

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS ATRAVÉS DA BIOCONVERSÃO DA GLICERINA PELA MICROALGA *SKELETONEMA COSTATUM*

D. A. NOGUEIRA¹, N. T. RIBEIRO¹ e C. A. V. BURKERT¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos
E-mail para contato: nogueiradaniali@yahoo.com.br

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi estudar a produção lipídica da microalga *Skeletonema costatum*, comparando a utilização da glicerina de grau analítico (GGA) e da glicerina residual (GR) como fonte de carbono em diferentes concentrações (0,03 M, 0,05 M e 0,07 M), caracterizando a biomassa obtida em termos de conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos. *Skeletonema costatum* se destacou na produção lipídica, obtendo-se $67,78 \pm 1,41\%$ e $66,40 \pm 0,46\%$ de lipídios na concentração de 0,05 M de GGA e GR, respectivamente. Nesta mesma concentração, o perfil de ácidos graxos, entre os ácidos graxos saturados, destacou-se o ácido palmítico, com 18% (GGA) e 17,8% (GR). Do total de ácidos graxos monoinsaturados, 47,8% e 29,2% para GR e GGA, respectivamente, destaca-se o ácido oléico (38% e 19,7%, respectivamente). Os ácidos graxos poli-insaturados, os ácidos γ -linolênico e α -linolênico destacaram-se quando o cultivo foi realizado com GGA, resultando em 13,4% e 13,7% do total, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

Na indústria alimentícia, as biomassas derivadas de microalgas são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar, sendo encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. Conforme Pulz e Gross (2004) são também incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas, entre outros, tanto como suplemento nutricional quanto como corantes naturais. Além disso, a biomassa microalgal é rica em ácidos graxos poli-insaturados, como ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaenoico (DHA), capazes de prevenir doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, doenças inflamatórias, entre outras, segundo Derner *et al.* (2006). Os triacilgliceróis nas microalgas correspondem à maior fração lipídica e, em algumas espécies, os ácidos graxos poli-insaturados representam entre 25 e 60% dos lipídios totais.

De acordo com Bertolli e Fernandes (2008) 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, e também em estudos de auto-ecologia. Segundo o

trabalho de Borges (2005) a microalga ainda é identificada como uma espécie com potencial de uso para a captura do CO₂ e produção de biodiesel.

Por outro lado, 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 (Silva *et al.*, 2009). 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 (Amaral *et al.*, 2009). No entanto, o uso de glicerina residual ainda é pouco explorado em cultivos mixotróficos de microalgas, sendo importante estudos para avaliar a capacidade de assimilação do glicerol por diferentes espécies de microalgas, bem como o impacto sobre o crescimento microalgal e a composição da biomassa.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o acúmulo de lipídios no cultivo mixotrófico da microalga marinha *Skeletonema costatum*, comparando a utilização da glicerina de grau analítico (GGA) e glicerina residual (GR) como fonte de carbono em diferentes concentrações, caracterizando a biomassa obtida em termos de perfil de ácidos graxos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos foi utilizada a microalga marinha *Skeletonema costatum*, cedida pelo Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) da Universidade Federal da Bahia – UFBA. O volume de inóculo adicionado correspondeu a 10% do volume de meio estéril. O micro-organismo foi mantido em fotobiorreatores, do tipo Erlenmeyer de 1L, contendo 900 mL do meio Conway (Walne, 1966), utilizando água marinha com ajuste de salinidade em 28 u.p.s. Os fotobiorreatores foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab, modelo EL 202, Brasil). A concentração inicial de biomassa microalgal foi de 0,13 g.L⁻¹. 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, sem medição de vazão. Nos cultivos mixotróficos foram testados os seguintes meios de cultivo: meio Conway adicionado de GGA ou GR em diferentes concentrações de glicerol, previamente corrigidas conforme a pureza (0,03 M, 0,05 M e 0,07 M). A GR com 82,09% de pureza conforme laudo fornecido 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 metanol em catálise alcalina. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e alíquotas dos cultivos foram retiradas a cada 24 h, para a determinação da biomassa, por medida da absorvância a 680 nm. Ao término dos experimentos foi realizada a quantificação de lipídios utilizando o método de Bligh e Dyer (1959). Para a determinação do perfil de ácidos foi utilizada a cromatografia gasosa (Cromatógrafo gasoso Varian, modelo 3400CX, EUA), após

