DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DA CADEIA PRODUTIVA DO BIODIESEL: OBTENÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL EM CULTIVO MIXOTRÓFICO COM GLICERINA RESIDUAL

DANIELA ALMEIDA NOGUEIRA[1], NATÁLIA TORRES RIBEIRO[2], CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT[3]

RESUMO

Um aspecto importante na obtenção do biodiesel de forma sustentável é o destino a ser dado à glicerina obtida no processo, como por exemplo a sua bioconversão em biomassa e biomoléculas de interesse comercial. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização da glicerina como fonte de carbono adicional no cultivo mixotrófico da microalga marinha *Skeletonema costatum*, comparando o uso da glicerina de grau analítico e da glicerina residual em diferentes concentrações, verificando o impacto em alguns parâmetros do crescimento celular. Foi verificado que com a utilização da glicerina de grau analítico não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de 0,03 M e 0,05 M. Já com a glicerina residual, a concentração de 0,05 M diferiu das demais, em relação à biomassa máxima e produtividade, conseguindo-se os melhores valores para estes parâmetros (3,68 ± 0,08 $g.L^{-1}$ e 0,83 ± 0,05 $g.L^{-1}$. dia^{-1}, respectivamente). Desta forma, pode-se afirmar que o uso de glicerina residual na concentração de 0,05 M teve impacto positivo sobre os parâmetros do crescimento celular de *Skeletonema costatum*, podendo vir a constituir uma alternativa para agregar valor à cadeia produtiva do biodiesel, contribuindo para o seu desenvolvimento sustentável.

PALAVRAS-CHAVES: Biodiesel. Glicerol. *Skeletonema costatum.*

SUSTAINABLE DEVELOPMENT OF THE BIODIESEL PRODUCTION CHAIN: PRODUCTION OF MICROALGAL BIOMASS IN MIXOTROPHIC CULTIVATION WITH RAW GLYCEROL

ABSTRACT

An important aspect in the production of biodiesel in a sustainable way is the destination of glycerol generated in the process, such as its bioconversion into biomass and biomolecules of commercial interest. The aim of this study was to evaluate the use of glycerol as a carbon source in the mixotrophic cultivation of marine microalgae *Skeletonema costatum*, comparing the use of pure glycerol and raw glycerol in different concentrations, verifying the impact on cell growth parameters. It was found that with the use of pure glycerol no significant differences were observed between the concentrations of 0.03 M and 0.05 M. With raw glycerol, concentration of 0.05 M differed from the other sin relation to the maximum biomass concentration and productivity, achieving

[1] Escola de Química e Alimentos – FURG. Doutoranda em Ciências e Engenharia de Alimentos. nogueiradaniali@yahoo.com.br.
[2] Escola de Química e Alimentos – FURG. Graduanda em Engenharia Bioquímica. natiiribeiro@hotmail.com.
[3] Escola de Química e Alimentos – FURG. Doutor em Engenharia de Alimentos. burkert@vetorial.net.

the higher values for these parameters (3.68 ± 0.08 $g.L^{-1}$ and 0.83 ± 0.05 $g.L^{-1}.day^{-1}$, respectively). Thus, it can be stated that the use of raw glycerol in the concentration of 0.05 M had a positive impact on cell growth parameters of *Skeletonema costatum*, and can constitute an alternative to add value to the biodiesel production chain, contributing to its sustainable development.

KEYWORDS: Biodiesel. Glycerol. *Skeletonema costatum.*

1. INTRODUÇÃO

A principal característica da matriz energética brasileira reside na elevada porcentagem de energia renovável (44,5% da oferta interna de energia) em relação aos padrões mundiais (cerca de 14%). Uma importante parcela destas fontes renováveis de energia que compõem a matriz brasileira é constituída pelos biocombustíveis, representados pelo álcool combustível e pelo biodiesel [2].

Os processos atuais de produção de biodiesel estão concentrados fortemente na reação de transesterificação de óleos vegetais usando etanol ou metanol anidro como reagente e catálise básica homogênea usando hidróxidos ou alcoóxidos de metais alcalinos. Geram os ésteres etílicos ou metílicos – o biodiesel – e como coproduto grandes quantidades de glicerina [4].

