

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO BIODIESEL DE 3ª GERAÇÃO OBTIDO EM CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *PHORMIDIUM AUTUMNALE*

S.F. SIQUEIRA¹, R. B. SARTORI¹, É. C. FRANCISCO², L. Q. ZEPKA¹ e E. JACOB-LOPES¹

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

²Universidade de Passo Fundo, UPF, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Engenharia Ambiental, 99052-900, Passo Fundo, RS, 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 autumnale* empregando diferentes dissacarídeos na concentração de 19,9 g/L (lactose), 11,9 g/L (maltose, sacarose e trealose). Os cultivos foram desenvolvidos em um biorreator de coluna de bolhas sob temperatura de 30°C e ausência de luminosidade. Determinou-se o perfil lipídico da biomassa. Os parâmetros de combustão do biodiesel, assim como as propriedades físico-químicas foram calculadas a partir de um software, o Biodiesel Analyzer (BiodieselAnalyzer© 1.1). A fração lipídica foi composta majoritariamente por ácidos graxos saturados, resultando em características de qualidade do biodiesel 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 aos 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 microalgas 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 e Franco, 2013).

As microalgas estão classificadas em um grande grupo de algas microscópicas fotossintetizantes. Algumas espécies apresentam obrigatoriamente o metabolismo

fotossintético, embora outras sejam capazes de crescer sob condições heterotróficas na total ausência de luminosidade e presença de uma fonte de carbono orgânico. Os sistemas heterotróficos superam algumas limitações dos fotossintéticos, como a dependência de luz, podendo viabilizar a produção de bioprodutos como lipídeos, proteínas, carboidratos e pigmentos (Suali e Sarbatly, 2012), além de serem conhecidos por resultarem em elevadas produtividades de bioprodutos (Mohamed *et al.*, 2011).

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.*, 2014).

Em face disso, o objetivo do estudo foi avaliar o biodiesel de 3ª geração produzido a partir do cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium autumnale*, utilizando diferentes dissacarídeos (lactose, maltose, sacarose e trealose) como fonte de carbono orgânico, bem como caracterizar o biodiesel segundo parâmetros químicos e físicos e de qualidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e meio de cultura

A cianobactéria utilizada foi a *Phormidium autumnale* isolada do Deserto Cuatro Ciénegas no México (26°59'N 102°03'W). Após purificação, as culturas estoque foram mantidas em tubos de ensaio com meio sintético BGN (Rippka *et al.*, 1979) solidificado com agar-agar. As condições de manutenção usadas foram 30°C e intensidade luminosa constante de 1klux e aeração constante.

O meio de cultura sintético BGN, (Rippka *et al.*, 1979) utilizado para diluição e suplementação de nutrientes inorgânicos é composto por: K_2HPO_4 (0,03g.L⁻¹), $MgSO_4$ (0,075g.L⁻¹), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,036g.L⁻¹), citrato de amônio e ferro (0,0006g.L⁻¹), Na_2EDTA (0,001g.L⁻¹), $NaCl$ (0,00072g.L⁻¹), $NaNO_3$ (0,015g.L⁻¹), ácido cítrico (0,0006g.L⁻¹), Na_2CO_3 (1,5g.L⁻¹), traços de metais: H_3BO_3 (0,0028g.L⁻¹), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0,0018g.L⁻¹), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,00022g.L⁻¹), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,00039g.L⁻¹), $CoSO_4 \cdot 6H_2O$ (0,00004g.L⁻¹). A este meio de cultura, foram adicionados diferentes dissacarídeos na concentração de 19,9 g/L para lactose e 11,9 g/L para maltose, sacarose e trealose.

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-FG® em polipropileno com membrana Fluoropore de 0,22µm de diâmetro de poro e 50mm de diâmetro total. As condições de cultivos foram: concentração celular inicial de 300mg/L; pH de 7,8; temperatura

de 30°C; aeração de 1VVM (volume de ar por volume de meio por minuto) e ausência de luminosidade.

2.3. Amostragem e métodos analíticos

As amostragens foram realizadas durante sete dias de forma asséptica a cada 24 horas durante a fase de crescimento do microrganismo. A dinâmica do pH para os cultivos em biorreator foi determinada por potenciômetro e a concentração celular através de gravimetria por meio da filtração de um volume conhecido de biomassa em filtro 0,45µm de diâmetro. A concentração de carbono orgânico, expressa em termos de demanda química de oxigênio (DQO) foi determinada por método colorimétrico segundo metodologia proposta pela American Public Health Association (APHA, 2005).

Extração e determinação quantitativa do lipídeo e análise do biodiesel

A biomassa foi separada do meio de cultivo por decantação, seguido de centrifugação. Em seguida, a pasta obtida foi seca em estufa com circulação de ar à temperatura de 60°C. Para a extração de lipídeos totais da biomassa e produção do biodiesel, utilizou-se o método de Bligh e Dyer (1959) modificado, levando-se em conta as proporções entre os solventes metanol, clorofórmio e água destilada (2:1:0,8). A saponificação (metilação) foi realizada através de proporções entre metanol, ácido clorídrico e clorofórmio (10:1:1), seguida da esterificação do extrato lipídico, a partir da reação entre o hexano e o clorofórmio (4:1), através do método de Hartman e Lago (1976) modificado. A análise qualitativa e quantitativa do biodiesel 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 de combustão do biodiesel foram determinadas de acordo com metodologia proposta por Talebi *et al.* (2014) que utilizou o software Biodiesel Analyzer (BiodieselAnalyzer© 1.1). Com este software é possível obter resultados como: o somatório dos ácidos graxos saturados (SFA), o somatório dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA); o somatório dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA); o grau de insaturação por meio da comparação entre a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados (DU); o índice de cetano (CN); as propriedades de fluxo a frio, incluindo o ponto de névoa (CP), e o ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP); a estabilidade de oxidação, incluindo a posição alílica (APE) e os equivalentes de posição bis-alílica (BAPE); o maior valor de aquecimento (HHV); a viscosidade cinemática e a densidade.