a esterificação dos triacilgliceróis pelo métodos de Metcalfe e Schmitz (1996). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a fim de verificar diferenças significativas entre as diferentes concentrações de glicerina de grau analítico e entre as diferentes concentrações de glicerina residual, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$). As diferenças entre os cultivos com glicerina de grau analítico e glicerina residual foram avaliados pelo Teste t a 95% de confiança.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme a Tabela 1, ao analisar os teores de lipídios acumulados ao longo do cultivo utilizando a GGA, verifica-se que na concentração de 0,05 M alcançou-se o melhor resultado, de $67,78 \pm 1,41\%$, diferindo das demais concentrações, que alcançaram $61,46 \pm 0,82\%$ (0,03 M) e $56,74 \pm 0,67\%$ (0,07 M). Quando utilizada a GR nas concentrações de 0,05 M e 0,07 M, não diferiram estatisticamente entre si, obtendo-se teores de lipídios de $66,40 \pm 0,46\%$ e $65,51 \pm 1,05\%$, respectivamente, mas diferiram de 0,03 M ($60,36 \pm 0,62\%$).

Ao comparar as diferentes fontes de glicerina, verifica-se que nas concentrações de 0,03 M e 0,05 M a produção de lipídios não foi afetada pela substituição pela glicerina residual, não havendo diferenças significativas, enquanto que para a concentração de 0,07 M verifica-se que o uso da glicerina residual contribuiu positivamente para o acúmulo de lipídios, gerando um acréscimo de $56,74 \pm 0,67\%$ para $65,51 \pm 1,05\%$.

Tabela 1 – Conteúdo lipídico da microalga *Skeletonema costatum**

Concentração	Lipídios m/m (%)**	
	GGA	GR
0,03 M	$61,46 \pm 0,82$ ^{b, A}	$60,36 \pm 0,62$ ^{b, A}
0,05 M	$67,78 \pm 1,41$ ^{a, A}	$66,40 \pm 0,46$ ^{a, A}
0,07 M	$56,74 \pm 0,67$ ^{c, B}	$65,51 \pm 1,05$ ^{a, A}

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

** Em base seca.

De acordo com a Tabela 2, os ácidos graxos com maior representatividade na biomassa para a microalga foram: o ácido hexadecanoico (16:0, ácido palmítico), com um teor de 18,0% (GGA) e 17,8% (GR); o ácido hexadecaenoico (16:1, ácido palmitoleico), variando de 7,5% a 4,4%; o ácido octadecenoico (18:1 n-9, ácido oleico), variando de 19,7% para 38,0%, e os ácidos octadecatrienoicos γ -linolênico (18:3 n-6), e α -linolênico (18:3 n-3), variando de 13,4% a 6,3%, e de 13,7% a 3,5%, respectivamente.

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos da microalga *Skeletonema costatum* cultivada em meio contendo 0,05 M de GGA e GR

Ácido graxo	GGA	GR
12:0 – ácido dodecanoico	1,7	-
14:0 – ácido mirístico	4,5	1,7
15:0 – ácido pentadecanoico	-	-
16:0 – ácido palmítico	18,0	17,8
17:0 – ácido heptadecanoico	2,9	
18:0 – ácido octadecanoico	4,8	7,5
24:0 – ácido tetracosanoico	-	2,1
Total de AGS (%)	31,9	29,1
14:1 – ácido tetradecenoico	0,8	1,7
16:1 – ácido palmitoleico	7,5	4,4
17:1 – ácido heptadecenoico	0,5	-
18:1 n-9 – ácido oleico	19,7	38,0
24:1 n-9 – ácido tetracosenoico	0,7	3,7
Total de AGM (%)	29,2	47,8
18:2 n-6 – ácido linoleico	3,0	5,8
18:3 n-6 – ácido γ -linolênico	13,4	6,3
18:3 n-3 – ácido α -linolênico	13,7	3,5
20:4 n-6 – ácido araquidônico	6,7	1,1
20:5 n-3 – ácido eicosapentanoico (EPA)	-	-
22:2 – ácido docosadienoico	1,5	3,9
22:6 n-3 – ácido docosahexaenoico (DHA)	0,6	2,5
Total de AGPI (%)	38,9	23,1
Total (%)	100	100

Com relação ao grau de insaturação, a microalga apresentou percentuais mais elevados de ácidos graxos monoinsaturados (AGMs) em meio contendo GR (47,8%) do que em meio contendo GGA (29,2%). Para os ácidos graxos saturados (AGSs) estes percentuais foram de 31,9% (GGA) e 29,1% (GR). Teores similares de ácidos graxos foram encontrados por Borges – Campos *et al.* (2010), em trabalho utilizando *Skeletonema costatum*, obtendo para os AGSs um percentual de 34,4% e para os AGMs um percentual de 43,9%.

