

ANÁLISE DO BIODIESEL DE 3ª GERAÇÃO OBTIDO EM CULTIVOS HETEROTRÓFICOS DE *PHORMIDIUM* SP.

M. M. MARONEZE¹; E. C. FRANCISCO²; L. Q. ZEPKA¹; FRANCO³, T. T.; E. JACOB-LOPES¹.

¹Universidade Federal de Santa Maria, Depto. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

²Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura (FEAR), curso de Engenharia Ambiental, BR 285, São José, CEP 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil

³Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Av. Albert Einstein, 500, CEP 13083-852, Campinas, São Paulo, Brasil

E-mail para contato: jacoblopes@pq.cnpq.br

RESUMO - O objetivo do trabalho foi analisar qualitativamente o biodiesel de 3ª geração obtido em cultivos heterotróficos de *Phormidium* sp. empregando como fonte de carbono orgânico os dissacarídeos D-lactose, D-maltose, sacarose e trealose, em concentrações de 12 g/L. Os cultivos foram desenvolvidos em um biorreator de coluna de bolhas sob temperatura de 26°C e ausência de luminosidade. Foram determinados o perfil lipídico da biomassa e as propriedades de combustão do biodiesel produzido. Em todos os cultivos a fração lipídica foi composta majoritariamente por ácidos graxos saturados. As propriedades de a qualidade do biodiesel se mostraram adequadas às normas nacionais (ANP255) e internacionais (ASTM6751 e EN14214).

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel tem sido objeto de grande atenção nos últimos anos devido aos impactos ambientais e os altos preços do diesel oriundo de fontes fósseis. Além disso, é um combustível biodegradável, renovável e não-tóxico. O biodiesel pode ser produzido a partir de óleos vegetais ou de gordura animal. No entanto, outras fontes têm sido investigadas com o intuito de reduzir os custos de produção e obter produtos de maior qualidade (MATA et al., 2010).

Estudos recentes apontam que cianobactérias possuem grande potencial para produção de biodiesel de 3ª geração devido à facilidade de seu cultivo, duplicação da biomassa em um curto período de tempo e elevada quantidade intracelular de lipídios, que após extração, são transesterificados para a obtenção do biodiesel (PEREIRA et al., 2012). Além disso, a qualidade do biodiesel gerado pode ser comparável e até superior ao de fontes vegetais (JACOB-LOPES & FRANCO, 2013).

As cianobactérias são microrganismos procariontes largamente distribuídos na natureza. São preferencialmente fotossintetizantes apesar de algumas linhagens, como

Phormidium sp., apresentarem a distinta capacidade de crescer sob condições heterotróficas na total ausência de luminosidade e presença de substratos orgânicos (QUEIROZ et al., 2007). Os cultivos heterotróficos superam algumas limitações dos sistemas fotossintéticos, como a dependência de luz, podendo viabilizar a produção de bioprodutos, além de ser uma alternativa com maior viabilidade econômica (SUALI & SARBATHY, 2012).

Em contrapartida, a escolha da fonte de carbono orgânico pode ser um fator limitante para este tipo de cultivo, podendo afetar diretamente a qualidade da biomassa. Embora a glicose seja a fonte de carbono exógeno mais utilizada nos cultivos heterotróficos microalgais, outras fontes têm sido investigadas visando a otimização do sistema (FRANCISCO et al., 2013).

Em face disto, o objetivo do trabalho foi analisar o biodiesel produzido pela cianobactéria *Phormidium* sp. empregando dissacarídeos como fonte de carbono orgânico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e meio de cultura

A cianobactéria utilizada foi a *Phormidium* sp., isolada do Deserto Cuatro Ciénegas no México (26°59'N 102°03'W). solidificado com agar-agar. As culturas da microalga *Phormidium* sp. foram propagadas e mantidas em Agar-agar solidificado (20g/L) contendo meio padrão BGN, com a seguinte composição: K_2HPO_4 (3g. 100mL⁻¹), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (7,5g. 100mL⁻¹), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3,6g. 100mL⁻¹), Citrato de amônio e ferro III (0,6g. 100mL⁻¹), Na₂ EDTA (0,1g. 100mL⁻¹), NaCl (7,2g. 100mL⁻¹), NaNO₃ (150g.L⁻¹), Ácido cítrico (0,06g. 100mL⁻¹), Na₂CO₃ (0,2g. 100mL⁻¹), H₃BO₃ (2,86g.L⁻¹), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,816g.L⁻¹), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,222g.L⁻¹), Na₂MoO₄·2H₂O (0,390g.L⁻¹), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,079g.L⁻¹), $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,040g.L⁻¹) (Rippka et al., 1979). As condições de incubação utilizadas foram de 25°C, densidade de fluxo de fótons de 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro. Para obter os inóculos na forma líquida, 1 ml de meio sintético foi esterilizado e transferido para inclinações, as colônias foram raspadas e depois homogeneizadas. Todo o procedimento foi realizado assepticamente.

