORA, A.; KACPRZAK, M. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. **Ecological Engineering**, v. 84, p. 22-28, 2015.

HABIBI, S. et al. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. **Plant and Soil**, v. 379, n. 1-2, p. 51-66, 2014.

HAMPP, R.; HARTMANN, A.; NEHLS, U. The rhizosphere: molecular interactions between microorganisms and roots. **Ecological Studies**, v. 220, p. 111-139, 2012.

HUO, H. et al. Life-cycle assessment of energy use and greenhouse gas emissions of soybean-derived biodiesel and renewable fuels. **Environmental Science and Technology**, v. 43, p.750-756, 2008.

ITO, T. et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260-265, 2005.

JHA, C. K. et al. *Enterobacter*: role in plant growth promotion. In: MAHESHWARI, D. K. (Org.) **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 159-182.

Jl, XIAO-J. et al. Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5214-5218, 2009.

JUNG, W. S. et al. Elevated production of 3-hydroxypropionic acid by metabolic engineering of the glycerol metabolism in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 23, p. 116-122, 2014.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 1-13, 2010.

KING, A. W. Global Warming and Biodiversity. **Ecology**, v. 74, n. 5, p. 1610-1611, 1993.

KISIN, E. R. et al. Mutagenicity of biodiesel or diesel exhaust particles and the effect of engine operating conditions. **Journal of Environmental Engineering & Ecological**

**Science**, v. 2, n. 03. Disponível em <<http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2050-1323-2-3.pdf>>. Acesso em 30 maio 2011.

KOHLER, J. et al. Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregate stabilization and promotion of biological fertility in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. **Soil Use and Management**, v. 22, p. 298-304, 2006.

KUMAR, P. et al. Dark fermentative bioconversion of glycerol to hydrogen by *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 383-391, 2015.

LASLO, E. et al. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. **Crop Protection**, v. 40, p. 43-48, 2012.

LAU, L. C.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Global warming mitigation and renewable energy policy development from the Kyoto Protocol to the Copenhagen Accord — A comment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 5280-5284, 2012.

LEE, B. et al. Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos CEBRAP**, v. 78, p. 15-21, 2007.

LEJA, K. et al. Selection and characterization of *Clostridium bifermentans* strains from natural environment capable of producing 1,3-propanediol under microaerophilic conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 08, n. 11, p. 1187-1197, 2014.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138-145, 2012.

LEME, D. M. et al. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199-200, p. 343–349, 2011.

LEVEAU, J. H. J. The lettuce-associated microbiota. In: Subbarao, K. V. et al (Org.). **Compendium of lettuce diseases and pests**. 2. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2014. p. 1-11.

LIU, X.; ZHANG, H. The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 774, p. 1-6, 2015.

LOPEZ, J. A. S. et al. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, v.100, p. 5609-5615, 2009.

LUGTENBERG, B. **Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture**. Suíça: Springer, 2015. 448p.

MANABE, S; WETHERALD, R. T. Thermal equilibrium of the atmosphere with a given distribution of relative humidity. **Journal of the Atmospheric**, v. 24, n. 3, p. 241-259, 1967.

MARELLI, L. et al. **The impact of biofuels on transport and the environment, and their connection with agricultural development in Europe**. European Parliament's Committee on Transport and Tourism. 2015. 304p.

MAHESHWARI, B. K. et al. **Bacteria in agrobiolology: stress management**. Alemanha: Springer, 2012, 333p.

MARELLI, L. et al. **The impact of biofuels on transport and the environment, and their connection with agricultural development in Europe**. European Union, 2015. 306p.

MASCARENHAS, L. M. A. **Interdisciplinaridade, instrumentos legais de proteção ao meio ambiente e perícia ambiental**. 2009. 219f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Goiás. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Programa de Doutorado em Ciências Ambientais, Goiás, 2009.

MATIAS, S. S. et al. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 259-266, 2009.

MEKHILEFA, S.; SIGAA, S.; SAIDURB, R. A review on palm oil biodiesel as a source of renewable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15. p. 1937–1949, 2011.

METSOVITI, M. et al. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1872–1882, 2012.

MITCHELL, A.; PILPE, Y. A mathematical model for adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. **PNAS**, v. 108, n. 17, p. 7271-7276, 2011.

MUSTAFIC, H. et al. Main air pollutants and myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 307, n. 07, p. 713-721, 2012.

MYSZKA, K. et al. Isolation process of industrially useful *Clostridium bifermentans* from natural samples. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 05, p. 631-633, 2012.

NAKAJIMA, E. et al. Isolation and identification of a plant growth promotive substance from mixture of essential plant oils. **Plant Growth Regulation**, v. 45, p. 47–51, 2005.

NKONYA, E.; ANDERSON, W. Exploiting provisions of land economic productivity without degrading its natural capital. **Journal of Arid Environments**, v. 112, p. 33-43, 2015.

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7-9, 1996.

OLIVEIRA, C. A. et al. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1782–1787, 2009.

OLIVEIRA, N. C. et al. Endophytic bacteria with potential for bioremediation of petroleum hydrocarbons and derivatives. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n.12, p. 2977-2984, 2012.

PAJUELO, M. G. et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Metabolic Engineering**, v.7, p. 329-336, 2005.

PALMA, C. M.; PALMA, M. S. Bioprospecção no Brasil: análise crítica de alguns conceitos. **Ciência e Cultura**, v.64, n.3, p. 22-26, 2012.

PAPANIKOLAOU, S. et al. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 1, p. 60-71, 2008.

PARK, H. et al. One shot-two pathogens blocked: exposure of *Arabidopsis* to hexadecane, a long chain volatile organic compound, confers induced resistance against both *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 7, p. e24619, 2013.

PARMESAN, C. Climate and species' range. **Nature**, v. 382, n. 6594, p. 765-766, 1996.

PAVESE, H. B. Delineamentos de uma economia verde. **Política Ambiental**, n. 8, p. 15-23, 2011.

PIROMYOU, P. et al. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 1, p. 44-54, 2011.

PNUMA, 2011, **Caminhos para o desenvolvimento sustentável e a erradicação da pobreza** – Síntese para tomadores de decisão. Disponível em <[http://www.unep.org/greeneconomy/Portals/88/documents/ger/Green\\_Economy\\_Full\\_report\\_pt.pdf](http://www.unep.org/greeneconomy/Portals/88/documents/ger/Green_Economy_Full_report_pt.pdf)> Acesso em 30 maio 2015.

PORCEL, R. et al. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 36, 2014.

POTT, R. W. M.; HOWE, C. J.; DENNIS, J. S. The purification of crude glycerol derived from biodiesel manufacture and its use as a substrate by *Rhodopseudomonas palustris* to produce hydrogen. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 464-470, 2014.

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

RAMANATHAN, V. The greenhouse theory of climate change: a test by an inadvertent global experiment. **Science**, v. 240, n. 4850, p. 293-299, 1988.

RANA, A. et al. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 4, p. 893-900, 2011.

RIVALDI, J. D. et al. Biodiesel de Glicerol: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 37, p. 44-51, 2008.

RODRIGUEZ, A. et al. 1,3-Propanediol production from glycerol with a novel biocatalyst *Shimwellia blattae* ATCC 33430: Operational conditions and kinetics in batch cultivations. **Bioresource technology**, v. 200, p. 830-837, 2016.

RYU, C. Bacterial Volatiles as Airborne Signals for Plants and Bacteria. In: LUGTENBERG, B. (Org.). **Principles of Plant-Microbe Interactions**. Springer International Publishing, 2015. p. 53-61.

RYU, C. et al. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 8, p. 4927-4932, 2003.

SABIR, A. et al. Growth and mineral acquisition response of grapevine rootstocks (*Vitis* spp.) to inoculation with different strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 10, p. 2148-2153, 2012.

SACCARO JUNIOR, N. L. A regulação do acesso a recursos genéticos no Brasil: sugestões para um novo cenário. **Sustentabilidade em Debate**, v. 4, n. 2, p. 194-214, 2013.

SATHIANACHIYAR, S.; DEVARAJ, A. Biopolymer production by bacterial species using glycerol, a byproduct of biodiesel. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 3, n. 8, p. 1-5, 2013.

SATTAYASAMITSATHIT, S.; PRASERTSAN, P.; METHACANON, P.. Statistical optimization for simultaneous production of 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol using crude glycerol by newly bacterial isolate. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 608-614, 2011.

SAXENA, R. K.; ANAND, P.; SARAN, S.; ISAR, J. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 895-913, 2009.

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

SHEN, X. et al. Inhibition of acetate accumulation leads to enhanced production of (R, R)-2,3-butanediol from glycerol in *Escherichia coli*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 11, p. 1725-1729, 2012.

SHINDELL, D. et al. Climate, health, agricultural and economic impacts of tighter vehicle-emission standards. **Nature Climate Change**, v. 1, p. 59-66, 2011.

SMITH, T. W.; AXON, C. J., DARTON, R. C. The impact on human health of car-related air pollution in the UK, 1995-2005. **Atmospheric Environment**, v. 77, p. 260-266, 2013.

SONG, J. et al. Evaluation of potential fossil fuel conservation by the renewable heat obligation in Korea. **Renewable Energy**, v. 79, p. 140-149, 2015.

SYU, M. J. Biological production of 2,3-butanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 10-18, 2001.

TAVARES, M. G. O. **Análise físico-química e ecotoxicológica de combustíveis obtidos a partir do craqueamento termo-catalítico de polímeros**. 2008. 81f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Goiás. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Programa de Doutorado em Ciências Ambientais, Goiás, 2008.

VEGA-LIZAMA, T. et al. Thermogravimetric analysis as a rapid and simple method to determine the degradation degree of soy biodiesel. **Fuel**, v. 156, p. 158–162, 2015.

VEIGA, J. E. O âmago da sustentabilidade. **Estudos Avançados**, v. 28, n. 82, p. 7-23, 2014.

WANG, W. C. et al. Greenhouse effect due to man-made perturbations of trace Gases. **Science**, v. 194, n. 4266, p. 685-690, 1976.

WILLKE, T.; VORLOP, K. Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 831–840, 2008.

WOJTUSIK, M. et al. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 100–107, 2015.

WU, F. et al. Effects of earthworms and plant growth–promoting rhizobacteria (PGPR) on availability of nitrogen, phosphorus, and potassium in soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 175, n. 3, p. 423-433, 2012.

YANG, T. et al. Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p.1-11, 2015.

YANG, T. et al. Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of co-substrates on 2,3-butanediol production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 7651-7658, 2013.

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

YEN, H.; LI, F.; CHANG, J. The effects of dissolved oxygen level on the distribution of 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol produced from glycerol by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. **Bioresource technology**, v. 153, p. 374-378, 2014.

YU, E. K. C.; SADDLER, J. N. Fed-batch approach to production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate concentration. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 46, p. 630-635, 1983.

ZAIDI, A. et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 231–239, 2015.

ZENG, AN-P.; SABRA, W. Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 749-757, 2011.

ZHANG, Gang et al. Influence of blocking of 2,3-butanediol pathway on glycerol metabolism for 1,3-propanediol production by *Klebsiella oxytoca*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 1, p. 116-128, 2012.

ZHU, M. M.; LAWMAN, P. D.; CAMERON, D. C. Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate. **Biotechnol Prog**, v. 18, p. 694-9, 2002.

ZOLLER, H. F.; CLARK, W. M. The production of volatile fatty acids by bacteria of the dysentery group. **The Journal of General Physiology**, v. 3, n. 3, p. 325, 1921.

ZUNIGA, A. D. G. et al. Situação atual e perspectivas do biodiesel no estado do Tocantins. **DESAFIOS: Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 1, n. 1, p. 263-278, 2014.

#### 4 BIOCONVERSÃO DE GLICEROL EM 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL POR RIZOBACTÉRIAS DE *Lactuca sativa*

Soares, R. S.<sup>1</sup>, Vieira, J.D.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMAB), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Campus I, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, 74605-050

##### Resumo

A bioprospecção de novos micro-organismos em ambientes naturais capazes de fermentar glicerol, coproduto do biodiesel, é importante para o incentivo à produção do biocombustível e produção de compostos de valor agregado a partir de uma fonte de carbono de baixo custo. O presente trabalho teve o objetivo de isolar e avaliar rizobactérias de *Lactuca sativa* capazes de produzir os compostos de valor agregado 2,3-propanodiol (2,3-BD) e 1,3-propanodiol (1,3-PD) utilizando glicerol como fonte única de carbono. Os micro-organismos foram isolados de solo rizosféricos de *Lactuca sativa* em meio de cultivo seletivo em anaerobiose e identificados por sequenciamento da região 16S rDNA. Foram testados seu perfil de crescimento microbiano (OD<sub>600nm</sub>) em diferentes concentrações do coproduto do biodiesel e quantificado por HPLC a produção simultânea dos compostos de interesse. Por meio da identificação molecular, das seis morfoespécies de rizobactérias, observou-se o predomínio de espécies da família *Enterobacteriaceae*, principalmente do gênero *Enterobacter*. O teste para diferentes concentrações de glicerol no meio de cultivo sugere que a concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> é a ideal para promover o processo fermentativo e o crescimento das rizobactérias isoladas. Dentre as amostras a AG7 obteve melhor perfil de crescimento microbiano. Três amostras foram identificadas como produtoras simultâneas dos compostos de interesse, AG3 foi o melhor produtor simultâneo de 2,3-BD e 1,3-PD, 0.522 g.L<sup>-1</sup> e 0.735 g.L<sup>-1</sup> respectivamente. AG6 destacou-se na produção de 1,3-PD, 0.842 g.L<sup>-1</sup>. Podemos concluir que rizobactérias possuem a capacidade de produzir compostos de valor agregado, 2,3-BD e 1,3-PD, a partir da fermentação do glicerol como fonte única de carbono, composto barato e abundante.

