

Microrganismos para produção de químicos a partir da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel

A produção de biocombustíveis e produtos químicos a partir de matérias-primas renováveis é necessária para atingir a demanda de energia em um mundo onde os combustíveis fósseis estão ficando cada vez mais escassos e caros (HANSEN et al., 2005). Biodiesel é um combustível alternativo que reduz a produção dos gases do efeito estufa e o seu uso se tornou obrigatório em vários países do mundo (O'CONNOR, 2011). O biodiesel é produzido principalmente pela transesterificação de gorduras e óleos por um álcool (metanol ou etanol), na presença de um catalisador, para a obtenção de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, os quais são utilizados como biocombustível. As principais matérias-primas para a obtenção do biodiesel em todo o mundo são girassol, soja, colza e palmáceas, sendo a proporção de uso de cada substrato é variável em cada região. No Brasil, por exemplo, 80% do biodiesel produzido em 2010 foi obtido a partir de óleo de soja (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2011). Apesar das várias vantagens do biodiesel, o seu processo de produção pode ser melhorado pela redução de custos de produção e pelo estabelecimento de rotas para o aproveitamento de coprodutos.

A produção de biodiesel aumentou consideravelmente nos últimos anos (Figura 1). A Europa ainda é o maior produtor de biodiesel, enquanto o Brasil foi o país que mostrou o maior aumento na taxa de produção nos últimos anos, de 736 m³ em 2005 para 2.400.000 m³ em 2010. Três tipos principais de coprodutos – tortas e farelos e glicerina bruta – estão aumentando simultaneamente com o

aumento da produção de biodiesel. As tortas, que são geradas pela prensagem das oleaginosas para extração de óleo, e os farelos são comumente utilizados como alimento para animais ou como fertilizantes, consequentemente, agregando valor à cadeia produtiva. Por outro lado, o excesso de glicerina bruta produzida na indústria de biodiesel está levando a diminuição dos preços da glicerina nos mercados internacionais e fazendo com que

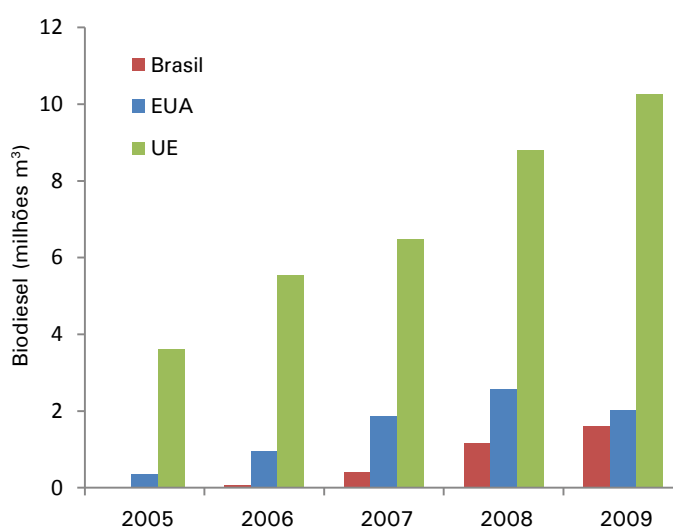


Figura 1. Produção de biodiesel no Brasil (vermelho), EUA (azul) e União Européia (verde) de 2005 a 2009.

Fontes: Brasil: Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2010. ANP; EUA: EIA Annual Energy Review, <http://www.afdc.energy.gov/afdc/data/fuels.html>; EU: EU Biodiesel Board, <http://www.ebb-eu.org/stats.php>

Autor

João Ricardo Moreira de Almeida
Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, Melhoramento Genético de Microrganismos, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, joao.almeida@embrapa.br

esta parte a ser considerada um resíduo, ao invés de um coproduto (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). A produção de glicerina bruta segue o aumento da produção de biodiesel, já que a estequiometria da reação dita que para cada 10 toneladas de biodiesel, 1 tonelada de glicerina bruta é formada. Assim, o desenvolvimento de biorefinarias com base em glicerina bruta deve favorecer a economia da indústria de biodiesel, reduzindo a produção e eliminação de resíduos no meio ambiente e aumentando a produção de coprodutos.