O acréscimo da disponibilidade de glicerina no mercado brasileiro oriunda das usinas de biodiesel foi da ordem de 100 mil toneladas em 2008, quase dez vezes acima do que as indústrias químicas ofertam no país anualmente. Este acréscimo veio acompanhado de uma redução expressiva (cerca de 48%) das cotações da glicerina no país [5]. Segundo Amaral et al. [1] a indústria do biodiesel converteu a glicerina em uma *commodity* de baixo valor, com crescimento mundial da oferta estimado em 10% para 2010, enquanto que nos seus usos tradicionais estima-se um acréscimo de 3,7%.

A glicerina residual resultante da síntese do biodiesel usualmente apresenta 55-90% de pureza. O restante consiste de triacilgliceróis não convertidos, metanol ou etanol não convertido, biodiesel, sabões e outros [8].

Um aspecto importante na obtenção do biodiesel de forma sustentável é o destino a ser dado à glicerina obtida no processo. A conversão da glicerina por via biotecnológica em produtos de importância comercial constitui uma das mais promissoras alternativas para seu aproveitamento [13]. O desenvolvimento de bioprocessos para converter glicerina em produtos de maior valor agregado viria a agregar valor ao biodiesel, seguindo o conceito de biorrefinaria. Este termo se refere ao uso de matérias-primas

renováveis e seus resíduos de maneira mais diversificada e integral para a produção de uma variedade de produtos e energia, com geração mínima de resíduos e emissões [7].

Por outro lado, muitas microalgas são utilizadas para alimentação humana e animal por conterem em sua composição diversas substâncias, como vitaminas, sais minerais, pigmentos, proteínas, lipídios e ácidos graxos. As principais aplicações dos ácidos graxos de microalgas estão no enriquecimento de rações para peixes, possibilidade de uso para produção de biodiesel e fonte de ácidos graxos essenciais na dieta humana [10]. Também a partir da biomassa são extraídas substâncias de importância farmacêutica, bem como são utilizadas na produção de cosméticos e como indicadores ambientais, entre outras aplicações [9].

A microalga *Skeletonema costatum* é um importante constituinte do fitoplâncton marinho em função de sua ocorrência em grandes quantidades. Por apresentar rápido crescimento, é amplamente utilizada para alimentação de larvas de crustáceos e moluscos bivalves [3].

Sob condições mixotróficas, algumas microalgas aumentam sua taxa de crescimento e sua biomassa e produzem uma maior concentração de ácidos graxos [8]. Assim, o emprego de fontes de carbono alternativas, como a glicerina, além de contribuir para a redução dos custos dos meios de cultivo em relação ao uso de fontes de carbono tradicionais, pode levar a um aumento a produção de biomassa.

Em trabalho anterior, Paludo [11] avaliou a capacidade de diferentes espécies de microalgas quanto à capacidade assimilar glicerina (grau analítico), bem como o impacto sobre o teor de lipídios das biomassas. *Skeletonema costatum* foi uma das que mais se destacou, sendo que o uso da glicerina de grau analítico (0,05 M) promoveu um incremento de 1,28 vezes na biomassa e 12,19 vezes no conteúdo lipídico.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar a utilização da glicerina residual como fonte de carbono adicional no cultivo mixotrófico da microalga marinha *Skeletonema costatum*, comparando com o uso da glicerina de grau analítico e da glicerina residual em diferentes concentrações, verificando os impactos nos parâmetros do crescimento celular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

Nos experimentos foi utilizada a microalga marinha *Skeletonema costatum*. A microalga foi cedida pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) da Universidade Federal da Bahia - UFBa.

2.2. Glicerina

A glicerina de grau analítico foi adquirida de Synth (Brasil).

A glicerina residual (82,09 % de pureza) foi fornecida pela empresa BS BIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo/RS, sendo o coproduto da transesterificação de óleo de soja e etanol anidro em catálise alcalina.