**Palavras-chave:** Biodiesel. Fermentação. Coproduto. *Enterobacteriaceae*.

#### BIOCONVERSION OF GLYCEROL TO 1,3-PROPANEDIOL AND 2,3-BUTANEDIOL BY *Lactuca sativa*'s RIZOBACTERIA

##### ABSTRACT

The bioprospection of new environmental microorganisms capable of fermenting glycerol, biodiesel co-product, it is important to encourage the production of biofuels and to the production of value-added compounds from a source of low cost carbon. This study aimed to isolate and evaluate *Lactuca sativa*'s rizobacteria able to produce 2,3-propanediol (2,3-BD) and 1,3-propanediol (1,3-PD) using glycerol as unique carbon source. The microorganisms were isolated from *Lactuca sativa*'s rhizospheric soil through selective breeding in anaerobic condition and identified by sequencing of the

16S rDNA. Their growth profile was tested (OD<sub>600nm</sub>) in different concentrations of glycerol and the products of fermentation were quantified using HPLC. Six morphospecies were isolated through the screening process. The molecular identification showed the predominance of *Enterobacteriaceae* species, mainly *Enterobacter*. The optimal glycerol concentration was 20 g.L<sup>-1</sup>. Among the samples obtained AG7 had the best microbial growth profile. Three isolated were capable of product the compounds of interest simultaneously. AG3 was the best producer of 2,3-BD and 1,3-PD, 0522 g.L<sup>-1</sup> and 735 g.L<sup>-1</sup>, respectively. AG6 stands out as a good producer of 1,3-PD, 0842 g.L<sup>-1</sup>. Therewith, it is concluded that rhizobacteria have the ability to produce high value compounds from the fermentation of glycerol as the sole carbon source, inexpensive and abundant compound.

**Key words:** Biodiesel. Fermentation. Coproduct. *Enterobacteriaceae*.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Com o propósito de sustentar o crescente aumento dos meios de produção e diminuir o impacto dos combustíveis fósseis ao meio ambiente a produção de biodiesel ganhou destaque nos últimos anos (VERDUGO et al., 2010). O Brasil, grande produtor mundial, produziu 2.7 milhões de m<sup>3</sup> de biodiesel no ano de 2012, um aumento de cerca de 570% do contingente produzido em 2007 (ANP, 2013). Sua produção é essencialmente realizada por meio de transesterificação etanólica ou metanólica de óleos vegetais ou gorduras animais, com uma coprodução substancial de glicerol. O glicerol é um composto orgânico de três carbonos e quando na sua forma bruta possui contaminantes como metanol, ácidos graxos e ésteres metílicos originários do processo (ROSSI et al., 2012; VALERIO et al., 2015). Em virtude do aumento de investimentos na cadeia produtiva de biodiesel o glicerol sofreu quedas sucessivas no seu preço de mercado, assim, sua utilização biotecnológica em processos fermentativos para produção de compostos de maior valor agregado tem chamado a atenção (JUNG et al., 2014).

A natureza reduzida da molécula de glicerol favorece sua metabolização por micro-organismos fermentadores, sendo esta estudada com a finalidade de bioconverter o composto em matérias-primas de interesse industrial como 1,3-propanodiol (1,3-PD), 2,3-butanodiol (2,3-BD), etanol, butanol, além de compostos cetônicos, ácidos orgânicos, hidrogênio entre outros (ALMEIDA et al., 2012; LEE et al., 2016; LO et al., 2013; TRCHOUNIAN; TRCHOUNIAN, 2015). A produção desses metabólitos de valor agregado é principalmente pesquisada em espécies microbianas dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Clostridium* (METSOVITI et al., 2012). Entretanto, avanços ainda são necessários, por isso, a exploração de novos ambientes

naturais é importante para avanços na identificação de micro-organismos melhores fermentadores do glicerol, permitindo, assim, o desenvolvimento de processos fermentativos mais produtivos. Neste aspecto, a rizosfera, região do solo influenciado pelas raízes dos vegetais, se sobressai como local com potencial biotecnológico de bioprospecção.

Bactérias rizosféricas promotoras do crescimento de plantas (PGPRs) podem utilizar mecanismos diretos ou indiretos que favorecem a adaptação vegetal ao ambiente, dentre estes, a capacidade de síntese de compostos orgânicos voláteis (COVs) por rizobactérias pode promover o crescimento vegetal e proporcionar resistência sistêmica induzida (ISR) (GUTIÉRREZ-LUNA et al., 2010; PARK et al., 2013). Os COVs compreendem um grupo constituído de mais de 30 compostos (RYU, 2015), muitos destes com alta aplicabilidade em diferentes setores industriais, abrangendo, dentre outros, alguns compostos alvos da bioprospecção de micro-organismos fermentadores de glicerol como o 2,3-BD. A produção microbiana de 2,3-BD fundamenta-se na sua aplicabilidade em diferentes setores industriais tais como na produção de fármacos, cosméticos, solventes e potencial aplicabilidade como combustível de aviação (CELINSKA; GRAJEK, 2009; CHOI et al., 2016). Outro composto explorado na metabolização do glicerol é o 1,3-propanodiol, composto utilizado na produção de poliéster e poliuretanos (SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA; LEJA, 2014).

A bioprospecção de micro-organismos fermentadores de glicerol em ambientes rizosféricos pode contribuir na identificação de novas linhagens capazes de utilizarem do coproduto da indústria do biodiesel para produção de compostos de valor agregado. Portanto, há a possibilidade de empregar uma fonte de carbono alternativa, barata e de fácil obtenção em processos fermentativos para manufatura de compostos de interesse industrial. O presente estudo, inédito quanto a indagação do potencial biotecnológico da rizosfera de alface (*Lactuca sativa*), visa identificar rizobactérias da hortaliça capazes de utilizar o glicerol como fonte única de carbono e determinar a capacidade de produção simultânea de 2,3-BD e 1,3-PD.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Isolamento de rizobactérias**

Para o isolamento das rizobactérias, três amostras de solo rizosférico de *Lactuca sativa*, coletadas no dia 10 de março de 2012 em uma horta orgânica situada na periferia de Goiânia-GO (16°42'34.51"S 49°20'23.21"O) e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (LAMAB/IPTSP/UFG). As amostras foram inicialmente secas em estufa a 80 °C por 24 horas e posteriormente, o material seco peneirado em peneira de porosidade de 2mm. Uma amostra de 1.0g do material peneirado foi adicionada a tubos de cultura contendo 9.0mL de meio de fermentação descrito por Günzel et al. (1991). Os tubos inoculados foram depositados dentro de jarras de anaerobiose e incubados em estufa a 30 °C, por 48 horas. Após este tempo, uma alíquota foi retirada de cada tubo e transferida para um meio de fermentação novo e novamente incubadas. Esta etapa foi repetida por três vezes. Para o isolamento dos micro-organismos foi empregada a técnica de diluição seriada e para diferenciação das cepas bacterianas foi utilizado o painel GEN III MicroPlate™ da BIOLOG. Os micro-organismos isolados foram estocados a -20 °C em Caldo Nutriente (HIMEDIA®) suplementado com 25% (m/m) de glicerol.

#### 4.2.2 Identificação molecular das bactérias isoladas

Para a identificação molecular das bactérias isoladas, o DNA genômico foi extraído segundo a metodologia descrita por Van Soolingen et al. (1994). A amplificação da região gênica 16S rDNA foi realizada por PCR com a utilização dos *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Para a reação foram utilizados 35,5µL de água ultrapura (miliQ®), 5,0µL de tampão de amostra (10X) (Ludwig Biotec LTDA), 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM) (Ludwig Biotec LTDA), 1,0µL de solução de cada *primer* (10mM) (Invitrogen™), 4,0µL de solução dNTP (2,5mM) (Ludwig Biotec LTDA), 1,0µL de Taq polimerase (5U) (Ludwig Biotec LTDA) e 1,0µL de DNA (50ng), volume final de 50µL. Os ciclos no termociclador (Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers) foram 3min de desnaturação inicial a 94 °C e 30 ciclos de desnaturação 94 °C/1min, anelação 55 °C/30s e extensão 72 °C/30s, extensão final 72 °C/10min. O produto de PCR foi purificado com o kit E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega). Para o sequenciamento das amostras foram utilizados os *primers* 27F, 1541R, 926F (5'-AAACTYAAAKGAATTGACGG-3'), 530F (5'-TGA CTGACTGAGTGCCA GCMGCCGCGG-3'); 519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG -3') e 907R (5'-GTNTT ACNGCGGCKGCTG -3'),

procedimento realizado em sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems® pelo Laboratório de Biotecnologia da Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília/DF. As sequências foram analisadas no software CodonCode Aligner da CodonCode Corporation e comparadas com o banco de dados GenBank NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Para melhores padrões de identidade e similaridade a identificação seguiu metodologia adaptada de Carvalho-Netto et al. (2008). Foi construída uma árvore filogenética com as amostras de rizobactérias isoladas e cepas tipo (*type strain*) dos gêneros melhor classificados nos dois bancos de dados de comparação de sequências. Cepas tipos foram obtidas no banco de dados *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (<http://www.bacterio.cict.fr/>) e suas sequências de 16S rDNA obtidas no GenBank NCB. As sequências foram alinhadas por CLUSTAL W, a árvore construída pelo método Neighbor-joining, modelo de Jukes-Cantor com *bootstrap* de 2000 repetições no programa MEGA7. As sequências de 16S DNA foram depositadas no GenBank NCBI com os números de acesso KX061930, KX061931, KX061932, KX061933 e KX061934.

#### **4.2.3 Determinação da tolerância microbiana a diferentes concentrações de glicerol**

Para a determinação da tolerância microbiana a diferentes concentrações de glicerol, as rizobactérias isoladas foram crescidas em Caldo Nutriente por 48 hora a 30 °C. Após o crescimento, cada amostra foi inoculada em tubos de cultura, na proporção de 10% do volume total de meio presente nos tubos. Foi utilizado para a o experimento o meio Meio Mineral Líquido de Bushnell Haas (BUSHNELL; HAAS, 1941) acrescido de 0.1% de extrato de levedura e incubado a 30 °C. O meio foi suplementado com diferentes concentrações de glicerol (2.0%; 4.0%; 6.0%; 8.0%; 10.0%; 12.0%; e 15.0% m/v) como fonte única de carbono. Os tubos foram então incubados em aerobiose a 30 °C e o crescimento microbiano avaliado pela análise espectrofotometria ( $OD_{600nm}$ ) da turvação nos tempos de 0, 24, 36, 48 e 72 horas. O resultado do ensaio foi produto da média de três experimentos independentes realizados sob as mesmas condições.

#### **4.2.4 Determinação de uma metodologia de triagem rápida de rizobactérias produtoras de 2,3-butanodiol**

A determinação dos micro-organismos produtores de 2,3-butanodiol foi realizada com o teste de Voges-Proskauer (VP) com modificações (BARRIT, 1936). As

bactérias isoladas foram cultivadas em duas series de Meio Mineral Líquido (BUSHNELL; HAAS, 1941) a 30 °C por 24 horas contendo em cada serie uma fonte única de carbono diferente, na primeira glicerol (2.0% m/v) e na outra glicose (0.5% m/v). Após esse período de incubação, os meios de cultivo foram centrifugados a 3000rpm por 10 minutos e o sobrenadante separado para determinação de 2,3-BD. A 70µL do sobrenadante foram adicionados 50µL do reagente Barrit I (solução alcóolica de alfa-naftol a 5.0%) e 17µL do reagente Barrit II (solução aquosa de KOH a 4.0%), a solução foi então agitada por 15 minutos a 100rpm. O resultado positivo foi visualizado pelo desenvolvimento de uma coloração variando de tonalidades de vermelho a róseo claro.

#### **4.2.5 Fermentação do glicerol e determinação dos produtos de fermentação**

Um inóculo correspondente a 10% (v/v) do volume final de fermentação, foi adicionado a 25mL do meio de fermentação Günzel et al. (GÜNZEL et al.,1991) em frascos tipo Schott com capacidade de 50mL. Os frascos inoculados foram incubados em aerobiose a 30 °C por 48 horas sem agitação. Alíquotas foram retiradas no tempo 0 e 48 horas de incubação. Alíquotas foram filtradas em filtro tipo Millipore® (0,25µm de poro), o sobrenadante separado para a determinação da concentração inicial e final de glicerol e produção de 2,3-butanodiol e 1,3-propanodiol. A determinação foi realizada em cromatógrafo Agilent Technologies 1200 series com uma coluna Hamilton PRP-X300 e detector de índice de refração RID-6A. Foram utilizadas as seguintes condições operacionais: volume da amostra 20µL, fase móvel água Milli-Q, fluxo 0.8 mL/min; temperatura 50 °C. Os dados resultantes refletiram a média de três experimentos realizados de forma independente sob as mesmas condições.

#### **4.2.6 Análise estatística**

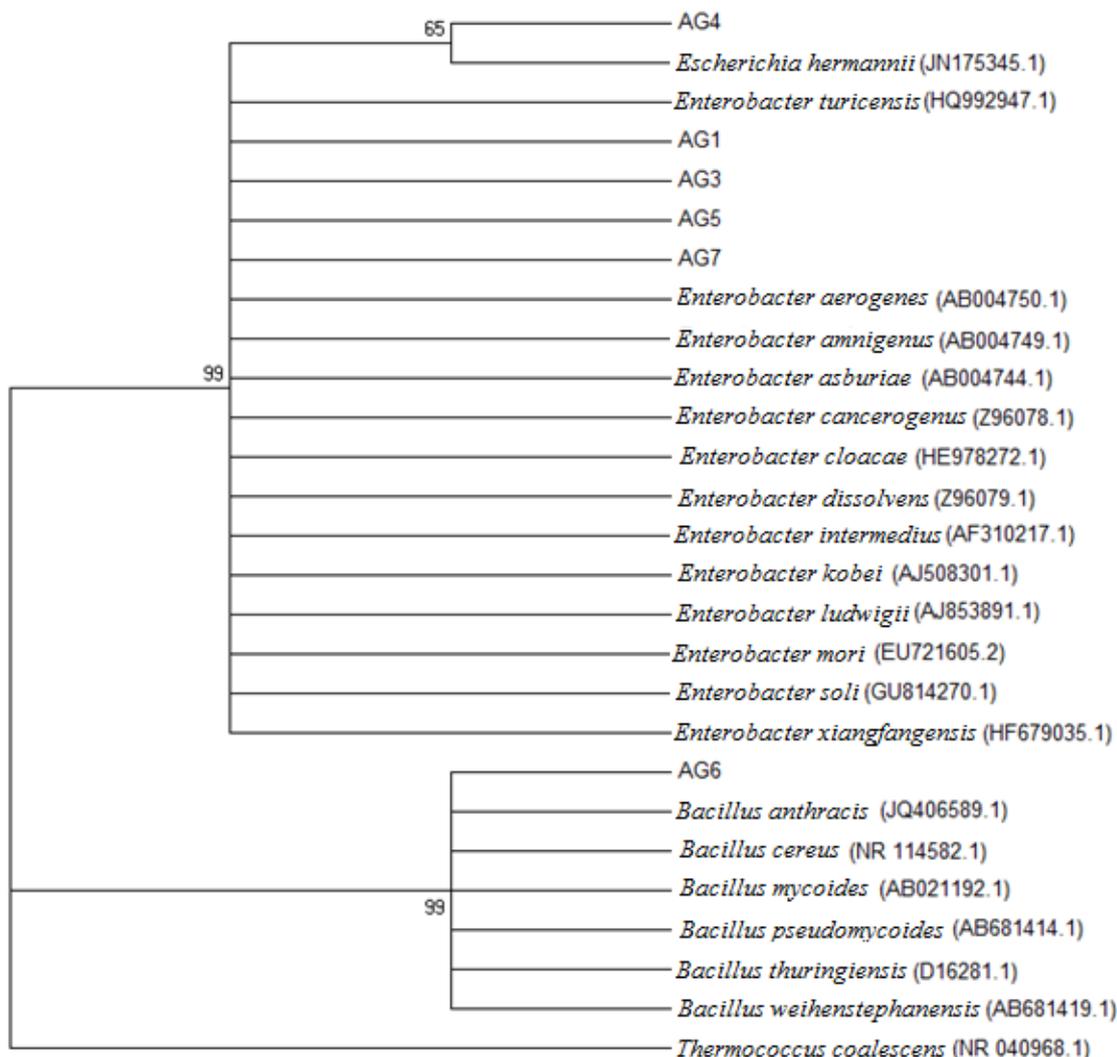
Para análise das médias foi utilizado a técnica estatística de Análise de Variância (ANOVA) por meio do teste aglomerativo de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) com auxílio do programa Sisvar 5.3 Build 77.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Isolamento e identificação de morfoespécies