Produção de Químicos pela Fermentação Microbiana de Glicerina

O desenvolvimento de biorefinarias é baseado na integração de processos de conversão de biomassa para a produção de combustíveis, energia e produtos químicos. Nesse contexto, a utilização da glicerina gerada na indústria de biodiesel oferece uma excelente oportunidade para o desenvolvimento de biorefinarias. Isto porque o excesso de glicerina bruta produzida pela indústria de biodiesel pode ser utilizada em processos para a formação de produtos químicos de alto valor agregado, evitando assim a eliminação de resíduos e contribuindo para a economia do processo. Nesse sentido, a valorização da glicerina através da produção de metabólitos microbianos de alto valor agregado via processos fermentativos tem sido substancialmente avaliada (Tabela 1)

Devido à natureza reduzida da molécula de glicerina, os microrganismos são capazes de convertê-la a uma série de metabólitos, com rendimentos semelhantes aos obtidos com o metabolismo de açúcares. Leveduras e fungos filamentosos têm sido avaliados, principalmente sob condições aeróbicas, para a produção de ácidos orgânicos, tais como ácidos succínico e oxálico. Por outro lado, a produção de metabólitos por bactérias, principalmente as das famílias *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Klebsiella* e *Enterobacter* tem sido avaliada sob condições anaeróbicas. Estas bactérias foram avaliadas para a produção de diferentes produtos químicos, incluindo 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, butanol, e outros. Em um nível intermediário, *Escherichia coli* tem sido avaliada especialmente em condições microaeróbicas para a obtenção de vários produtos

químicos. Na Tabela 1 são apresentados alguns exemplos de produtos químicos produzidos por bactérias e leveduras através da fermentação de glicerina em escala laboratorial. É interessante notar que vários químicos com potencial de serem produzidos pela fermentação de glicerina bruta possuem mercado consolidado de milhares de toneladas por ano e são atualmente produzidos a partir de petróleo ou por fermentação microbiana de açúcares (Tabela 2).

Apesar dos exemplos descritos na literatura, a fermentação de glicerina para a produção de químicos só tem sido avaliada em escala laboratorial. Os estudos ainda se encontram em estado inicial e poucas linhagens microbianas têm sido avaliadas (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). Dessa forma, a identificação de novas linhagens microbianas capazes de fermentar eficientemente glicerina bruta para a produção de químicos é altamente interessante. Tais microrganismos podem ser utilizados em processos fermentativos específicos ou ainda serem utilizados como fontes de vias metabólicas para processos de melhoramento genético de linhagens industriais já conhecidas.

Prospecção de Microrganismos

Os mais variados ambientes, tais como solos, material vegetal em decomposição em florestas, ambientes marinhos de água doce, resíduos agrícolas e industriais, ambientes de compostagem, ambientes extremos tais como fontes termais, ambiente antártico, ambientes altamente salinos, associações mutualistas entre organismos tais como rúmens de mamíferos herbívoros e sistema digestivo de insetos, têm sido prospectados para microrganismos voltados ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos (TOIVOLA et al., 1984; GUO et al., 2008; ALPER; STEPHANOPOULOS, 2009; GRAHAM et al., 2011). De fato, a bioprospecção de microrganismos tem se mostrado uma importante ferramenta para o desenvolvimento de processos fermentativos (ALPER; STEPHANOPOULOS, 2009). Novas linhagens microbianas capazes de, por exemplo, metabolizar açúcares específicos (TOIVOLA et al., 1984; DIEN et al., 1996), produzir antibióticos (GUO et al., 2008) e enzimas hidrolíticas (GRAHAM et al., 2011) continuam sendo identificadas. Esses

Tabela 1: Exemplos de produtos químicos obtidos a partir da fermentação de glicerina por bactérias e leveduras. Esses estudos foram selecionados por apresentarem os maiores rendimentos ou maior concentração final do produto dentre os encontrados na literatura.