2.3. Inóculo

Para o preparo do inóculo foi utilizado o meio *Conway* [15], constituído por água marinha natural com salinidade ajustada em 28 ups acrescida de solução principal, solução de silicatos e solução de vitaminas.

Solução principal (2 mL. L^{-1}), solução de silicatos (2 mL. L^{-1}) e solução de vitaminas (0,1 mL. L^{-1}).

A solução principal foi preparada com os seguintes componentes (g.L^{-1}): 45 $C_{10}H_{14}O_8Na_2.2H_2O$; 33,6 H_3BO_3; 100 $NaNO_3$; 0,36 $MnCl_2.4H_2O$; 1,3 $FeCl_3.6H_2O$ e 20 $NaH_2PO_4.2H_2O$.

A solução de silicatos foi preparada com o seguinte componente (g.L^{-1}): 4 $Na_2OSiO_2.nH_2O$.

A solução de vitaminas foi preparada com os seguintes componentes (g.L^{-1}): 0,005 Vitamina B_{12}; 0,1 Vitamina B_1.

A água marinha e as soluções foram esterilizadas separadamente.

Foram realizados repiques sucessivos a cada 15 dias até estes alcançarem o volume necessário para o início dos experimentos.

2.4. Cultivos mixotróficos

Os cultivos foram conduzidos em fotobiorreatores, do tipo Erlenmeyer de 1 L, contendo 900 mL do meio *Conway* [15], acrescido de glicerina de grau analítico ou glicerina residual, nas concentrações de 0,03 M, 0,05 M e 0,07 M. O volume de inóculo adicionado correspondeu a 10% do volume de meio estéril [14]. Os fotobiorreatores foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab EL-202, Brasil). As condições de cultivo foram: temperatura de 24 ± 1°C, irradiância de 3000 *Lx*, fotoperíodo integral e agitação constante através da injeção de ar estéril.

Os experimentos foram conduzidos em triplicata e alíquotas dos cultivos foram retiradas a cada 24 h, sendo estas centrifugadas a 1431 × g por 15 min. O sedimento foi lavado, novamente centrifugado e ressuspendido, para leitura da absorvância a 680 nm

(Biospectro SP-220, China). A partir de uma curva padrão previamente determinada, a concentração de biomassa em $g.L^{-1}$, foi estimada.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Statistica 6.0 (StatSoft Inc., EUA), a fim de verificar a existência de diferenças significativas em relação às diferentes concentrações utilizadas, a 95% de confiança ($p < 0,05$).

2.5. Cálculo dos parâmetros do crescimento celular

A avaliação do crescimento celular nos cultivos foi realizada a partir da determinação da biomassa máxima (X_{max}, $g.L^{-1}$), produtividade (P, $g.L^{-1}.\ dia^{-1}$) e velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}, dia^{-1}).

A biomassa máxima (X_{max}, em $g.L^{-1}$) corresponde ao valor máximo de concentração celular obtido no experimento, expressa como massa seca por volume.

A produtividade (P, em $g.L^{-1}.\ dia^{-1}$) foi determinada pela Equação 1 [12]:

$$P = \frac{X_{max} - X_0}{t} \quad (1)$$

onde:

X_{max} = Biomassa máxima ($g.L^{-1}$)

X_0 = Biomassa inicial ($g.L^{-1}$)

t = Tempo para atingir X_{max} (dia)

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}, dia^{-1}), obtida na fase exponencial, corresponde ao coeficiente angular da curva ln (X) versus tempo [12].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultivos utilizando glicerina de grau analítico

A FIGURA 1 mostra as curvas de crescimento da microalga *Skeletonema costatum* ao longo de 11 dias de crescimento, utilizando glicerina de grau analítico Os valores dos parâmetros cinéticos estão apresentados na TABELA 1.