No processo de inter-relação entre vegetais e micro-organismos a relação ecológica mantida por esses diferentes grupos de seres vivos é sustentada por uma complexa associação de cooperação (YANG et al., 2013). As raízes dos vegetais liberam exsudatos no solo, que por sua vez, são utilizados como fonte nutricional por diferentes micro-organismos circundantes, que podem manter uma relação positiva ou negativa com o vegetal. Devido a essa inter-relação, a densidade microbiana presente na rizosfera é maior que a presente no solo não influenciado pelas raízes de vegetais, evidenciando, assim, a complexidade da comunidade microbiana nesse ambiente (HAMPP; HARTMANN; NEHLS, 2012). *Lactuca sativa* (alface) possui uma biodiversidade rizosférica variada, onde diferentes gêneros e espécies tais como *Enterobacter cloacae*, *Burkholderia* sp., *Chryseobacterium formosense* sp., *Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas mendocina* foram isolados e identificados (JHA et al., 2013; KANG et al., 2012; KOHLER et al., 2009; NOEL et al., 1996; YOUNG et al., 2005).

Das amostras de solo rizosférico de *Lactuca sativa* foram isolados, e diferenciados por testes bioquímicos, seis morfoespécies. Destes isolados cinco foram caracterizados como gram-negativos e um gram-positivo. O sequenciamento parcial do gene 16S rDNA e construção da árvore filogenética com as cepas tipo dos gêneros microbianos com maior identidade, permitiu evidenciar a família *Enterobacteriaceae* (AG1, AG3, AG4, AG5 e AG7) e dentro desta, a predominância de isolados com grande similaridade com o gênero *Enterobacter* (AG1, AG3, AG5 e AG7) (Figura 4.1). Bactérias do gênero *Enterobacter* são reconhecidamente PGPR, motivo pelo qual pode ser facilmente encontrado em ambientes rizosféricos. Este gênero possui linhagens capazes de solubilizar fosfato inorgânico, produzir ácido indol acético, ácido cianídrico (HCN) e sideróforos, fixar nitrogênio, produzir compostos antimicrobianos, VOCs, dentre outros fatores diretos e indiretos de promoção de crescimento vegetal (JHA et al., 2011).



**Figura 4.1** Relação filogenética entre rizobactérias isoladas e cepas tipo com maior similaridade. Na análise foram utilizados método Neighbor-joining, modelo de Jukes-Cantor e os valores de *bootstrap* são baseados em 2000 repetições. *Thermococcus coalescens* foi utilizado como grupo externo.

O isolado AG6 mostrou maior similaridade com cepas do gênero *Bacillus*, gênero este que possui a capacidade de bioconversão do glicerol em diferentes produtos de interesse comercial (FAGES et al., 1986; KUMAR et al., 2015; UI et al., 1998; YANG et al., 2011; YANG et al., 2015). Não obstante, diferentes gêneros de bactérias da família *Enterobacteriaceae* também são descritos como capazes de utilizar glicerol como fonte única de carbono. *Escherichia coli* com capacidade de fermentação anaeróbia de glicerol foram isoladas por Dharmadi, Murarka e Gonzalez (2006), bactérias do gênero *Pseudomonas* foram isoladas por Sathianachiyar e Devaraj (2013), *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter freundii* por Metsoviti et al. (2012) e diferentes cepas do gênero *Klebsiella* por Almeida, Fávoro, Quirino (2012) e Barbirato et al.

(1996). Entre os isolados, o gênero *Enterobacter* compõem parte do grupo microbiano fermentador de glicerol melhor documentado (BIEBL et al., 1998; JI et al., 2009; LO et al., 2013; METSOVITI et al., 2012; ROSSI et al., 2012; SATTAYASAMITSATHIT et al., 2011; SAXENA et al., 2009; WU et al., 2008).

A posição da amostra na árvore filogenética evidencia melhor similaridade entre gênero ou espécie, entretanto, apesar da metodologia utilizada pôde-se chegar a uma conclusão clara e específica sobre a identificação de apenas um isolado, AG4 como *Escherichia hermannii*. Por meio dos padrões filogenéticos e identidade por amostras depositadas no GenBank NCBI, as prováveis espécies são mostradas na Tabela 1.2.

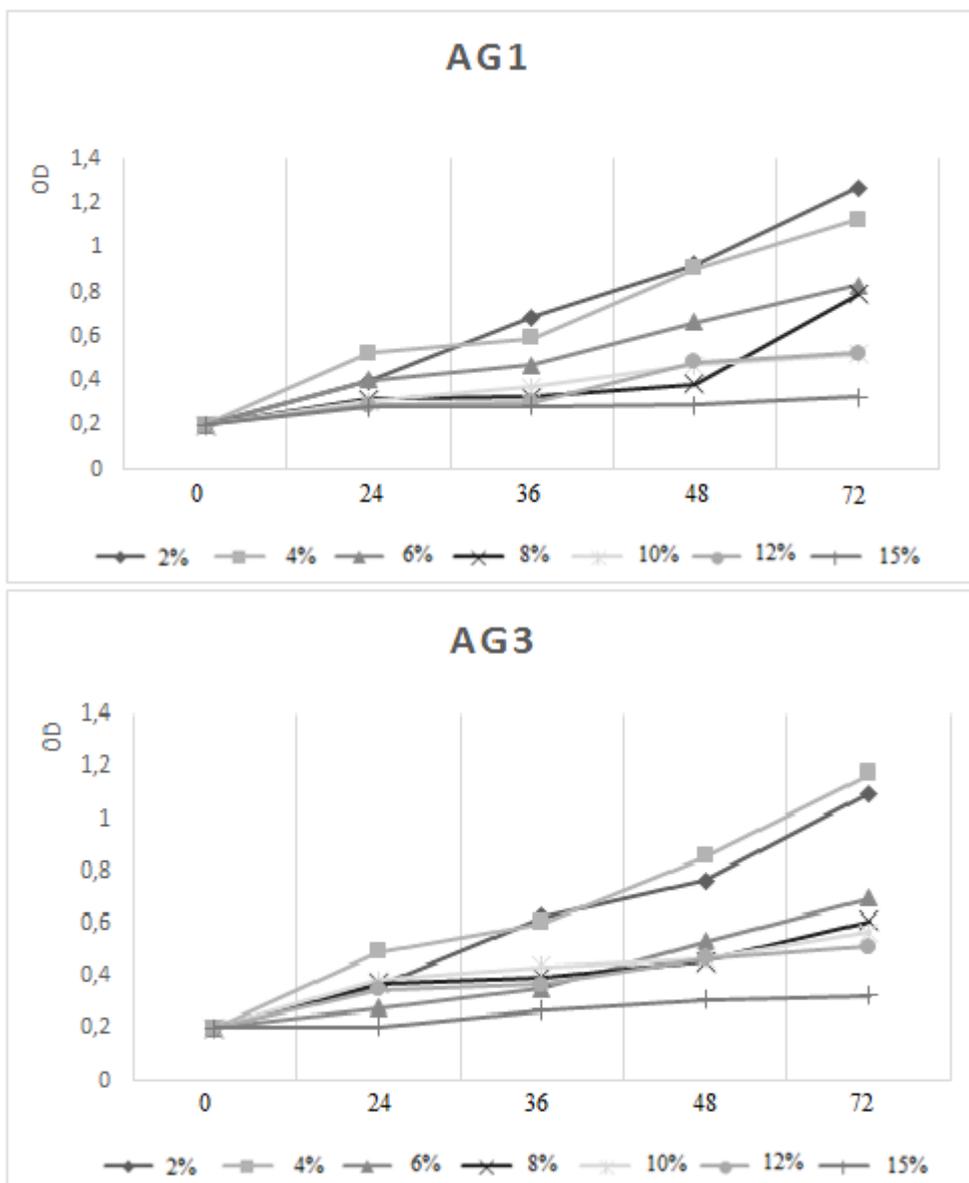
**Tabela 4.1** Identificação dos micro-organismos mais prováveis a partir da sequência parcial do gene 16S rDNA.

<b>Isolado</b>	<b>Espécie mais próxima</b>	<b>Identidade</b>	<b>Número de acesso</b>
AG1	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99%	NR042349.1
AG3	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	NR117679.1
AG4	<i>Escherichia hermannii</i>	96%	NR104940.1
AG5	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	94%	NR044977.1
AG6	<i>Bacillus</i> sp.	100%	NR074453.1
AG7	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99%	NR042349.1

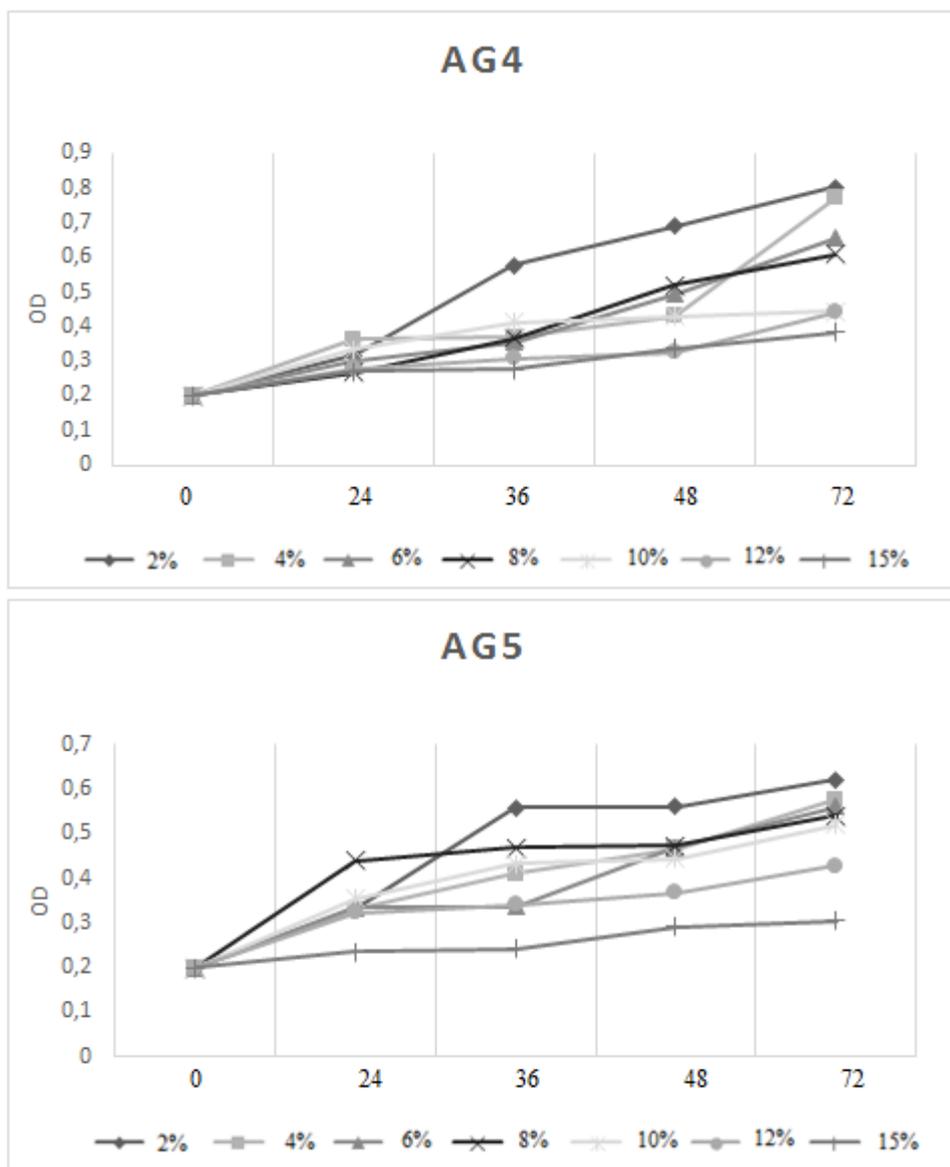
#### 4.3.2 Avaliação de crescimento em diferentes concentrações de glicerol

Determinar a faixa ótima de crescimento e a influência da fonte de carbono no processo fermentativo é de grande importância. No presente estudo, o crescimento dos micro-organismos em meio com diferentes concentrações de glicerol sugere que altas concentrações do coproduto inibem o crescimento microbiano. A concentração de 2% (m/v) sugere ser a de melhor crescimento para os isolados e conseqüentemente para o processo de fermentativo (Figura 4.2A, B e C). Observou-se que o isolado *Enterobacter ludwigii* -AG7 possui um melhor perfil de crescimento quanto a capacidade de tolerar altas concentrações de glicerol, a amostra apresentou valor máximo de OD<sub>600nm</sub> de 1.391 na menor concentração testada e 0.307 no de maior concentração. Ito et al. (2005) sugerem que a cepa de *Enterobacter aerogenes* por eles testada apresentou melhor índice de produção de compostos de interesse (H<sub>2</sub>, acetato, etanol, lactato) nas menores concentrações de glicerol testadas (0.5 a 1.0% m/v) e que o aumento na concentração da fonte de carbono diminuiu o rendimento produtivo da amostra. Como o observado por