2.2. Biorreator

Os experimentos foram realizados em biorreator de coluna de bolhas construído de vidro borossilicato, com um diâmetro externo de 12,5cm e uma altura de 16cm, resultando numa razão altura/diâmetro (L/D) igual a 1,28, com um volume total de trabalho de 2,0L. O sistema de dispersão de ar consiste em um difusor de 2,5cm de diâmetro localizado no interior do frasco. A vazão de ar foi controlada por rotâmetros (precisão $\pm 5\%$), a entrada de oxigênio e a saída dos gases foram filtradas através de unidades filtrantes Millex-FGR de 0,22 μm de diâmetro e 50mm de diâmetro total. O biorreator, incluindo as unidades de filtração foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C durante 40 minutos e, em seguida, durante 30 minutos, com o meio sintético.

2.3. Obtenção dos dados cinéticos

Os experimentos foram conduzidos em um biorreator de coluna de bolhas, operado de modo descontínuo, alimentado com 2L de meio sintético, com pH ajustado para 7,6, 100mg/L do inoculo da microalga *Phormidium* sp., temperatura de 26°C, ausência de luminosidade, e aeração contínua de 1VVM (volume de ar por volume de efluente por minuto). O meio de cultura consistiu em meio sintético BGN modificado e suplementado com diferentes fontes de carbono exógenos para obter 12 g/L de concentração de carbono orgânico. As concentrações dos dissacarídeos foram ajustadas estequiometricamente. Como fonte de carbono orgânico empregou-se os dissacarídeos D-lactose, D-maltose, sacarose e trealose, em concentrações de 12 g/L.

2.4. Amostragem e métodos analíticos

As amostragens foram realizadas de forma asséptica em uma câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada. As ponteiras utilizadas para a coleta das amostras foram previamente esterilizadas em autoclave a 121°C por 20 minutos. A concentração celular, a dinâmica do pH e o consumo de carbono orgânico foram monitorizadas a cada 24 horas durante a fase de crescimento do microrganismo. Os experimentos foram realizados duas vezes e, em duplicata, para cada substrato. Portanto, os dados cinéticos referem-se ao valor médio de quatro repetições.

A dinâmica do pH foi determinada por potenciometria e a concentração celular por gravimetria. A concentração de carbono orgânico, expressa em termos de demanda química de oxigênio (DQO) foi determinada por método colorimétrico segundo metodologia proposta por APHA (2005).

Ao termino do processo a biomassa foi separada do meio de cultivo por decantação, seguido de centrifugação, secagem e trituração. Para a extração de lipídeos totais da biomassa utilizou-se o método de Bligh e Dyer (1959) modificado e a quantidade de lipídeos foi determinada por gravimetria. A saponificação e esterificação (metilação) do extrato lipídico seco foram realizadas através do método de Hartman e Lago (1976) obtendo-se o biodiesel. A análise qualitativa e quantitativa dos lipídeos produzidos foi realizada por cromatografia gasosa (CG) utilizando-se o cromatógrafo Varian 3400CX (Varian, Palo Alto, CA, EUA). Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção a partir de um padrão (Supelco, Louis, MO, EUA) e quantificados por área de normalização.

As propriedades da qualidade do biodiesel foram determinadas de acordo com metodologia proposta por Francisco et al., (2010). Avaliou-se o conteúdo de ésteres (EC), número de cetano (NC), índice de saponificação (IS), índice de iodo (II), o grau de instauração (GI), fator de comprimento da cadeia (FCC) e o ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de ácidos graxos do lipídeo é o principal fator que determina as características do biodiesel. Neste sentido, a Tabela 1 apresenta a composição dos ácidos graxos da biomassa. Observa-se a predominância de ácidos graxos saturados em todos os cultivos, sendo que seu teor foi de 100% para frutose, 74,8% para maltose, 74% para sacarose e 72,02% para trealose. Seguidos por ácidos graxos monoinsaturados

para sacarose e trealose, em concentrações de 265,0% e 25,21%, respectivamente. Já a produção de ácidos graxos poli-insaturados foi verificada somente para a maltose (13,06%) e trealose (1,86%).