Pode se verificar que a biomassa máxima foi atingida no quarto dia de cultivo para todas as concentrações utilizadas, não havendo diferença significativa entre as concentrações de 0,03 M e 0,05 M, alcançando valores para a biomassa máxima e produtividade de 2,70 ± 0,05 $g.L^{-1}$ e 0,67 ± 0,01 $g.L^{-1}.\ dia^{-1}$, para concentração de 0,03 M, e 2,71 ± 0,05 $g.L^{-1}$ e 0,67 ± 0,01 $g.L^{-1}.\ dia^{-1}$ para 0,05 M. Quando observado o

crescimento da microalga na concentração de 0,07 M, verificou-se um decréscimo de cerca de 10% nos valores de biomassa máxima e de produtividade, atingindo, respectivamente, 2,42 ± 0,08 g. L^{-1} e 0,60 ± 0,02 g.L^{-1}. dia^{-1}.

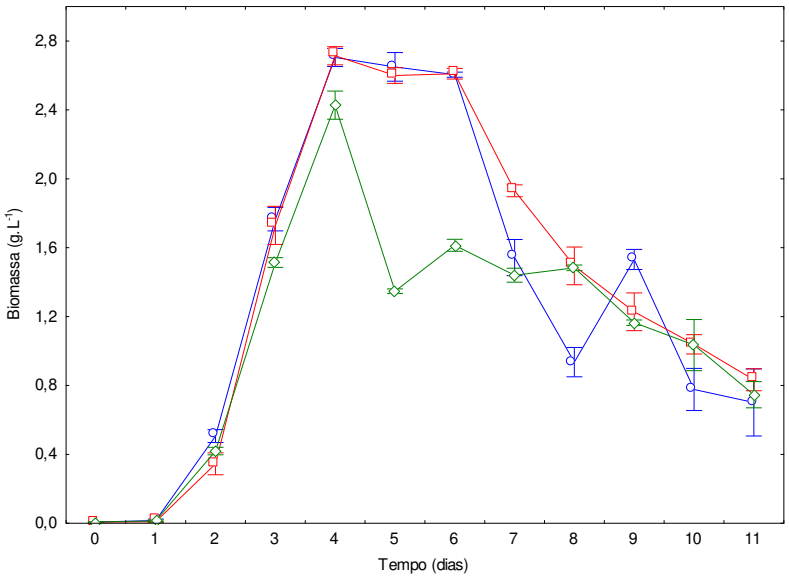


Figura 1. Crescimento celular de *Skeletonema costatum* em meio contendo glicerina de grau analítico: (o) 0,03 M; (□) 0,05 M; (◊)0,07 M.

Tabela 1. Média ± desvio padrão para os parâmetros do crescimento celular da microalga S*keletonema costatum* e análise estatística dos dados*, utilizando glicerina de grau analítico.

Parâmetros	Concentração de glicerina de grau analítico		
	0,03 M	0,05 M	0,07 M
X_{max} (g L^{-1})	2,70 ± 0,05[a]	2,71 ± 0,05[a]	2,42 ± 0,08[b]
P(g.$L^{-1}$$dia^{-1}$)	0,67 ± 0,01[a]	0,67 ± 0,01[a]	0,60 ± 0,02[b]
μ_{max}. (dia^{-1})	1,66 ± 0,07[a]	1,73 ± 0,03[a]	1,63 ± 0,06[a]

* Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas entre colunas a 95% de confiança (p<0,05).

3.2. Cultivo utilizando glicerina residual

A FIGURA 2 apresenta as curvas de crescimento da microalga *Skeletonema costatum* ao longo de 11 dias de cultivo mixotrófico, utilizando como fonte de carbono glicerina residual nas concentrações de 0,03 M, 0,05 M e 0,07 M. Os valores dos parâmetros de crescimento estão mostrados na TABELA 2.

Pode-se verificar que, com a utilização da glicerina oriunda da produção de biodiesel, a biomassa máxima foi atingida no quinto dia para a concentração de 0,03 M (2,75 ± 0,01 $g.L^{-1}$), no sexto dia para as concentrações de 0,05 M (3,68 ± 0,08 $g.L^{-1}$) e 0,07 M (2,27 ± 0,05 $g.L^{-1}$).