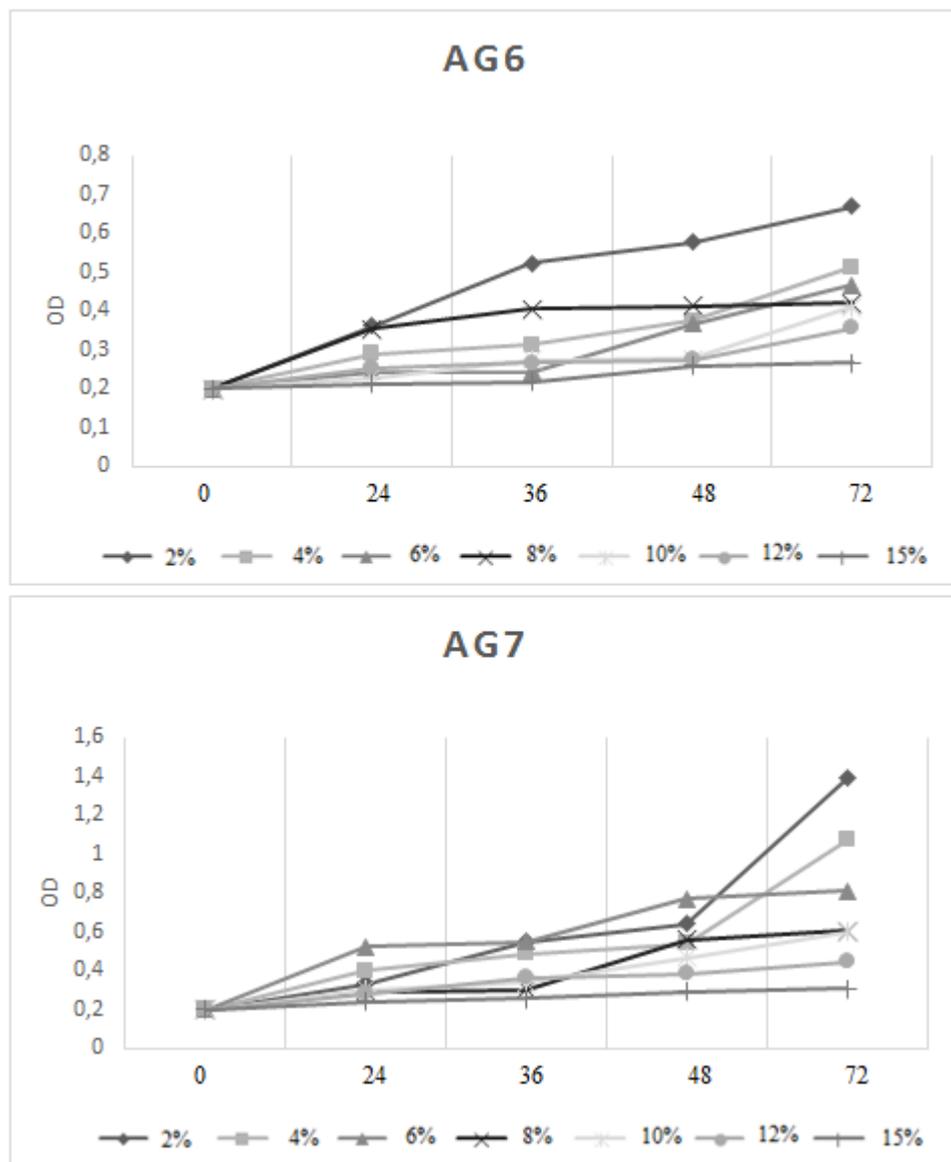
Dabrock, Bahl e Gottschalk (1992), por serem metabólitos primários, a capacidade produtiva de produtos de interesse industrial como propanodiol, butanodiol, acetato e etanol, estão diretamente relacionadas ao aumento da densidade microbiana.



**Figura 4.2A** Curva de crescimento dos isolados de rizobactérias AG1e AG3 ao longo de 72 horas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicerol ( $OD_{600nm}$ )



**Figura 4.2B** Curva de crescimento dos isolados de rizobactérias AG4 e AG5 ao longo de 72 horas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicerol ( $OD_{600nm}$ )



**Figura 4.2C** Curva de crescimento dos isolados de rizobactérias AG6 e AG7 ao longo de 72 horas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicerol ( $OD_{600nm}$ )

#### 4.3.3 Triagem de produção de 2,3-butanodiol e processo fermentativo

O teste de Voges-Proskauer (VP) é utilizado para identificar micro-organismos detentores da via metabólica butanodiólica. Esta via possui como produto final 3-hidroxi-2-butanona (acetoína), portanto, a mesma via metabólica de produção do 2,3-butanodiol (LUERCE, 2002). A acetoína produzida pelos micro-organismos reage com o oxigênio atmosférico e o KOH formando diacetila que, por sua vez, reage com o alfa-naftol produzindo um complexo colorido que confirma a positividade do teste (ZAFALON; ARCARO; NADER FILHO, 2009).

À exceção do isolado *Escherichia hermannii*-AG4 as demais rizobactérias isoladas mostraram-se positivas no teste quando cultivadas em meio contendo glicose. Este resultado para AG4 está de acordo com o documentado na literatura, uma vez que todas as espécies do gênero *Escherichia* são negativas para o teste de VP (FARMER III, 1999). Quatro isolados (AG1, AG3, AG5 e AG7) foram positivas quando cultivadas em meio com glicerol. Esse resultado ocorre, pois, a glicose é um carboidrato simples e facilmente metabolizado pelos micro-organismos, diferente do glicerol, que, mesmo assimilado pela célula microbiana por transporte passivo, é uma fonte de energia mais complexa cuja molécula é composta por apenas três átomos de carbono (RIVALDI et al., 2008).

Mariotto (2007) observou que a produção de acetoína não é equivalente a produção do 2,3-BD, uma vez que o primeiro é precursor do segundo, vários fatores podem influenciar a concentração de um e do outro no processo de fermentação. Portanto, a padronização do teste de identificação do composto metabólico acetoína, precursora do 2,3-BD, permitiu a verificação das possíveis morfoespécies capazes de produzir o composto de interesse. Por este motivo, o teste de VP, pode não indicar o maior produtor de 2,3-BD devido ao seu limite de detecção, mas sim a capacidade do micro-organismo produzir o composto de interesse, ou seja, o teste caracteriza-se apenas como qualitativo de triagem tanto para meios contendo glicose como glicerol.

Na Tabela 4.2 observamos os resultados da produção de 2,3-BD e 1,3-PD em fermentação de glicerol a 2.0% (m/v) por 48 horas. Os isolados AG3 e AG7, previamente identificadas como produtoras de acetoína, foram capazes de produzir simultaneamente os dois compostos de interesse, 2,3-BD e 1,3-PD. O isolado AG3 apresentou a maior produção simultânea dos compostos de interesse, entretanto não foi identificado diferença estatisticamente significativa com outros isolados produtores. Além disso, é observado que, apesar da identificação sugerir que as amostras AG1 e AG7 pertencerem a mesma espécie, *Enterobacter ludwigii*, os dois isolados notadamente pertencem a linhagens microbianas diferentes, uma vez que não foi observada produção de 1,3-propanodiol por AG1 e o produto foi registrado para AG7.

A amostra AG6, negativa no teste qualitativo, como esperado apresentou menor rendimento produtivo do composto, contudo, destacou-se na produção de 1,3-PD. Pelos resultados obtidos para os isolados AG6, AG3 e AG7 sugerem as duas predileções de formas distintas de metabolização do glicerol, a metabolização pela via redutora, preferencialmente utilizada pela amostra AG6, e a metabolização pela via oxidativa,

observada nos isolados da família *Enterobacteriaceae*. No processo reductivo, há ação de desidratação da molécula de glicerol pela enzima *glicerol desidratase* e por fim o produto da reação, 3-hidroxiopropanaldeo, é reduzido pela ação enzimática da *1,3-propanaldeo oxidoreductase* em 1,3-propanodiol (SAXENA et al., 2009). No processo oxidativo, o glicerol, por meio da ação enzimática da *glicerol desidrogenase* é convertido em diidroxiacetona, produto utilizado na via metabólica glicolítica e subsequentemente, produção de compostos metabólitos fermentativos ou, quando em aerobiose, oxidação completa na via respiratória celular para produção de energia (SILVA; MACK; CONTEIRO, 2009).

**Tabela 4.2** Produção e rendimento da fermentação do glicerol em concentração de 20g.L<sup>-1</sup>

Isolado	2,3-BD		1,3-PD	
	Concentração do Produto (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (g.g <sup>-1</sup> )	Concentração do Produto (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (g.g <sup>-1</sup> )
AG1	0.501a	0.0211	-	-
AG3	0.522a	0.0219	0.735a	0.0308
AG5	0.459a	0.0191	-	-
AG6	0.357a	0,0149	0.842a	0.352
AG7	0.414a	0.0172	0.349a	0.0145

Letras iguais nas colunas indicam diferenças não significativas (p<0.05) de acordo com o teste de Scott-Knott.

A produção de 2,3-BD e 1,3-PD foi menor quando comparada com resultados obtidos por diferentes autores utilizando glicerol como fonte única de carbono (PEREGO et al., 2000; PETROV, PETROVA, 2010; METSOVITI et al., 2012; YANG et al., 2015). Entretanto, estes autores utilizaram de modificações nas condições de cultivo tais como flutuação e controle de pH, manipulação na regeneração de cofatores de crescimento bacteriano e fluxo de carbono, agitação e aeração do processo de fermentação quando comparados aos testes realizados.

As principais ferramentas utilizadas com a finalidade de aumentar a produção dos metabólitos microbianos da conversão do glicerol são o melhoramento genético ou outras técnicas moleculares como a clonagem gênica, otimização do meio de fermentação para atender as necessidades específicas das linhagens microbianas naturais (JI et al., 2009; JUNG et al., 2014; PAJUELO et al., 2005; SHEN et al., 2012; YANG et al.; 2013; ZHANG et al., 2011). Yen et al. (2014) observou que o processo fermentativo para produção simultânea de 2,3-BD e 1,3-PD, quando submetido a

maiores concentrações de oxigênio diluído, resulta em melhores rendimentos e que baixas concentrações do elemento contribui para a maior produção de 1,3-PD. Sattayasamitsathit et al. (2011) após diversificarem a concentração de alguns compostos do meio de fermentação, observaram, por meio de um modelo matemático, que a variação dos constituintes do meio influenciam a produção dos compostos. Estas modificações permitiram uma produção equivalente a  $13.54 \text{ g.l}^{-1}$  e  $6.61 \text{ g.l}^{-1}$  de 1,3-PD e de 2,3-BD, respectivamente, pelo micro-organismo analisado.

#### 4.4 CONCLUSÕES

As rizobactérias isoladas são capazes de crescer em meio contendo glicerol como fonte única de carbono, possibilitando, assim, seu emprego em processos fermentativos para produção de compostos de interesse manufaturador. O método de triagem de produção de 2,3-BD mostrou-se eficiente em evidenciar os micro-organismos melhores produtores do composto e duas rizobactérias isoladas foram capazes de produzir simultaneamente 2,3-BD e 1,3-PD. Assim, este estudo é um passo importante para o incentivo ao desenvolvimento biotecnológico de novas tecnologias fermentativas e sua aplicação sustentável.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), processo nº 201210267001173 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos ao primeiro autor.

#### REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 48, p. 1-16, 2012.

BARBIRATO, F.; HIMMI E. H.; CONTE, T.; BORIES A. 1, 3-Propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**, v. 7, n. 2, p. 281-289, 1998.

BARRITT, M. M. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of  $\alpha$ -naphthol. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 42, n. 2, p. 441-454, 1936.

BIEBL, H; ZENG, A.; MENZEL, K., DECKWER, W. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 24-29, 1998.

BRASIL. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2013**. Rio de Janeiro: ANP, 2013.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, n. 5, p. 653, 1941.

CARVALHO-NETTO, O. V.; ROSA, D. D.; CAMARGO, L. E. A. Identification of contaminant bacteria in cachaça yeast by 16s rDNA gene sequencing. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 508-515, 2008.

CELIŃSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol-current state and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 715-725, 2009.

CHOIA, M.; KIM, S.; KIM, J. K.; PARKC, Y.; SEO, J. Molecular cloning and expression of *Enterobacter aerogenes*  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* for efficient 2,3-butanediol production. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 170-176, 2016.

DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1233-1239, 1992.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic Fermentation of Glycerol by *Escherichia coli*: A New Platform for Metabolic Engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, V. 94, n. 5, p.821-829, 2006.

FAGES, J; MULARD, D; ROUQUET, J-J; WILHELM, J-L. 2,3-Butanediol production from *Jerusalem artichoke*, *Helianthus tuberosus*, by *Bacillus polymyxa* ATCC 12321. Optimization of kLa profile. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 25, p.197-202, 1986.

FARMER III, J. J. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington D.C.: ASM Press, 1999. p. 442-458.

GÜNZEL, B.; YONSEL, S.; DECKWER, W. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m<sup>3</sup>. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 289-294, 1991.

GUTIÉRREZ-LUNA, F. M.; LÓPEZ-BUCIO, J.; ALTAMIRANO-HERNÁNDEZ, J.; VALENCIA-CANTERO, E.; CRUZ, H. R.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. **Symbiosis**, v. 51, n. 1, p. 75-83, 2010.

HAMPP, R.; HARTMANN, A.; NEHLS, U. The rhizosphere: molecular interactions between microorganisms and roots. **Ecological Studies**, v. 220, p. 111-139, 2012.

JI, X.; HUANG, H.; DU J.; ZHU, J.; REN, L.; HU, N.; LI, S. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3410-3414, 2009.

JHA, C. K.; AERON, A.; PATEL, B. V.; MAHESHWARI, D. K.; SARAF, M. *Enterobacter*: role in plant growth promotion. In: MAHESHWARI, D. K. (Org.) **Bacteria in Agrobiolgy**: Plant Growth Responses. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 159-182.

JUNG, W. S.; KANG, J. H.; CHU, S. H.; CHOI, I. S.; CHO, K. M. Elevated production of 3-hydroxypropionic acid by metabolic engineering of the glycerol metabolism in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 23, p. 116-122, 2014.

KANG, S.; KHAN, A. L.; HUSSAIN, J.; ALI, L.; MUHAMMAD, K; MUHAMMAD, W.; LEE, J. Rhizoinin a from *Burkholderia* sp. KCTC11096 and its growth promoting role in lettuce seed germination. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7980-7988, 2012.

KOHLER, J. HERNÁNDEZB, J. A.; CARAVACAA, F.; ROLDÁN, A. Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 2, p. 245-252, 2009.

KUMAR, P.; SHARMA, R.; RAY, S.; MEHARIYA, S.; PATEL, S. K. S.; LEE, J.; KALIA, V. C. Dark fermentative bioconversion of glycerol to hydrogen by *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 383-388, 2015.