As características qualitativas demonstram a potencialidade da aplicação deste tipo de biomassa como insumo para a produção de biodiesel, tendo em vista que óleos com composição predominantemente saturada e monoinsaturada são os mais adequados para a síntese de biodiesel (Knothe, 2005).

Tabela 1- Perfis lipídicos dos cultivos

Ácidos Graxos	Cultivo			
	Lactose	Maltose	Sacarose	Trealose
SFA (%)	100,00	74,80	74,00	72,02
MUFA (%)	ND	12,15	26,00	25,21
PUFA (%)	ND	13,06	ND	1,86

SFA: somatório dos ácidos graxos saturados, MUFA: somatório dos ácidos graxos monoinsaturados, PUFA: somatório dos ácidos graxos poliinsaturados.

Para avaliar o potencial do biodiesel como substituto do óleo diesel, foram determinadas as propriedades de combustão do biodiesel, tais como conteúdo de ésteres, número de cetano, índice de saponificação, índice de iodo, grau de insaturação, fator de comprimento de cadeia e ponto de entupimento de filtro a frio. Desta forma, a Tabela 2 apresenta as propriedades de combustão do biodiesel microalgal.

Tabela 2- Propriedades do biodiesel para o cultivo heterotrófico da *Phormidium* sp. empregando diferentes dissacarídeos

Cultivo	Parâmetros						
	EC	NC	IS	II (gl ₂ .100g ⁻¹)	GI (wt%)	FCC (wt%)	PEFF
Lactose	100	63,27	321,61	0	0	7,39	6,73
Maltose	99,99	60,91	243,82	34,57	38,26	23,57	57,56
Sacarose	99,98	59,82	280,78	26,30	3,61	22,91	55,49
Trealose	99,96	134,16	56,99	25,14	33,98	20,07	46,59
Soja ^a	96,9	49,0		128,0	143,8		-5
ASM 6751	-	Min 47	-	-	-	-	-
EN 14214	Min 96,5	Min 51	-	Max 120	-	-	-
ANP 255	-	Min 45	-	-	-	-	-

CE = conteúdo de éster, CN = número de cetano, IS = índice de saponificação, II = índice de iodo, GI = grau de instauração, FCC = fator de comprimento da cadeia, PEFF = ponto de entupimento de filtro a frio. ^a Knothe (2005)

Os parâmetros considerados cumprem com as legislações vigentes no Brasil (ANP 255), Europa, (EN 14214) e Estados Unidos (ASTM 6751), sugerindo a possibilidade do uso da biomassa microalgal obtida a partir do cultivo heterotrófico de *Phormidium* sp. com dissacarídeos como insumo lipídico aplicável a produção de biodiesel.

5. CONCLUSÃO

Os cultivos heterotróficos de *Phormidium* sp. utilizando dissacarídeos como fonte de carbono orgânico geraram uma biomassa adequada à manufatura do biodiesel. O perfil de ácidos graxos apresentado foi predominantemente saturado para todos os cultivos, resultando em um biodiesel com propriedades de combustão de acordo com as principais normas nacionais e internacionais.

5. REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION- APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20. ed. Washington: APHA, 2005.

ANP 255. *Provisional Brazilian Biodiesel Standard ANP* (Agencia Nacional do Petróleo), 2003.

ASTM 6751. *Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100)*. Blend Stock for Distillate Fuels, 2002.

- BLIGH, E.G.; DYER, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, v.37, p.911-917, 1959.
- FRANCISCO, E. C.; FRANCO, T. T.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. *Bioprocess Biosystems Engineering*, v. 36, p. 1986-2013, 2014.
- FRANCISCO, E.C.; NEVES, D.B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T.T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.95, p. 395-403, 2010.
- HARTMAN, L., LAGO, R.C.A. A rapid determination of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, v.22, p.475-476, 1976.
- JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. From oil refinery to microalgal biorefinery. *Journal of CO2 Utilization*, v.2, p.1-7, 2013.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J. *The biodiesel handbook*. AOAC Press, Champaign, IL, USA, 2005.
- MATA, T.M.; MARTIN, A.A.; NIDIA, S.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and their applications: A Review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v.14, p.217-232, 2010.
- PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R; DEL PINO, F. B; MESKO, M. F; JACOB-LOPES, E.; NETO, P. C. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. *Química Nova*, v.35, p.2013-2018, 2012.
- RIPPKA, R. et al. Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiolog.* Great Britain. n.111. p.1-61, 1979.
- SUALI, E; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.16, p.4316-4342, 2012.
- UNE-EN 14214. *Automotive Fuels, Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines, Requirements and Test Methods*, 2003.