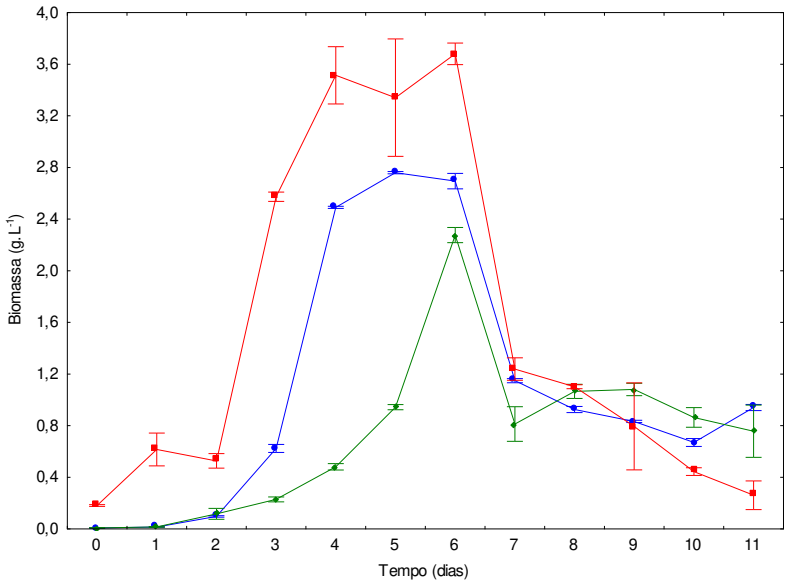


Figura 2. Crescimento celular de *Skeletonema costatum* em meio contendo glicerina residual: (•) 0,03 M; (▪) 0,05 M; (♦)0,07 M

Tabela 2. Média ± desvio padrão para os parâmetros do crescimento celular da microalga S*keletonema costatum* e análise estatística dos dados*, utilizando glicerina residual.

Parâmetros	Concentração de glicerina residual		
	0,03 M	0,05 M	0,07 M
X_{max} ($g.L^{-1}$)	2,75 ± 0,01^{b}	3,68 ± 0,08^{a}	2,27 ± 0,05^{c}
P($g.L^{-1}$. dia^{-1})	0,62 ± 0,00^{c}	0,83 ± 0,05^{a}	0,38 ± 0,01^{b}
μ_{max} (dia^{-1})	1,53 ± 0,01^{a}	0,67 ± 0,14^{b}	0,75 ± 0,03^{b}

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas entre colunas a 95% de confiança (p<0,05).

Na TABELA 3, ao comparar os cultivos utilizando a glicerina de grau analítico e a glicerina residual, ambas na concentração de 0,05 M, pode-se verificar a contribuição positiva da glicerina residual, uma vez que a biomassa passou de 2,71 $g.L^{-1}$ (glicerina de grau analítico) para 3,68 $g.L^{-1}$ (glicerina residual), resultando assim em incremento de

cerca de 35,8 %. O mesmo ocorreu para a produtividade, que passou de 0,67 $g.L^{-1}$. dia^{-1} para 0,83 $g.L^{-1}$. dia^{-1}, um aumento de cerca de 23,9 %.

Tabela 3. Média ± desvio padrão para os parâmetros do crescimento celular da microalga *Skeletonema costatum* e análise estatística dos dados*, utilizando glicerina de grau analítico e glicerina residual, ambas na concentração de 0,05 M.

Parâmetros	Glicerina de grau analítico	Glicerina residual
X_{max} ($g\ L^{-1}$)	$2,71 \pm 0,05^{b}$	$3,68 \pm 0,08^{a}$
$P(g.L^{-1}.\ dia^{-1})$	$0,67 \pm 0,01^{b}$	$0,83 \pm 0,05^{a}$
μ_{max} (dia^{-1})	$1,73 \pm 0,03^{a}$	$0,67 \pm 0,14^{b}$

* Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas entre colunas a 95% de confiança ($p<0,05$).