LEE, J.; LEE, J. H.; KIM, D.; PARK, C.; YU, J.; LEE, E. Y. Crude glycerol-mediated liquefaction of empty fruit bunches saccharification residues for preparation of biopolyurethane. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 34, p. 157-164, 2016.

LO, Y.; CHEN, X.; HUANG C., YUAN, Y.; CHANG J. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15815-15822, 2013.

LUERCE, R. F. **Produção de acetoína por *Bacillus polymyxa***. 2002. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

MARIOTO, J. R. **Produção de acetoína e 2-3 butanodiol por *Bacillus polymyxa***, 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós

graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

METSOVITI, M.; PARAMITHIOTIS, S.; DROSINOS, E. H.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; NYCHAS, G. E.; ZENG, A.; PAPANIKOLAOU, S. Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1, 3-propanediol, 2, 3-butanediol and ethanol. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 1, p. 57-68, 2012.

NOEL, T. C.; SHENG, C.; YOST, C. K.; PHARIS, R. P.; HYNES, M. F. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 279-283, 1996.

PAJUELO, M. G. et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Metabolic Engineering**, v.7, p. 329-336, 2005.

PARK, H. B.; LEE, B.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. One shot-two pathogens blocked: Exposure of *Arabidopsis* to hexadecane, a long chain volatile organic compound, confers induced resistance against both *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. **Plant signaling & Behavior**, v. 8, n. 7, p. e24619, 2013.

PEREGO, P.; CONVERTI, A.; BORGHI, A.D.; CANEPA, P. 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and applications to food industry residues. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 613-620, 2000.

PETROV, K.; PETROVA, P. Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, p. 943-949, 2010.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Biodiesel de glicerol: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 37, p. 44-51, 2008.

ROSSI, D. M.; COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. C. R.; AYUB, M. A. Z. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1, 3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p. 223-227, 2012.

RYU, C. Bacterial volatiles as airborne signals for plants and bacteria. In: LUGTENBERG, B. (Org.) **Principles of Plant-Microbe Interactions**. Springer International Publishing, 2015. p. 53-61.

SAXENA, R. K.; ANAND, P.; SARAN, S.; ISAR, J. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 895-913, 2009.

SATHIANACHIYAR, S.; DEVARAJ, A. Biopolymer production by bacterial species using glycerol, a byproduct of biodiesel. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 3, n. 8, p. 1-5, 2013.

SATTAYASAMITSATHIT, S.; PRASERTSAN, P.; METHACANON, P. Statistical optimization for simultaneous production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol using crude glycerol by newly bacterial isolate. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 608-614, 2011.

SHEN, X.; LIN, Y.; JAIN, R.; YUAN, Q.; YAN, Y. Inhibition of acetate accumulation leads to enhanced production of (R, R)-2,3-butanediol from glycerol in *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 11, p. 1725-1729, 2012.

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

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D; LEJA, K. An increasing of the efficiency of microbiological synthesis of 1,3-propanediol from crude glycerol by the concentration of biomass. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 72-78, 2014.

TRCHOUNIAN, K.; TRCHOUNIAN, A. Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: an overview and perspectives. **Applied Energy**, v. 156, p. 174-184, 2015.

UI, S; HOSAKA, T; WATANABE, K; MIMURA, A. Discovery of a New Mechanism of 2,3-Butanediol Stereoisomer Formation in *Bacillus cereus* YUF-4f. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 1, p. 79-83, 1998.

VALERIO, O.; TESSA, H.; CHRISTOPHER, P.; MANJUSRI, M.; AMAR, M. Improved utilization of crude glycerol from biodiesel industries: Synthesis and characterization of sustainable biobased polyesters. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 141-147, 2015.

VAN SOOLINGEN, D.; HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. DNA Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 196-205, 1994.

VERDUGO, C; LUQUE, C; LUNA, D.; HIDALGO, J. M.; POSADILLO, A.; SANCHO, E. D.; RODRIGUEZ, S.; FERREIRA-DIAS, S.; BAUTISTA, F.; ROMERO, A. A. A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6657-6662, 2010.

WOJTUSIK, M.; RODRÍGUEZ, A.; RIPOLL, V.; SANTOS, V. E.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA-OCHOA, F. 1, 3-Propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 100-107, 2015.

WU, K.; SARATALE, G. D.; LO, Y.; CHEN, W.; TSENG, Z.; CHANG, M.; TSAI, B.; SUD, A.; CHANG, J. Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 7966-7970, 2008.

YANG, T.; CHEN, Y.; WANG, X.; DAI, C. Plant symbionts: Keys to the phytosphere. **Symbiosis**, v. 59, n. 1, p. 1-14, 2013.

YANG, T.; RAO, Z.; ZHANG, X.; LIN, Q.; XIA, H.; XU, Z.; YANG, S. Production of 2,3-butanediol from glucose by GRAS microorganism *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, p. 650–658, 2011.

YANG, T.; RAO, Z.; ZHANG, X.; XU, M.; XU, Z.; YANG, S-T. Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microbial Cell Factories**, v.14, p. 122, 2015.

YEN, H.; LI, F.; CHANG, J. The effects of dissolved oxygen level on the distribution of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol produced from glycerol by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 374-378, 2014.

YOUNG, C.; KAMPFER, P.; SHEN, F.; LAI, W.; ARUN, A. B. *Chryseobacterium formosense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L.(garden lettuce). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. 1, p. 423-426, 2005.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A. Utilização do teste de Voges-Proskauer e da coagulase para o diagnóstico laboratorial de *Staphylococcus aureus* envolvidos na epidemiologia da mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1285-1293, 2009.

ZHANG, G.; YANG, G.; WANG, X.; GUO, Q.; LI, Y.; LI, J. Influence of blocking of 2,3-butanediol pathway on glycerol metabolism for 1,3-propanediol production by *Klebsiella oxytoca*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 1, p. 116-128, 2012.

---

 ANEXO I – Meios de Cultura
 

---

**1 MEIO MÍNIMO LÍQUIDO PARA *Clostridium* (GÜNZEL; YONSEL; DECKWER,1991)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....		3,4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....		1,3g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....		2,0g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....		0,2g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....		0,02g
CaCO <sub>3</sub> .....		2,0g
Extrato de Levedura.....		1,0g
Glicerol.....		20mL
*Solução de Elementos Traços.....		1,0ml
**Solução	de	2,0ml
Fe.....		
H <sub>2</sub> O	destilada	q.s.q 1000mL
.....		

**PREPARO:** Autoclavar a 121°C a 1 atm por 20 minutos.

**\*Composição da Solução de Elementos Traços**

ZnCl <sub>2</sub> .....	70mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	0,1g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	60mg
COCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,2g
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	20mg
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O .....	25mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	35mg
HCl (37%) .....	0,9mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.q .....	1000mL

**\*\*Composição da Solução de Fe**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	5,0g
HCl (37%) .....	4,0mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.q .....	1000mL

## 2 CALDO NUTRIENTE (HIMEDIA)

Digestão péptica de tecido animal .....	4,3g
Triptona Tipo I (caseína enzimática hidrolisada) .....	4,3g
NaCl .....	6,4g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.q .....	1000mL

**PREPARO:** Autoclavar a 121°C a 1 atm por 20 minutos, pH 7.2 ±0.2.

## 3 MEIO MINERAL LÍQUIDO DE BUSHNELL HAAS (BUSHNELL; HAAS, 1941)

MgSO <sub>4</sub> .....	0,2g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,02g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,0g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	1,0g
FeCl <sub>3</sub> .....	0,05g
*Extrato de levedura .....	1,0g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p .....	1000mL

**PREPARO:** Autoclavar 121°C a 1 atm por 20 minutos, pH 7.2 ±0.2.

\*Modificação realizada para adequação experimental.

---

**ANEXO II – CONTIGs: Sequências de DNA**

---

&gt;AG1

AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGAGGCTAGAGTC  
TTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC  
TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTC  
AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  
GCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCG  
GAGCTAACCGGTTAAGTGCACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA  
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  
ATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTT  
TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGG  
CTGTGCTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG  
CAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGAC  
TGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGC  
CCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAG  
CGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATT  
GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGAT  
CAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA  
CACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGG  
CGCTTACCCTTTGTGATTCATGACT

&gt;AG3

GTTTGAATCCTGGCTCAGATTGAACGCTG  
GCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTC  
TCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGAT  
GGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCCGAA  
GACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATG  
GGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGC  
TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT  
GCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTC  
AGCGGGGAGGAAGGCGATGAGGTTAATAACCTCRTCAATTGACGTTACCC  
GCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG  
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTC  
TGTC AAGTCCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGA  
AACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCT  
GGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCC  
CTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTGCACCGCCTGGGGAG  
TACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC  
GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTC  
TTGACATCCAGAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCT  
GAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGT  
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGC  
CGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATG  
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT  
GGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAG  
TGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA  
TCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCT  
TGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGT  
AGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGT  
GAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACTGCGGCTGGATCCACCTCC

>AG4

GATCCTGGCTCAGA  
TTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAA  
GCAGGGTGAGTAATGTCTGGGGATTTGCCGTGATGGAGGGGGATAACTACT  
GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACC  
TTCGGGCCTCTCCCATTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC  
AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC  
GGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGCGATGCGGTAATACGGG  
AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGG  
TCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCC  
GAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAG  
CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC  
CTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCACACAAGCG  
GAGAGAGCATGTGGTTTACTTCGTGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCT  
TGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTGTG  
AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCATCTCGTGTGTGAAATGTTGGTTT  
AAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCC  
GGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GCGCATACAAAGAGAAGCGAACTCTCGAGAGCACC GCGGCTTCATTAAT  
GCGTAGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAT  
CGTTAGTAATCGTGGATCAGAAATGCCACGGTGAATACGTTCCCTGGCGTT  
GTACACTCCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGATGCTAAATGAAGTAGGT

>AG5

TTG  
CTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCT  
GATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCG  
CAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCGATTGAACTCTGGCGCKGCC  
TCACATGCAAGTAGCGGTAGCACAGAGAGCTAACGTCTCGCGACGAGCGG  
CTAGCTGGTGTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCC  
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC  
CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTA  
CTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATGAGGTTAATAACCTTGTCAATTGACGT  
TACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
CGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGG  
CGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC  
TTCGAAACTGGCGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG  
GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTTTGGAGGTTGTGCC

>AG6

CTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC  
TGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAA  
TATTTTGTGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATG  
GACCCGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAAC  
GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC  
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG  
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGTA  
AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCT  
TGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGTATGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG  
CAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCGGAGGGTCATT  
GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTA  
GCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTT  
TCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA  
TTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGA  
GGGTTTCCGNCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG  
GGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA  
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC  
AGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGA  
GCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGT  
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATT  
AAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCAT  
AAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCT  
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG  
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGT  
CGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATT  
GGGTTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCG

>AG7

T

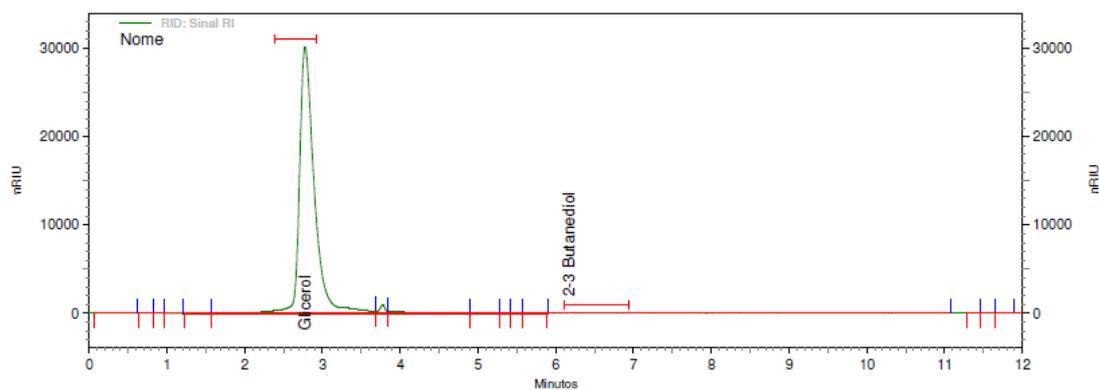
GCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCC  
TGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC  
GCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCA  
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCC  
TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCA  
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC  
TGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTAC  
TTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATAACCTCATCAATTGACGTT  
ACCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
GGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGC  
GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT  
TCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC  
CCCTGGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG  
ATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTG  
TGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAATGAATTGACGGGGGCCCGCAC  
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCT  
ACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAA  
CTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT  
GGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTT  
CGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTA  
CAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCAT  
AAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTC  
GGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGG  
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGT  
AGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTG

## ANEXO III – Cromatogramas

### Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\032.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 6:31:34 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:07:45 AM

Amostra: AG1.1



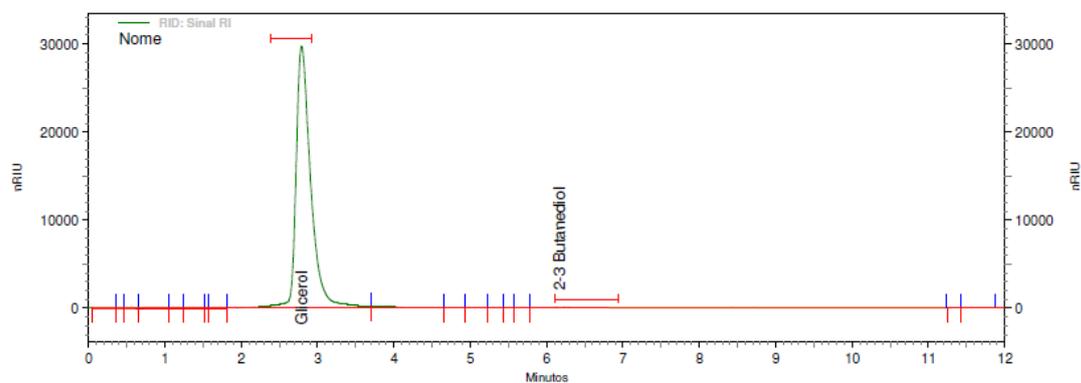
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.778	40207737	2.3312
2-3 Butanediol	6.170	722352	0.0438

### Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Danie\08 Dez 15\031.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 6:16:14 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:07:32 AM