Produto	Organismo	Modo de fermentação	Aerobiose	Rendimento (prod.glicerol ⁻¹)	Produtividade	Concentração do produto	Referência
1,3-propanodiol	<i>K. pneumoniae</i> LDH 526	Batelada alimentada	Aeróbico	0,52 mol.mol ⁻¹	2,13 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	102,6 g.L ⁻¹	(HONG et al., 2011)
	<i>C. butyricum</i> F2b	Batelada	Anaeróbico	0,53 g.g ⁻¹	1,05 g.L ⁻¹ .h ^{-1a}	47,1 g.L ⁻¹	(PAPANIKOLAOU et al., 2008)
	<i>E. coli</i> K12	Batelada alimentada	Anaeróbico	90,2 % ^b	2,61 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	104,4 g.L ⁻¹	(TANG et al., 2009)
Dihidroxiacetona	<i>G. oxydans</i> ZJB09112	Batelada alimentada	Aeróbico	88,7 % ^b	n.d	161,9 g.L ⁻¹	(Hu, et al., 2010)
	<i>G. frateurii</i> NBRC103465	Batelada alimentada	Aeróbico	0,76 g.g ⁻¹	0,81 g.L ⁻¹ .h ^{-1a}	136,5 g.L ^{-1c}	(HABE et al., 2009)
Ácido glicérico (GA)	<i>A. tropicalis</i> NBRC16470	Batelada alimentada	Aeróbico	0,46 g.g ⁻¹	0,71 g.L ⁻¹ .h ^{-1a}	101,8 g.L ^{-1d}	(HABE et al., 2010)
	<i>E. coli</i> SY 4	Batelada	Micro-aeróbico	85 % ^b	3.,3 mmol. L ⁻¹ .h ⁻¹	170 mmol	(DURNIN et al., 2009)
Butanol	<i>C. pasteurianum</i>	Batelada	Anaeróbico	0,36 g.g ⁻¹	n.d	5 g.L ⁻¹	(TACONI et al., 2009)
2,3-Butanodiol	<i>K. pneumoniae</i> G31	Batelada alimentada	Micro-aeróbico	0,36 mol.mol ⁻¹	0,18 g.g ⁻¹	49,2 g.L ⁻¹	(PETROV; PETROVA, 2009)
	<i>K. pneumoniae</i> G31	Batelada alimentada	Aeróbico	0,39 g.g ⁻¹	0,47 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	70,0 g.L ⁻¹	(PETROV; PETROVA, 2010)
Ácido láctico	<i>E. coli</i> AC-521	Batelada alimentada	Aeróbico	0,9 mol.mol ⁻¹	0,97 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	85,8 g.L ⁻¹	(HONG et al., 2009)
Ácido succínico	<i>engineered E. coli</i>	Batelada	Micro-aeróbico	0,69 g.g ⁻¹	~ 400 mg.g ⁻¹ .h ⁻¹	14 g.L ⁻¹	(BLANKSCHEN et al., 2010)
	<i>Y. lipolytica</i> Y-3314	Batelada	Limitação de O ₂	0,45 g.g ^{-1a}	n.d	45 g.L ⁻¹	(YUZBASHEV et al., 2010)
PHB (poli-hidroxi-butanato)	<i>E. coli</i> Arc2	Batelada alimentada	Micro-aeróbico	n.d	0,18 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	10,81 g.L ⁻¹	(NIKEL et al., 2008)
	<i>Z. denitrificans</i> MW1	Batelada alimentada	Aeróbico	0,25 g.g ⁻¹	1,09 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	54,3 g.L ⁻¹	(IBRAHIM; STEINBUCHER, 2009)
Ácido cítrico	<i>Y. lipolytica</i>	Repetição de Batelada	Aeróbico	0,77 g.g ⁻¹	0,85 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	124,2 g.L ⁻¹	(RYMOWICZ et al., 2010)

^a Calculado a partir dos dados apresentados; ^b Percentual do máximo teórico; ^c D-GA em excesso enantiomérico de 72% (ee); ^d D-GA em excesso enantiomérico de 99% (ee); n.d: não determinado

Tabela 2: Mercado de produtos químicos e processos de produção atuais.

Produto	Produção anual (ton)	Processo de produção	Referência
1,3-Propanodiol	130.000	Petroquímica	(NNDCC, 2008)
Etanol	61.000.000	Fermentação microbiana	(NNFCC, 2010)
n-Butanol	2.800.000	Petroquímica	(NNDCC, 2008)
2,3-Butanodiol	1.250.000	Petroquímica	(ICIS, 2011)
Ácido láctico	350.000	Fermentação microbiana	(NNDCC, 2011)
Ácido succínico	16 - 30.000	Petroquímica	(NNFCC, 2010)
Ácido cítrico	1.600.000*	Fermentação microbiana	(SAUER et al., 2008)

* valores estimados

microrganismos também têm sido utilizados como fonte de genes e vias metabólicas para modificação genética de linhagens industriais (ALPER; STEPHANOPOULOS, 2009).