Sob condições mixotróficas, algumas microalgas aumentam sua taxa de crescimento e sua biomassa e produzem uma maior concentração de ácidos graxos [8]. Isso pode ser explicado pelo fato de que o uso de fontes suplementares de carbono minimiza as consequências do auto-sombreamento causado pela elevada densidade celular. Com a baixa disponibilidade de luz em cultivos densos, a assimilação do carbono inorgânico pelas microalgas fica prejudicada. Se a alga consegue assimilar mais carbono, aumenta sua produção de carboidratos, proteínas e lipídeos [6].

4. CONCLUSÃO

Utilizando glicerina de grau analítico, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de 0,03 M e 0,05 M, mas aumentando para 0,07 M houve uma redução significativa na biomassa máxima e produtividade. Já com a glicerina residual, a concentração de 0,05 M diferiu das demais, em relação à biomassa máxima e produtividade, conseguindo os melhores valores para estes parâmetros (3,51 ± 0,22 $g.L^{-1}$ e 0,83± 0,05 $g.L^{-1}$. dia^{-1}, respectivamente). Nesta concentração, o uso de glicerina residual diferiu estatisticamente da glicerina de grau analítico, havendo um incremento na biomassa máxima e na produtividade com o uso do coproduto de produção de biodiesel em cerca de 35,8 % e 23,9 %, respectivamente. Desta forma, pode-se afirmar que o uso de glicerina residual na concentração de 0,05 M teve impacto positivo sobre os

parâmetros do crescimento celular de *Skeletonema costatum*, podendo a obtenção desta biomassa microalgal, vir a constituir uma alternativa para agregar valor à cadeia produtiva do biodiesel, contribuindo para o seu desenvolvimento sustentável.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AMARAL, P.F.F.; FERREIRA, T.F.; FONTES, G.C.; COELHO, M.A.Z. Glycerol valorization: new biotechnological routes. Food and Bioproducts Processing, v. 87, p. 179-186, 2009.

[2] BEN. Ministério de Minas e Energia, Balanço Energético Nacional 2010, 2011. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br> Acesso em: 28 jun. 2012.

[3] BERTOLLI, L.; FERNANDES, L. O gênero *Skeletonema greville* (Bacillariophyta) ao longo de um gradiente ambiental no Rio Guaraguaçu, litoral do Paraná, Brasil, in: XII Congresso Brasileiro de Ficologia, 2008, Brasília. Anais... Brasília, 2008.

[4] BONOMI, A.; POÇO, J.G.; TRIELLI, M.A. Biocombustíveis – a solução brasileira para uma matriz energética sustentável. Revista Brasileira de Engenharia Química, v. 22, p. 16-21, 2006.

[5] BOUÇAS, C. Glicerina de biodiesel inunda mercado no país e derruba preços. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com> Acesso em: 05 jan. 2013.

[6] DERNER, R.;.OSHE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. Ciência Rural, v. 36, p. 1959-967, 2006.

[7] DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. Biotechnology and Bioengineering, v. 94, p. 821-829, 2006.

[8] GARCIA, C.; SEVILLA, S.; FERNANDEZ, F.; GRIMA, E.; CAMACHO, F. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. Journal of Applied Phycology, v. 12, p. 239–248, 2000.

[9] LOURENÇO, S. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações, São Carlos, Brasil. Editora Rima., 2006.

[10] MORAIS, M.; COSTA, J.; Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. Ciência e Agroecologia, v. 32, p. 1245-1251, 2008.

[11] PALUDO, M. Uso do glicerol no cultivo mixotrófico de microalgas marinhas: impacto no crescimento celular e no conteúdo lipídico. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Alimentos), Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), 2012.

[12] SCHMIDELL, W.; LIMA, A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos, São Paulo, Brasil. Editora Edgard Blücher Ltda., 2001.

[13] 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.

[14] SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Bipquímica), Programa de Pós-graduação em Ciências Bioquímica, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2010.

[15] WALNE, P. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis.* Fishery Investigations Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London Ser. v. 2**,** p. 1-53, 1966.

6. AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).