Amostra: AG1.2



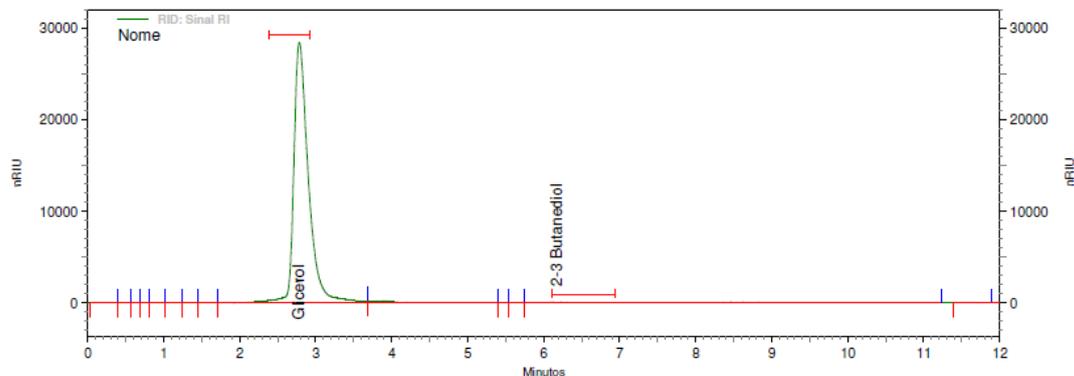
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.792	40303615	2.3368
2-3 Butanediol	6.177	911802	0.0553

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\033.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 6:46:51 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:07:58 AM

Amostra: AG1.3



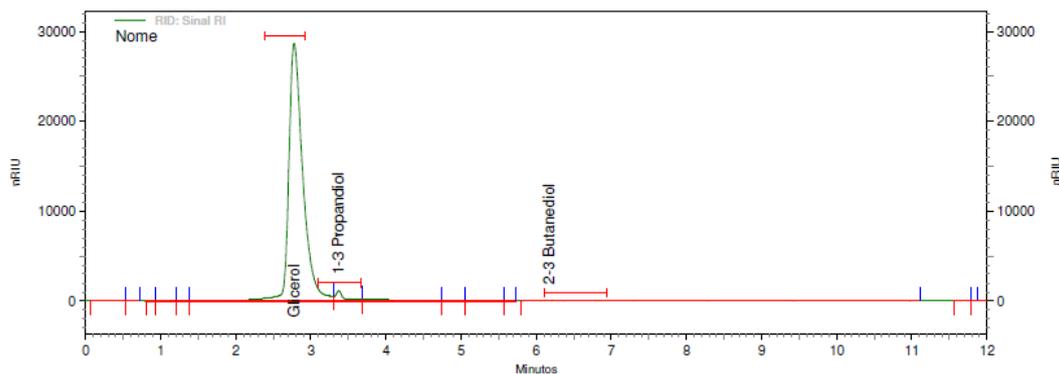
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.785	38442327	2.2288
2-3 Butanediol	6.170	846128	0.0513

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\034.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 7:02:09 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:08:13 AM

Amostra: AG3.1



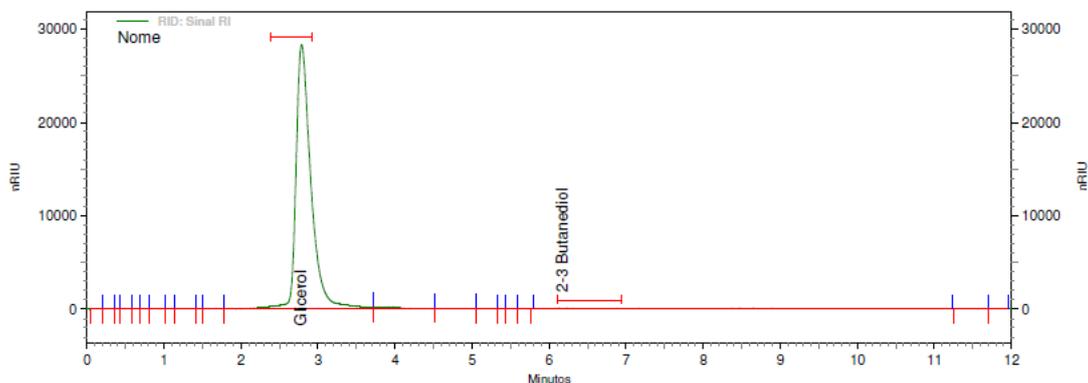
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.778	37431530	2.1702
1-3 Propandiol	3.370	960062	0.0704
2-3 Butanediol	6.170	810965	0.0492

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\035.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 7:17:27 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:08:29 AM

Amostra: AG3.2



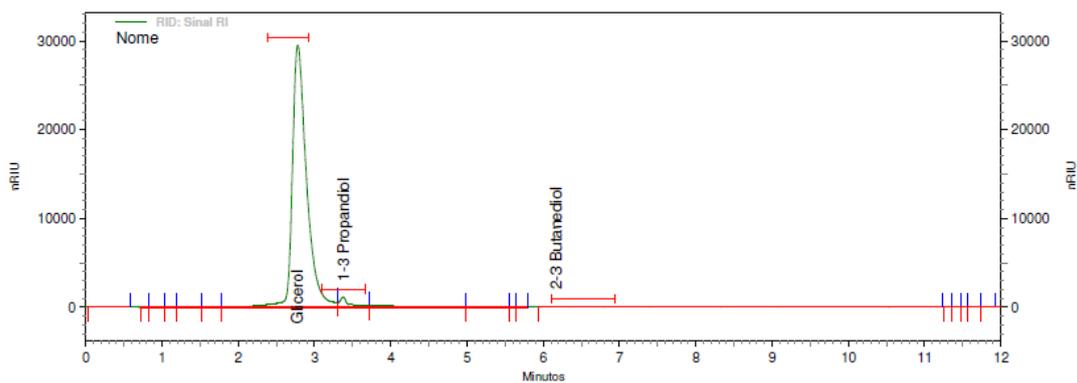
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.785	38681941	2.2427
2-3 Butanediol	6.170	899010	0.0545

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\036.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 7:32:45 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:08:43 AM

Amostra: AG3.3



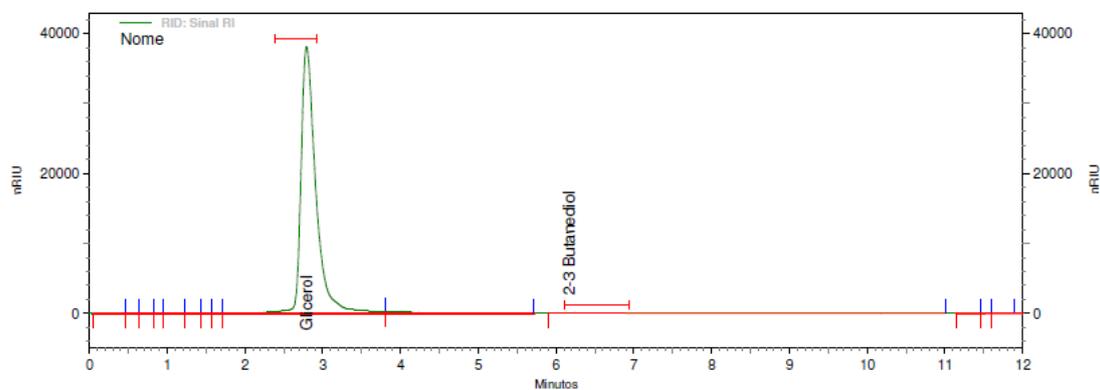
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.778	38505989	2.2325
1-3 Propandiol	3.377	1043431	0.0766
2-3 Butanediol	6.177	872468	0.0529

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\037.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 7:48:03 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:09:15 AM

Amostra: AG5.1



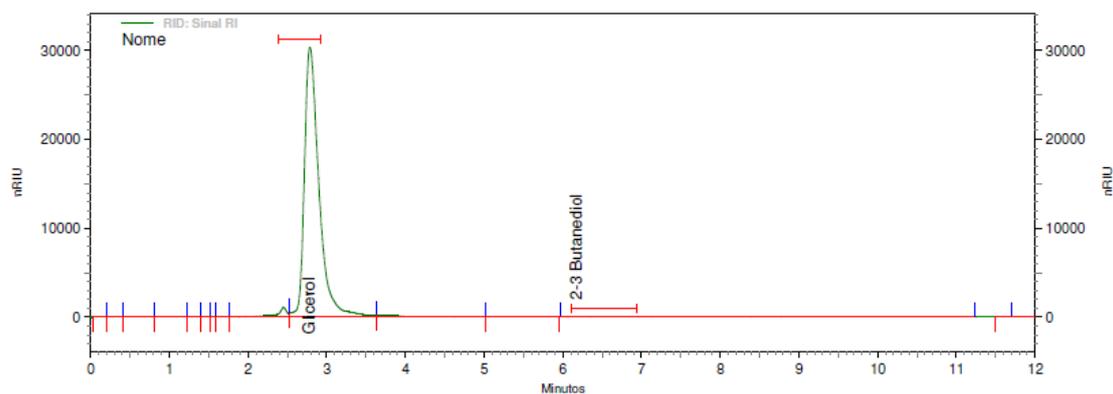
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.792	51191286	2.9680
2-3 Butanediol	6.177	1037708	0.0629

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\038.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 8:03:20 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:09:28 AM

Amostra: AG5.2



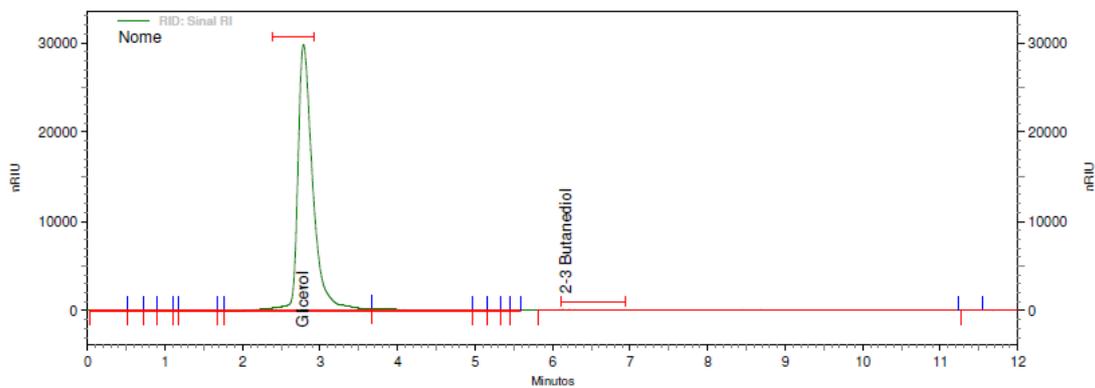
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.785	39290252	2.2780
2-3 Butanediol	6.170	458067	0.0278

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\039.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 8:18:37 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:09:42 AM

Amostra: AG5.3



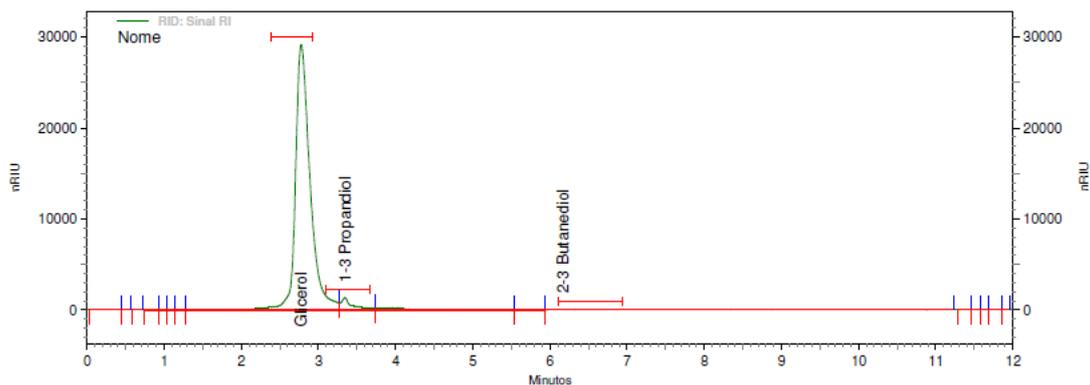
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.785	40292216	2.3361
2-3 Butanediol	6.170	772705	0.0469

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\040.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 8:33:58 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:09:55 AM

Amostra: AG6.1



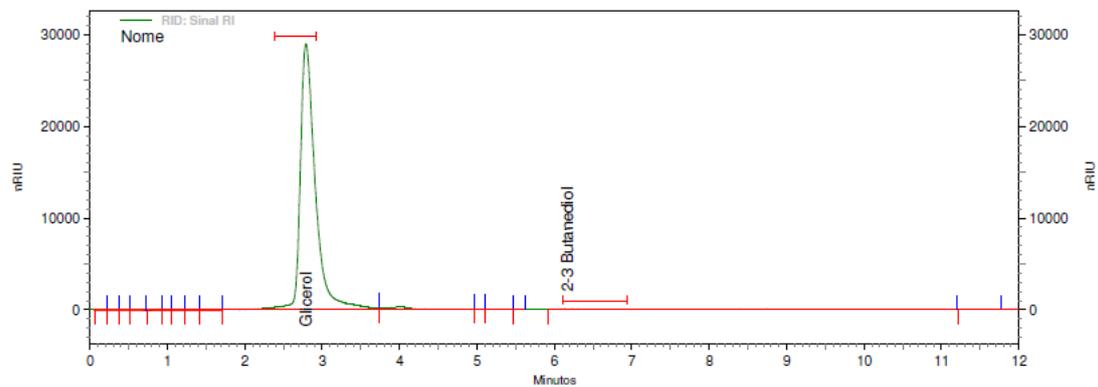
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.778	38670133	2.2421
1-3 Propandiol	3.341	1411809	0.1036
2-3 Butanediol	6.170	520280	0.0315

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\041.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 8:49:16 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:10:15 AM

Amostra: AG6.2



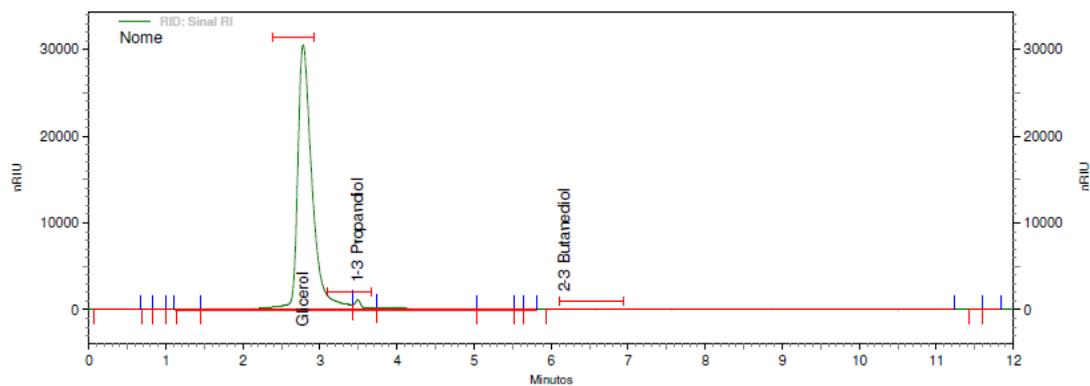
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.792	39555689	2.2934
2-3 Butanediol	6.177	660353	0.0400