Um grande desafio para a utilização da glicerina bruta para produção de químicos é a obtenção de linhagens microbianas eficientes no metabolismo da glicerina que também sejam tolerantes a compostos inibitórios, tais como sais e solventes orgânicos, presentes nessa glicerina. Esse desafio pode ser superado pela bioprospecção da diversidade microbiana de diferentes ambientes, já que linhagens dentro de uma mesma espécie respondem diferentemente a compostos inibitórios e/ou a diferentes fontes de carbono (MODIG et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009). Recentemente, técnicas de bioprospecção foram utilizadas para o isolamento de linhagens microbianas capazes de converter glicerina a etanol (CHOI et al., 2011) ou ácido láctico (HONG et al., 2009).

Na área de bioprospecção, o Brasil mostra grande potencial pela sua vasta extensão territorial e grande diversidade de biomas e ecossistemas, já que nos trópicos está concentrada a maior biodiversidade do planeta. Entretanto, a exploração da biodiversidade microbiana brasileira para a conversão de glicerina bruta a produtos químicos de interesse ainda não foi realizada. Deste modo, na Embrapa Agroenergia estão sendo desenvolvidos projetos que visam caracterizar microrganismos da diversidade brasileira para conversão de resíduos

agroindustriais, incluindo glicerina. Esta estratégia constitui uma oportunidade sem precedentes para descoberta de novos microrganismos fermentadores de glicerina de ambientes pouco explorados, para alavancar o setor do biodiesel no Brasil. A seleção e a avaliação de novas linhagens de bactérias e leveduras para aplicação em processos fermentativos permitirão avanços biotecnológicos na área de biodiesel e biorefinarias no país. Na indústria do biodiesel, por exemplo, novas linhagens contribuirão para o melhor aproveitamento da glicerina bruta e conseqüentemente melhoria da economia do processo, e para o estabelecimento de novas rotas microbianas de produção de químicos com alto valor agregado.

Referências

ALMEIDA, J. R. M.; KARHUMAA, K.; BENGTTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains with respect to anaerobic growth in non-detoxified lignocellulose hydrolysate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, p. 3674-3677, 2009.

ALPER, H.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, p. 715-723, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). **Boletim mensal de biodiesel**, jun. 2011.

- BLANKSCHEN, M. D.; CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol. **Metabolic Engineering**, Cambridge, v. 12, p. 409-419, 2010.
- CHOI, W. J.; HARTONO, M. R.; CHAN, W. H.; YEO, S. S. Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 89, p. 1255-1264, 2011.
- DIEN, B. S.; KURTZMAN, C. P.; SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Screening for L-arabinose fermenting yeasts. **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, v. 57-8, p. 233-242, 1996.
- DURNIN, G.; CLOMBURG, J.; YEATES, Z.; ALVAREZ, P. J. J.; ZYGOURAKIS, K.; CAMPBELL, P.; GONZALEZ, R. Understanding and Harnessing the Microaerobic Metabolism of Glycerol in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 103, p. 148-161, 2009.
- GRAHAM, J. E.; CLARK, M. E.; NADLER, D. C.; HUGGER, S.; CHOKHAWALA, H.A.; ROWLAND, S.E.; BLANCH, H.W.; CLARK, D. S.; ROBB, F.T. Identification and characterization of a multidomain hyperthermophilic cellulase from an archaeal enrichment. **Nature Communications 2**: Article number: 375, 2011.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 44, p. 136-142, 2008.
- HABE, H.; SHIMADA, Y.; FUKUOKA, T.; KITAMOTO, D.; ITAGAKI, M.; WATANABE, K.; YANAGISHITA, H.; YAKUSHI, T.; MATSUSHITA, K.; SAKAKI, K. Use of a *Gluconobacter frateurii* Mutant to Prevent Dihydroxyacetone Accumulation during Glyceric Acid Production from Glycerol. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 74, p. 2330-2332, 2010.
- HABE, H.; SHIMADA, Y.; YAKUSHI, T.; HATTORI, H.; ANO, Y.; FUKUOKA, T.; KITAMOTO, D.; ITAGAKI, M.; WATANABE, K.; YANAGISHITA, H.; MATSUSHITA, K.; SAKAKI, K. Microbial Production of Glyceric Acid, an Organic Acid That Can Be Mass Produced from Glycerol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7760-7766, 2009.
- HANSEN, A. C.; ZHANG, Q.; LYNE, P. W. Ethanol-diesel fuel blends -- a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 277-285, 2005.
- HONG, A. A.; CHENG, K. K.; PENG, F.; ZHOU, S.; SUN, Y.; LIU, C. M.; LIU, D. H. Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 84, p. 1576-1581, 2009.
- HONG, W. K.; KIM, C. H.; HEO, S. Y.; LUO, L. H.; OH, B. R.; RAIKAKHWADA, D.; SEO, J. W. 1,3-Propanediol production by engineered *Hansenula polymorpha* expressing *dha* genes from *Klebsiella pneumoniae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Garching, v. 34, p. 231-236, 2011.
- HU, Z. C.; LIU, Z. Q.; ZHENG, Y. G.; SHEN, Y. C. Production of 1,3-Dihydroxyacetone from Glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 20, p. 340-345, 2010.
- IBRAHIM, M. H. A.; STEINBUCHER, A. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production from Glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via High-Cell-Density Fed-Batch Fermentation and Simplified Solvent Extraction. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 75, p. 6222-6231, 2009.
- ICIS Butanediol price report. Disponível em: <<http://www.icis.com/>>; Acesso em: maio 2011.
- MODIG, T.; ALMEIDA, J. R. M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G. Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocellulose hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 100, p. 423-429, 2008.
- NIKEL, P. I.; PETTINARI, M. J.; GALVAGNO, M. A.; MENDEZ, B. S. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* *arcA* mutant in fed-batch microaerobic cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 1337-1343, 2008.
- NNDCC (2008) Biochemical Opportunities in the United Kingdom . Disponível em <<http://www.nnfcc.co.uk/>> . Acesso maio 2011
- NNDCC (2011) Lactic Acid - Renewable Chemicals Factsheet. Disponível em <<http://www.nnfcc.co.uk/>> . Acesso maio 2011
- NNFCC (2010) Succinic Acid - Renewable Chemicals Factsheet. Disponível em <<http://www.nnfcc.co.uk/>> . Acesso maio 2011
- NNFCC (2010) Ethanol - Renewable Chemicals Factsheet. Disponível em <<http://www.nnfcc.co.uk/>> . Acesso maio 2011
- O'CONNOR, D. Report T39-T3. Biodiesel GHG emissions, past, present, and future . A report to IEA Bioenergy Task 39. 2011.
- PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, J.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. 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**, Oxford, v. 32, p. 60-71, 2008.