Para os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) obteve-se 38,9% destes compostos quando utilizada a GGA e 23,1% quando utilizada a GR. O teor de AGPIs encontrado por Aznay *et al.* (2004) foi de 26,1%, resultado este próximo do teor encontrado neste trabalho quando utilizado a GR (23,1%). No presente caso, com o uso da GGA, foram obtidos maiores teores dos ácidos γ -linolênico (18:3 n-6) e α -linolênico (18:3 n-3), com 13,4% e 13,7%, respectivamente.

Além dos AGPIs já comentados, foram também identificados na biomassa os ácidos graxos essenciais da família n-6, sendo eles o ácido linoleico (18:2 n-6), variando de 3,0% (GGA) a 5,8% (GR); o ácido araquidônico (20:4 n-6), com teor de 6,7% em GGA e apenas 1,1% para GR; o ácido docosadienoico, com percentual mais elevado em GR, de 3,9%; e o

ácido docosahexaenoico – DHA (22:6 n-3), com 2,5% em GR, este conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e com funções imunológicas, assim como função na formação, desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina, sendo predominante na maioria das membranas celulares desses órgãos (Martin *et al.*, 2006).

4. CONCLUSÕES

Com base no acima exposto, pode-se afirmar que é possível utilizar a glicerina residual oriunda da produção do biodiesel no cultivo da microalga *Skeletonema costatum*, aproveitando desta forma o coproduto com impurezas, sem tratamentos prévios, de baixo custo, permitindo agregar valor à cadeia produtiva do biodiesel. O perfil de ácidos graxos foi alterado pela substituição da GGA pela GR, destacando-se os incrementos importantes de AGMs passando de 29,2% (GGA) para e 47,8% (GR), indicando que mudanças nas condições do cultivo, como o caso da pureza do substrato, pode permitir a manipulação destes perfis. Soma-se a isto o fato de que os diferentes perfis podem sugerir diferentes aplicações, como na alimentação humana, na indústria farmacêutica, de cosméticos e de biocombustíveis, entre outras.

5. REFERÊNCIAS

- AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food Bioprod Process.*, v. 87, p. 179-186, 2009.
- AZNAY, M.G.; LÓPEZ, T.R.; VILLARREA. Y.M. Evaluación de tres cepas de *Thalassiosira* en dos medios de cultivo para su uso en el desarrollo de *Litopenaeus vannamei*. In: III CONGRESO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA, 2004, Habana. *Comunicación Científica...Cuba: CIVA 2004*, p. 218-223.
- BERTOLLI, L. M.; FERNANDES, L. F. P. O gênero *Skeletonema greville* (Bacillariophyta) ao longo de um gradiente ambiental no Rio Guaraguaçu, litoral do Paraná, Brasil. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE FICOLOGIA, 11, 2008, Águas Claras. *Anais...Brasília: 2008*. p. 133-134.
- BLIGH, G. E.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BORGES – CAMPOS, V.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. L. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Cienc. Rural.*, v. 40, n. 2, p. 339-347, 2010.

- BORGES, L. V. Caracterização do potencial de absorção do dióxido de carbono atmosférico por microalgas utilizadas na aquicultura para a geração de um mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL). 2005. 57 f. *Dissertação (Mestrado em Aquicultura)* - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.
- DERNER, R. B.; OSHE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Cienc. Rural.*, v. 6, p. 1959-1967, 2006.
- MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr.*, v. 19, p. 761-770, 2006.
- METCALFE, L. D. A. A.; SCHIMITZ, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Anal. Chem.* v. 38, p. 510, 1966.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biot.*, v. 65, p. 635-648, 2004.
- SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv.*, v. 27, p. 30-39, 2009.
- WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostreaedulis*. *Fish Invest.*, v. 25, p. 1-53, 1966.