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\042.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 9:04:33 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:10:28 AM

Amostra: AG6.3



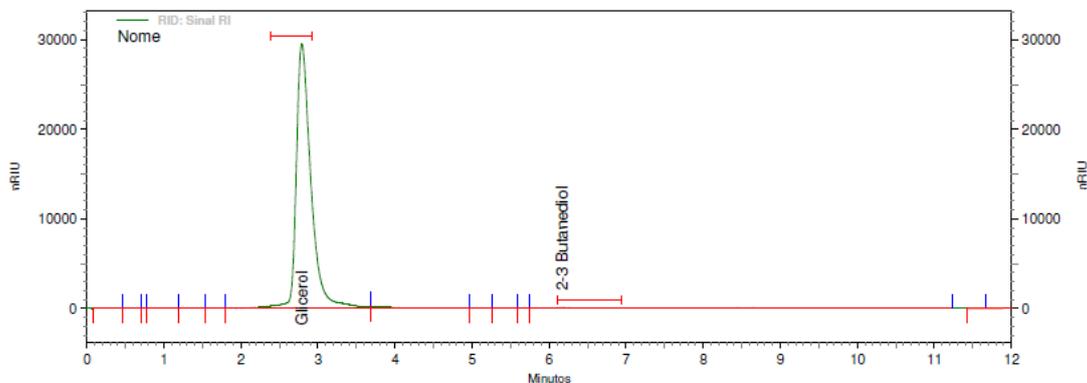
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.778	40098336	2.3249
1-3 Propandiol	3.494	883285	0.0648
2-3 Butanediol	6.177	586102	0.0355

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\043.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 9:19:48 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:10:43 AM

Amostra: AG7.1



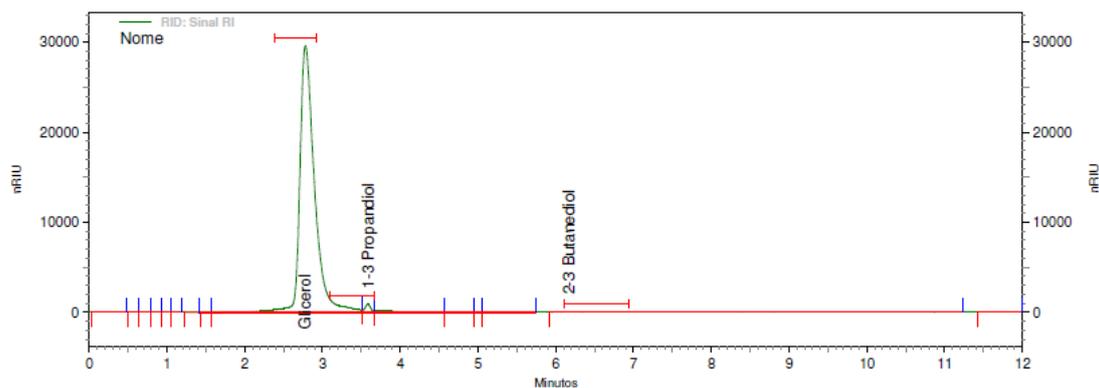
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.792	39533242	2.2921
2-3 Butanediol	6.177	688837	0.0418

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\044.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucares\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 9:35:06 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:10:59 AM

Amostra: AG7.2



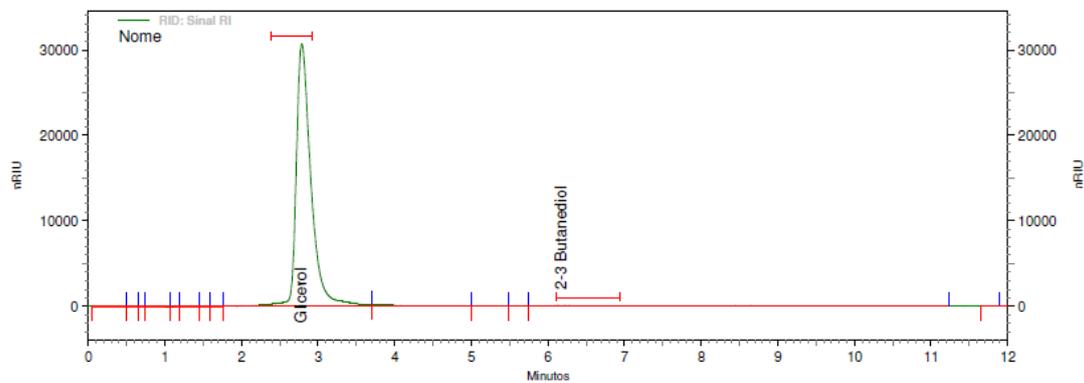
RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.778	38928229	2.2570
1-3 Propandiol	3.582	475231	0.0349
2-3 Butanediol	6.177	555231	0.0337

## Relatório de Padrão Externo (ESTD)

Arquivo: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucars\_Transgenomic\Dados\José Daniel\08 Dez 15\045.dat  
 Método: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Açucars\_Transgenomic\Método\08 Mar 15\Hamilton PRP-X300 Nov 15.met  
 Aquisição: 12/8/2015 9:50:24 PM  
 Impressão: 12/9/2015 9:11:15 AM

Amostra: 7.3



RID: Sinal RI Resultados

Nome	Tempo de retenção	Área	Concentração (g/L)
Glicerol	2.785	41438556	2.4026
2-3 Butanediol	6.170	804663	0.0488

---

**ANEXO IV – Regras de Submissão**

---

**REVISTA ACTA TECNOLÓGICA:** Revista a receber submissão do artigo 1 “BODIESEL E MEIO AMBIENTE: Utilização biotecnológica de micro-organismos na bioconversão do glicerol em compostos de valor agregado”

**Diretrizes para Autores**

Os trabalhos científicos, notas técnicas e revisões, em idioma português, devem ser originais e submetidos em arquivo.doc, identificado, juntamente com uma carta de encaminhamento, que deve conter e-mail, endereço e telefone do autor responsável e área selecionada para publicação (Educação, Ciência e tecnologia de alimentos, Agronomia, Zootecnia, Ciências Biológicas, Exatas e da Terra). Nesta carta, o autor deve declarar que o artigo ainda não foi publicado em outra revista científica nacional ou internacional, nem tampouco está sendo submetido à outra revista simultaneamente.

Recebido o artigo, este será revisado de acordo com as normas solicitadas pela revista. Os dados, opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, bem como a exatidão das referências bibliográficas, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso pela Acta Tecnológica. Entretanto, o editor, com assistência dos assessores científicos, reservar-se-á o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

Uma vez recebida à versão corrigida do trabalho se procederá ao correspondente registro de entrada e início da tramitação do trabalho.

**Informações Gerais**

Os trabalhos deverão ser apresentados digitados em linhas numeradas em espaço simples (exceto Resumo, Abstract e Tabelas, que devem ser elaborados em espaço 1,5) e com margens superior, inferior, esquerda e direita de 2,5; 2,5; 3,5; e 2,5 cm, respectivamente. Utilizando fonte Times New Roman 14 para o título e 12 para o texto, as figuras e tabelas devem ser inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos. Para Referências, Resumo e Abstract, serão iniciados páginas novas, mesmo que haja espaço na anterior; as páginas devem ser numeradas seguidamente; as páginas com texto não deverão exceder um total de 20 de páginas, incluindo as ilustrações (figuras e tabelas), que equivalem a aproximadamente oito páginas, na configuração final do trabalho.

A digitação do trabalho deverá ser feita utilizando o editor de texto Word (DOC ou RTF) e os gráficos em programas compatíveis com o Windows, como o Excel, e formato de imagens: Figuras (GIF) e Fotos (JPEG). A redação dos trabalhos deverá apresentar concisão, objetividade e clareza, com linguagem no passado impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito, após a palavra ou frase que motivou a nota; a numeração será uma só e em números contínuos; as notas serão colocadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todas as tabelas e figuras deverão ser mencionadas no texto; no Resumo e no Abstract não serão permitidos parágrafos, bem como a apresentação de dados em colunas ou em quadros e a inclusão de citações bibliográficas.

O(s) nome(s) do(s) autor(s) deverá(ão) ser mencionado(s) por extenso logo abaixo do título. No rodapé da primeira página, através de chamadas apropriadas, deverá ser feita menção ao patrocinador e informações sobre o autor. Siglas e abreviaturas dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso.

### **Submissão dos Trabalhos**

Os trabalhos deverão ser encaminhados por meio do portal da Revista Acta Tecnológica. Para isto, deverá ser efetuado o cadastro como autor.

### **Estrutura dos Artigos Científicos**

Os artigos científicos deverão ser organizados em Título Resumido (Colocado centralizado no início da primeira página e em negrito), Autores, Resumo, Termos para indexação (no máximo cinco que não sejam citadas no título), Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos (Metodologia), Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimento (se houver) e Referências Bibliográficas. Os parágrafos devem iniciar a 1,0 cm da margem esquerda.

### **Estrutura da Revisão Bibliográfica**

A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Termos para indexação; Abstract; Index terms; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências Bibliográficas. A organização do texto é livre.

### **Estrutura da Nota Técnica ou comunicação**

Terão sua estrutura adaptada ao indicado para os artigos, contendo os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Termos para indexação; Abstract; Index terms; Texto [sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão (podendo conter tabelas ou figuras)]; Fontes de aquisição se houver; Referências Bibliográficas.

Agradecimento(s)

Deve iniciar logo após as Conclusões (facultativo).

Abreviaturas, símbolos e unidades

Abreviaturas, símbolos e unidades devem ser listados conforme exemplos abaixo:

- Usar 58%, e não 58 % (sem espaço entre o no e %)
- Usar 60 kg, e não 60Kg (com espaço entre o no e kg, que deve vir em minúsculo)
- Usar 101,23 e não 101.23 (usar vírgula, e não ponto)
- Usar 52 mL, e não 42 ml (litro deve vir em L maiúsculo, conforme padronização internacional)
- Usar 25oC, e não 25 oC (sem espaço entre o no e oC)
- Usar (P<0,05), e não (P < 0,05) (sem espaço antes e depois do <)
- Usar 21,35±8,58, e não 21,35 ± 8,58 (sem espaço antes e depois do ±)
- Usar r<sup>2</sup> = 0,97, e não r<sup>2</sup>=0,97 (com espaço antes e depois do =)
- Usar asterisco nas tabelas apenas para probabilidade de P: (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001)

### **Referências Bibliográficas**

Deve vir após parte final do artigo, em ordem alfabética, a lista dos autores e das publicações conforme a NBR 6023 da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), com adaptações para a revista Acta Tecnológica. Digitá-las em espaço simples, alinhamento justificado sem recuo. Em obras com dois e três autores, mencionam-se os autores separados por vírgula e, naquelas com mais de três autores, os três primeiros vêm seguidos de et al. As iniciais dos autores não podem conter espaços. O termo et al. não deve ser italizado nem precedido de vírgula.

Livro de um só autor

BENJAMIM,W. Rua de mão única .São Paulo: Brasiliense, 1986. 85p.

Van SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

Livro de dois autores

SANTOS, L.; CAMARGO, R. A floresta negra. Campinas: Polux, 1997. 124 p.

Livro de três autores

NORTON, P.; AIKEN, P.A.; WILTON, R.B. A bíblia do programador. Tradução de Geraldo Costa Filho. Rio de Janeiro: Campos, 1994. 245p.

Livro de mais de três autores

CASTEL, M.P.; SARTORI, L.; BENTO, M. et al. Novas perspectivas críticas em educação. Porto Alegre: Arte medicas, 1996. 102p.

Capítulos de Livros

BARBIER, R. et al. A escuta sensível na abordagem transversal. In: BARBOSA, J.H. (Org.). Multireferencialidade nas ciências e na educação. São Carlos: Ed.UFSCar, 1998. p.168-179.

LINDHAL, I.L. Nutrición y alimentación de las cabras. In: CHURCH, D.C. (Ed.) Fisiología digestiva y nutrición de los ruminantes. 3.ed. Zaragoza: Acríbia, 1994. p.425-434.

Artigos de Periódicos

MOTA, K.M.S. A linguagem da vida, a linguagem da escola: inclusão ou exclusão? Uma breve reflexão lingüística para não lingüística. Revista da FAEBA, Salvador, v.11, n.17, p.13-26, 2002.

RESTLE, J.; VAZ, R.Z.; ALVES FILHO, D.C. et al. Desempenho de vacas Charolês e Nelore desterneiradas aos três ou sete meses. Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.2, p.499-507, 2001.

LAUDARES, J.B.; TOMASI, A. O técnico de escolaridade média no setor Produtivo: seu novo lugar e suas competências. Educação e Sociedade, v.24, n.85, p.1237-1256, 2003.

Artigo de Periódicos ( Formato eletrônico ):

TRINDADE, J.M.B. O abandono de crianças ou a navegação do óbvio. Revista Brasileira de Historiador. São Paulo, SP, v.19, n.37, 1999. Disponível em:<http://www.scielo.br>. Acesso 14 agos. 2000.

NGUYEN, T.H.N., NGUYEN, V.H., NGUYEN, T.N. et al. Effect of drenching with cooking oil on performance of local yellow cattle fed rice straw and cassava

foliage. *Livestock Research for Rural Development*, v.15, n.7, 2003. Disponível em: <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd15/7/nhan157.htm>> Acesso em: 28/07/2005.

#### Livros em formato eletrônico

SÃO PAULO (Estado). *Entendendo o meio ambiente*. São Paulo, 1999. v.3. Disponível em <<http://www.bdf.org.br/sma/entendendo/atual/htm>>. Acesso em 19 out. 2003.

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. *Anais eletrônicos...* Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996. Disponível em: <<http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm>> Acesso em: 21 jan. 1997.

#### Artigo de jornais

SOUZA, M. Falta de qualidade no magistério é a falha mais séria no ensino privado público. *O Globo*, Rio de Janeiro, 06 dez., 2001. Caderno 2, p.4.

#### Decreto, Leis

BRASIL. Decreto nº 89.271, de 4 de janeiro de 1984. Dispõe sobre documentos para despacho de aeronave em serviço internacional. *Lex: Coletânea de legislação e jurisprudência*. São Paulo, v.48, n. 5, p. 3-4, jan./mar., 1º trim., 1984. *Legislação Federal e marginalia*.