PETROV, K.; PETROVA, P. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, p. 659-665, 2009.

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

RYMOWICZ, W.; FATYKHOVA, A. R.; KAMZOLOVA, S. V.; RYWINSKA, A.; MORGUNOV, I. G. Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, p. 971-979, 2010.

SAUER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in biotechnology**, Amsterdam, v. 26, p. 100-108, 2008.

TACONI, K. A.; VENKATARAMANAN, K. P.; JOHNSON, D. T. Growth and Solvent Production by *Clostridium pasteurianum* ATCC (R) 6013 (TM) Utilizing Biodiesel-Derived Crude Glycerol as the Sole Carbon Source. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, Malden, v. 28, p. 100-110, 2009.

TANG, X. M.; TAN, Y. S.; ZHU, H.; ZHAO, K.; SHEN, W. Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol by an Engineered Strain of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 1628-1634, 2009.

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VANDENBOSCH, E.; VANDIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Alcoholic Fermentation of Deuterium-Xylose by Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, p. 1221-1223, 1984.

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

YUZBASHEV, T. V.; YUZBASHEVA, E. Y.; SOBOLEVSKAYA, T. I.; LAPTEV, I.A.; VYBORNAYA, T.V.; LARINA, A.S.; MATSUI, K.; FUKUI, K.; SINEOKY, S.P. Production of Succinic Acid at Low pH by a Recombinant Strain of the Aerobic Yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 107, p. 673-682, 2010.

Circular Técnica, 07

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroenergia
Endereço: *Parque Estação Biológica - PqEB s/n,*
Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4246
Fax: (61) 3448-1589
E-mail: sac.cnpae@embrapa.br



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



1ª edição
Versão eletrônica (2011)

Comitê de publicações

Presidente: *José Manuel Cabral de Sousa Dias.*
Secretária-Executiva: *Anna Leticia M. T. Pighinelli.*
Membros: *Alice Medeiros de Lima, Larissa Andrea-
ni, Leonardo Fonseca Valadares.*

Supervisão editorial: *José Manuel Cabral de Sousa
Dias.*

Revisão de texto: *José Manuel Cabral de Sousa
Dias.*

Editoração eletrônica: *Maria Goreti Braga dos
Santos.*

Normalização bibliográfica: *Maria Iara Pereira
Machado.*

Expediente