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 lactose, 78,11% para sacarose, 74,8% para maltose, e 72,02% para trealose. Seguidos por ácidos graxos monoinsaturados para trealose, sacarose e maltose em concentração de 18,80%, 12,26 e 12,14% respectivamente. Já a concentração de ácidos graxos poli-insaturados foi verificada somente para a maltose (13,06%) e trealose (6,02%). Knothe *et al.* (2005) reporta que óleos com composição predominantemente saturada e

monoinsaturada são os mais adequados para a síntese de biodiesel e suas características qualitativas demonstram sua potencialidade de aplicação deste tipo de biomassa como insumo para a produção de biodiesel.

Para avaliar o potencial do biodiesel, foram determinadas as propriedades do biodiesel, tais como grau de instauração, índice de saponificação, índice de iodo, número cetano, o fator de cadeia longa saturada, ponto de entupimento de filtro a frio, ponto de névoa, posição alílica das duplas ligações, posição bis-alílica, estabilidade à oxidação, maior valor de aquecimento, viscosidade e densidade. A Tabela 2 apresenta as propriedades de combustão do biodiesel microalgal.

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 autumnale* com dissacarídeos como insumo lipídico aplicável a produção de biodiesel.

Tabela 1 – Perfis lipídicos dos cultivos

Ácidos graxos	Lactose	Maltose	Sacarose	Trealose
SFA (%)	100	74,8	78,11	72,02
MUFA (%)	ND	12,14	12,26	18,80
PUFA (%)	ND	13,06	ND	6,02

SFA: somatório dos ácidos graxos saturados, MUFA: somatório dos ácidos graxos monoinsaturados, PUFA: somatório dos ácidos graxos poli-insaturados.

Tabela 2- Propriedades do biodiesel obtido em cultivo heterotrófico da *Phormidium autumnale* empregando diferentes dissacarídeos em comparação com as normais nacionais e internacionais de qualidade.

Parâmetros	Cultivo (Microalga)				Soja ^a	ASTM 6751	EN 14214	ANP 255
	Mlt	Scs	Tls	Lac				
DU (%)	38,26	12,26	30,84	-	-	ND	ND	ND
SV (%)	243,83	202,02	248,69	321,64	-	ND	ND	ND
IV (%)	34,57	11,02	31,77	-	128,0	ND	Máx 120	ND
CN (%)	60,91	70,84	61,10	63,27	49,0	Min 47	Min 51	Min 45
LCSF	10,97	11,97	8,03	7,39	-	ND	ND	ND
CFPP (°C)	17,99	21,13	8,75	6,74	-2	ND	ND	ND
CP (%)	17,98	15,02	10,36	10,35	2	ND	ND	ND
APE (%)	38,26	12,26	29,92	-	-	ND	ND	ND
BAPE (%)	13,06	-	10,20	-	-	ND	ND	ND
OS (h)	21,02	19,15	22,18	-	-	Min 3	Min 6	Min 6
HHV (%)	38,29	35,24	36,68	35,89	17,153	ND	ND	ND
η (mm ² /s)	1,10	1,15	0,94	0,48	4,546	ND	ND	ND
ρ (g/cm ³)	0,87	0,78	0,84	0,87	0,887	ND	ND	Máx 0,9

DU: Grau de instauração, SV: índice de saponificação, IV: índice de iodo, CN: número cetano, LCSF: fator de cadeia longa saturada, CFPP: ponto de entupimento de filtro a frio, CP: ponto de névoa, APE: Posição alílica, BAPE: Posição bis-alílica, OS: estabilidade à oxidação, HHV: maior valor de aquecimento, η : viscosidade, ρ : Densidade, Mlt: maltose, Scs: sacarose, Tls: trealose, Lac: Lactose, ^a Knothe, *et al.* (2005).

4. CONCLUSÃO

Os cultivos heterotróficos de *Phormidium autumnale* 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

ANP (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO) 255. Provisional Brazilian Biodiesel Standard ANP. Brasil, 2003.

APHA, AWWA, WEF (American Public Health Association, American Water works Association, Water Environmental Federation). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Prot. City.*, v. 21, p. 1325, 2005.

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. *Can. J. Biochem. Phys.*, 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 Biosyst. Eng.*, v. 36, p. 1986-2013, 2014.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. A rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.*, 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. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 14, p. 217-232, 2010.

MOHAMED, M.S.; WEI, L.Z.; ARIFF, A.B. et al. Heterotrophic cultivation of microalgae for production of biodiesel. *Recent. Pat. Biotechnol.*, v. 5, p. 95-107, 2011..

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. *Quím. Nova*, v. 35, p. 2013-2018, 2012.

RIPPKA, R.; DERUELES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen Microbiol.*, v. 111, p. 1-61, 1979.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 16, p. 4316-4342, 2012.

TALEBI, A.F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. BiodieselAnalyzer[®]: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. *Biofuel Research Journal* v. 2, p. 55-57. 2014.

UNE-EN 14214, Automotive Fuels, Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines, Requirements and Test Methods, 2003.