BRASIL. Medida provisória nº 1.569-9, de 11 de dezembro de 1997. Estabelece multa em operações de importação, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 1997. Seção 1. p.95.*

#### Dissertações e teses

COSTA, J.M.B. *Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)*. 1986. 132p. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1986.

SILVIA, M.C.da. *Fracasso escolar. Uma perspectiva em questão*. 1996. 160p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Educação da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

CASTRO, F.B. *Avaliação do processo de digestão do bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado em bovinos*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de

Queiroz, 1989. 123p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) -Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1989.

#### Trabalhos publicados em Congresso

LIMA, M.J.R. Professor, objeto da trama da ignorância: análise de discursos de autoridades brasileiras, no império e na república. In. ENCONTRO DE PESQUISA EDUCACIONAL DO NORDESTE: HISTORIA DA EDUCAÇÃO, 13., 1997. Natal:Anais... Natal: EDUFRN, 1997. p. 95-107.

CASACCIA, J.L.; PIRES, C.C.; RESTLE, J. Confinamento de bovinos inteiros ou castrados de diferentes grupos genéticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30., 1993, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p.468.

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de Panicum maximum em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [1999] (CD-ROM).

#### Obras de responsabilidade de uma entidade coletiva

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10520: Informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY AOAC. Official methods of analysis. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL – AFRC. Energy and protein requirements of ruminants. Wallingford, UK. CAB International, 1993, 159p

### **Condições para submissão**

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".
2. O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.
3. URLs para as referências foram informadas quando possível.

4. O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na página Sobre a Revista.
6. Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em [Assegurando a avaliação pelos pares cega](#) foram seguidas.

**BIOSCIENCE JOURNAL:** Revista a receber submissão do artigo 2  
“BIOCONVERSÃO DE GLICEROL EM 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL  
POR RIZOBACTÉRIAS DE *Lactuca sativa*”

#### AUTHOR GUIDELINES

The essay must strive for clarity, brevity and conciseness. The text should be typed in Times New Roman, size 12, double space and with a margin of at least 2 cm. All lines must be numbered. Papers should be submitted without the identification of the authors. The authors' names, title and address of work must be presented to metadata submission and in the cover letter. Figures and tables must be inserted in the text, as close as possible to where cited.

The article will be sent to three (03) reviewers in the area in question, in the shortest possible time, without identifying the authors and will be considered as approved upon 02 favorable opinions.

Only papers written in English will be accepted.

The journal reserves the right to make changes as to rules, spelling and grammar in the original, in order to maintain the standard patterns of the language, while respecting the style of the authors. The final proofs will be sent to the authors, together with the payment slip for publication.

Papers which are published become the property of the Bioscience Journal, having their reprint, in whole or in part, subject to the express permission of the journal Editor. The original source of publication must be assigned.

No reprints will be provided. The articles will be available for printing in PDF format on the journal website.

A publication fee will be charged to the amount of R\$ 40.00 (forty reais) per published page of the approved papers to national authors and \$ 30 (thirty US dollars) for foreign authors. (Form of payment will be informed later).

Once the article has been reviewed and approved, the journal will categorize the contributions according to the following categories:

**1. Original Articles** - Articles that present a contribution which is entirely new to knowledge and allow other researchers, based on the written text, to judge the conclusions, check the accuracy of the analyzes and deductions of the author and repeat

the investigation if they so wish. The articles must contain: Title, Summary (200 to 400 words), Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion (or Results and Discussion) and Conclusion (optional), Acknowledgements (if applicable). They must also contain: Title, Abstract (200 to 400 words) and key words in Portuguese and References. The papers must not exceed 20 pages (including text, references, figures, and annexes).

**2. Review Articles** - Articles that present comprehensive and updated review of a subject of interest from the scientific community and which offer significant contribution to the area of knowledge under discussion. The articles must contain: Title, Summary (200 to 400 words), Keywords, Introduction, Development, Conclusion, Acknowledgements (if applicable). They must also contain: Title, Abstract (200 to 400 words) and keywords in Portuguese and References. The papers must not exceed 30 pages (including text, references, figures and any annexes). In this paper/work category only contributions made at the invitation of the editors (General or Associate) will be accepted for submission.

**3. Case report (s)** - Predominantly clinical articles, of high relevance and which are current, with original reports from clinical and basic areas. The articles must contain: Title, Summary (200 to 400 words), Keywords, Introduction, Case Report, Discussion, Conclusion (optional) and Acknowledgements (if necessary). They must also contain: Title, Abstract (200 to 400 words) and Keywords in Portuguese and References. The papers must not exceed 10 pages (including text, references, figures and any annexes).

**4. Communication** – Non original article, demonstrating the experience of a group or a service, preferably covering teaching, research, health policy and professional practice. Or an article to report the results (partial or not) of work that offers relevant information to scientific knowledge, but which does not allow for firm conclusions. It must contain: Title, Summary (200 to 400 words), Keywords, Introduction, Contents and Acknowledgements (if necessary). It must also contain: Title, Abstract (200 to 400 words) and Keywords in Portuguese and References. The papers must not exceed 10 pages, including attachments.

## **Presentation of Papers**

Format: All papers/collaborations must be submitted through the Electronic System for Journal Publishing - SEER, Address: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions#online> [Submissions](#)

The text must be saved in RTF (Rich Text Format) extension or Microsoft Word (2003) format. The metadata must be filled out with the Paper/Work title, name (s) of author (s), last academic degree, work institution, postal address, telephone, fax and email.

The text will be cordially written with intercalation of tables and figures, already inserted in the text, with the minimum amount required for its understanding.

As a measure of secrecy the body of the paper must not include the authors' names, which must be sent separately, with personal data (title, mailing address, email address and institution to which he/she is connected).

**Paper title:** The title must be brief and sufficiently specific and descriptive, containing the keywords that represent the contents of the text separated by colon, both accompanied by their translation into Portuguese.

**Abstract:** An informative summary must be prepared with about 200 to 400 words, including objective, method, results, conclusion, accompanied by its translation into Portuguese. Both must have 800 words at most.

**Keywords:** The keywords must not repeat words in the title, the scientific name of the species studied must be included. Words should be separated by a colon and begin with a capital letter. Authors must submit 3-6 terms, taking into consideration that a term may be composed of two or more words.

**Acknowledgements:** Acknowledgements as to help received in the preparation of the paper must be mentioned at the end of the article, before the references.

**Notes:** The notes contained in the article must be indicated with an asterisk immediately after the sentence to which they refer. The notes must be at the bottom of the corresponding page. Exceptionally, numbers may be adopted for the notes together with

asterisks on the same page. In which case, the notes with asterisks precede the notes with numbers, regardless of the order of these notes in the text.

**Appendices:** Appendices can be used in the case of extensive lists, statistics and other supporting elements.

**Figures and Tables:** Clear photos (black and white or in color), graphs and tables in black and white (strictly essential for clarity of the text) will be accepted, and must be marked in the text by their order number, in the places where they must be inserted. If the illustrations submitted have already been published, mention the source. (See rules for preparation of figures, in the next section).

Manuscripts, even if they present scientific relevance and are methodologically correct, may be refused if they are not properly organization and if they are outside the norms of the Bioscience Journal.

## **GUIDELINES FOR THE PREPARATION OF FIGURES**

1. Figures may be made in software depending on the authors' preference (Excel, Sigma Plot, etc.) They must be inserted and sent in TIFF or JPG format with a minimum resolution of 300 dpi.
2. The figures must have a maximum width of 8.0 cm or 16.0 cm.
3. The titles and the x and y axes scale must be in Times New Roman size 11. The axis lines and other lines (e.g., regression curves) must have a thickness of 0.3mm. All information contained inside the figure (e.g., equations, captions) must be in Times New Roman size 10 or at least 8. Right hand and top edges in graphs are not necessary.
4. All figures must be conveniently inserted into the text after being mentioned, consecutively and in Arabic numerals. The figures should be inserted in the text by means of the "Insert → Image/Figure → File" command.
5. Figures may be made up of multiple graphs, both horizontal and vertical, respecting the maximum width of 16.0cm and 8.0cm, respectively. When dealing with figures of

multiple graphs, the same must be identified by letters (A, B, C, D) in capital letters in brackets, source Times New Roman size 11. Papers that have been consulted and cited in the text are the responsibility of the author.

Information coming from personal communication, papers in progress and unpublished papers must not be included in the reference list, but indicated in a footnote on the page in which they are cited.

**References:** NBR 6023/2002. The accuracy and appropriateness of the references to papers that have been consulted and cited in the text are the responsibility of the author. Information coming from personal communication, papers in progress and unpublished papers must not be included in the reference list, but indicated in a footnote on the page where they are cited.

The references included at the end of each article must be written on separate pages from the main text, in alphabetical order according to the ABNT NBR - 6023, August 2002 norms. All authors must be mentioned in the list of references at the end of the article. The use of the expression et al is not allowed.

**Observe the reference examples below:**

**The Book as a whole:**

GRAZIANI, Mario. Cirurgia buco-maxilo-facial. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. 676 p.

**Book chapter without proper authorship:**

PERRINS, C. M. Social systems. In: \_\_\_\_\_. Avian ecology. Glasgow: Blackie, 1983. chapter. 2, p. 7-32.

**Book chapter with proper authorship:**

GETTY, R. The Gross and microscopic occurrence and distribution of spontaneous atherosclerosis in the arteries of swine. In: ROBERT JUNIOR.; A., ATRAUSS, R. (Ed.). Comparative atherosclerosis. New York: Harper & Row, 1965. p. 11-20.

**Monographs, dissertations and theses:**

CORRALES, Edith Alba Lua Segovia. Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. 1997.84 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.

**Papers presented at events: Conferences, Seminars, Meetings ...**

NOVIS, Jorge Augusto. Extensão das ações de saúde na área rural. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 7., 1980, Brasília. Anais... Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1980. p. 37-43.

**Journal articles:**

COHEN, B. I.; CONDOS, S.; DEUTSCH, A. S.; MUSIKANT, B. L. La fuerza de fractura de tres tipos de materiales para el muñon en combinacion com tres espigas endodontiacales distintas. R. Cent. C. Biomed. Univ. Fed. Uberlândia, Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 69-76, dez. 1997.

Observation: As for the title of the journals, a single standard must be adopted. In the list of references all titles of journals must be presented abbreviated or in full, and in bold.

**Note:** As for electronic documents, the normal reference must be made, with information as to the description on the medium or support being added at the end.

Example :

**Chapter of book with proper authorship available on CD - ROM :**

FAUSTO, A. I. da F.; CERVINI, R. (Org.). O trabalho e a rua. In: BIBLIOTECA nacional dos direitos da criança. Porto Alegre: Associação dos Juizes do Rio Grande do Sul, 1995. 1 CD-ROM.

**Periodical article in electronic media:**

ROCHA-BARREIRA, C. A. Caracterização da gônada e ciclo reprodutivo da *Collisella* subrugosa (Gastropoda: Acmaeidae) no Nordeste do Brasil. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 62, n. 4b, nov. 2002. Disponível em: Acesso em: 20 abr. 2003.

Recommendations: It is recommended that the ABNT rules concerning submission of articles in periodicals (NBR 6023/2002), presentation of citations in documents (NBR 10.520/2002), presentation of original papers (NBR 12256), norm for dating (NBR 5892), progressive numbering of the sections of a document (6024/2003) and abstracts (NBR 6028 /2003), as well as the norm for IBGE tabular presentation, be observed.

### **Transfer of Copyright:**

All persons listed as authors must sign the Transfer of Copyright:

“I declare that, in the case of acceptance of the article, the Bioscience Journal shall be the owner of the copyrights relating to same, which will become the sole property of the Journal, prohibiting any reproduction, in whole or in part, in any other place or means of publication, printed or electronic, without the prior and required authorization being requested, and if obtained, will include an appropriate acknowledgment to the Journal”.

Signature (s) of author (s) Date \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_

Opinions expressed by authors are their exclusive responsibility.

### **Statement of Responsibility:**

All persons listed as authors must sign the responsibility statement in the following terms:

I certify that I participated in the conception of the paper to take public my responsibility for its content, not omitting any affiliations or financial agreements between authors and companies that may be interested in publishing this article;

- I certify that the manuscript is original and that the paper, in part or in whole, or any other paper with substantially similar content of my authorship, was not sent to another journal and will not be sent, while its publication is being considered by the Bioscience Journal, be it in printed or electronic format.

### **Address for submission of papers:**

<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions#onlineSubmissions>

#### SUBMISSION PREPARATION CHECKLIST

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

1. Only papers written in English will be accepted. The contribution is original and unpublished and is not being evaluated for publication by any other journal, failing that, justify in "Comments to the Editor".
2. The files for submission are in Microsoft Word (2003), RTF or WordPerfect format.
3. The text is double-spaced, using a 12-point font; uses italics, rather than underlining (except with URL addresses), with figures and tables inserted in the text and not at the end.
4. The identification of authorship of this paper was removed from the file (Word 2003) and the option Properties in Word, thus ensuring the confidentiality of the journal. The text meets the formatting standards of the journal cited in "Guidelines for authors" in the "About" section
5. At the moment of online submission, the main author should send a letter signed by all authors, requesting the submission of the article and possible publication, exclusively by this journal. The letter should be scanned and transferred in "additional documents".
6. All "URL" addresses in the text (e.g.: <http://pkp.ubc.ca>) are active.
7. The article is being submitted correctly to the corresponding section according to its reference area.
8. Manuscripts, even those presenting scientific relevance and being methodologically correct, may be refused if presented in a disorganized manner and outside the norms of the Bioscience Journal. Well written manuscripts and those presented in accordance with the standards are reviewed faster and also require less effort from reviewers.
9. A publication fee will be charged to the amount of R\$ 40.00 (forty reais) per published page, for the approved papers. (Form of payment will be informed later).

10. All of the items above are basic requirements for the submission of an article and, if not according to the standards of the journal, or if the metadata are not filled out correctly, that particular article WILL NOT be considered for review.

#### COPYRIGHT NOTICE

The copyright for articles published in this journal belong to the authors, with first publication rights granted to the journal. In virtue of their appearance in this journal of open access, the articles are free to use, with proper attribution, in educational and non-commercial applications.

#### PRIVACY STATEMENT

The names and email addresses entered in this site will be used exclusively for the purposes of the journal and are not available for any other purpose.

#### AUTHOR FEES

This journal charges the following author fees.

Authors	Fees:	40.00	(BRL)
---------	-------	-------	-------

A publication fee will be charged to the amount of R\$ 40.00 (forty reais) per published page of the approved papers to national authors and \$ 30 (thirty US dollars) for foreign authors. (Form of payment will be informed later).