

**APLICAÇÃO DO GLICEROL RESIDUAL DO BIODIESEL COMO
SUPLEMENTO INDUTOR DA SÍNTESE DE BIOPRODUTOS POR *Chlorella*
vulgaris.**

Laíse Andrade Neves Araújo¹; Natália Santana Carvalho²; Dr Denilson de Jesus Assis³
(orientador)

¹Universidade Salvador (UNIFACS); Email: laise145@gmail.com; ²Universidade Federal da Bahia (UFBA); Email: ncarvalho@ufba.br; ³Universidade Federal da Bahia (UFBA); Email: denilson.assis@unifacs.br.

RESUMO:

A dependência da indústria petrolífera e aos impactos ambientais decorrentes do descarte inadequado de resíduos impulsionou a busca por processos e produtos biotecnológicos. O glicerol bruto, efluente da produção de biodiesel, foi usado como fonte suplementar de carbono a microalga *Chlorella vulgaris*, visando a síntese de bioprodutos. A *Chlorella vulgaris* foi cultivada sob condições heterotrófica (ausência de luz) e mixotrófica (parcialmente iluminada) em 3 concentrações de glicerol bruto: 0,5, 2,5 e 4,5 g/L. Os resultados mostraram que a microalga se adaptou ao uso de glicerol, com o cultivo heterotrófico apresentando maior crescimento celular em 4,5 g/L de glicerol obtendo 3,36 g/L de biomassa. Foi observada a produção de exopolissacarídeos (EPS) em ambas as condições de cultivo, com destaque para o meio heterotrófico. A concentração de 2,5 g/L de glicerol se destacou como a mais promissora em ambos os cultivos.

INTRODUÇÃO:

A dependência dos derivados da indústria petrolífera, juntamente aos impactos ambientais decorrentes do descarte inadequado de resíduos tem impulsionado a busca de alternativas biodegradáveis e renováveis, principalmente com a prospecção de esgotamento dessa matriz. O desenvolvimento de processos e compostos biotecnológicos provenientes de microrganismos tem crescido como forma de suprir as demandas do mercado consumidor, de maneira ecologicamente responsável e viável economicamente (MARINO, 2018).

As microalgas são microrganismos encontrados em ambientes aquáticos, apresentando papel importante de produtor primário na cadeia alimentar. São responsáveis por cerca de 60% do oxigênio liberado na atmosfera, além de realizarem biofixação de CO₂ (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012). Dentre as microalgas, a *Chlorella vulgaris* se

encontra na categoria das microalgas verdes e tem destaque por sua produção de ácidos graxos, podendo atingir 68% da sua biomassa seca, além de seu valor proteico e capacidade de sintetizar exopolissacarídeos (EPS) (SAFI et al., 2014).

O glicerol bruto é o principal subproduto da produção de biodiesel, sendo composto por sais, metanol, ácidos graxos, impurezas, além do próprio glicerol. Sua produção alcançou um valor de 5,5 bilhões de litros em 2022, demonstrando alta disponibilidade. Seu descarte inadequado pode acarretar problemas como redução nos níveis de oxigênio em ambientes aquáticos e afetar na permeabilidade dos solos, impedindo a absorção de água e nutrientes (RUY et al., 2023).

O projeto teve como objetivo analisar o uso de diferentes concentrações de glicerol bruto como fonte suplementar de carbono no cultivo de *Chlorella vulgaris* em condições de luminosidade distintas, bem como avaliar sua capacidade na síntese de bioprodutos industrialmente atrativos.

PALAVRAS-CHAVE:

Chlorella vulgaris, glicerol, bioproduto.

MÉTODO:

Manutenção da Microalga

A cepa da microalga *Chlorella vulgaris* IBL-C105 foi cedida pelo Laboratório de Análises Aplicadas e de Biomateriais (LAPBIM - UFBA) e inoculada com meio sintético BG-11, sendo mantida em incubadora BOD a 28°C, com fotoperíodo de 12h claro/escuro. Sua propagação foi feita em biorreatores tipo Erlenmeyer e com aeração de ar comprimido.

Aclimação

O glicerol bruto utilizado foi cedido pela Petrobrás (Candeias – BA) e incorporado ao meio BG-11 numa concentração de 2 g/L (CARVALHO, 2022). Este meio foi adicionado ao inóculo em Erlenmeyers de 250 mL (200 mL útil), mantidos com rotação de 140 rpm em shaker TE- 424 (Tecnal, Brasil) a 25 °C durante 8 dias.

Condições de Cultivo

Foi realizado o cultivo com 30% (m/v) de inóculo em relação ao meio em 15 Erlenmeyers de 250 mL (200 mL útil), com emprego de 3 meios de cultivo apresentando glicerol em concentrações de 0,5, 2,5 e 4,5 g/L respectivamente. Este processo foi realizado em duas condições de cultivo diferentes: heterotrófica (ausência de luz) e mixotrófica

(parcialmente iluminado - 12h claro/escuro). Os biorreatores foram submetidos a agitação de 160 rpm a 25 °C em shaker, até haver queda prolongada da concentração de biomassa. As amostras então foram avaliadas diariamente em espectrofotômetro (PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS) com 670 nm para medição de absorbância em triplicata, assim como análise de pH.

Para monitoração do crescimento celular, foi necessário construir uma curva padrão relacionando a absorbância com produção celular em massa.

Extração de Bioprodutos

Primeiramente foi feita a separação entre biomassa e sobrenadante em centrífuga a rotação de 8.000 rpm, durante 10 min a 4°C. Do sobrenadante recuperado são extraídos o EPS com álcool etílico PA numa proporção de 3:1 (álcool:sobrenadante), posteriormente refrigeradas durante 24 h. Com isso, a solução é então centrifugada, filtrada e seca (35°C) para a sua quantificação. Em relação a biomassa obtida, é feita uma segunda centrifugação com 20 mL de água destilada para seu armazenamento em ultrafreezer (ColdLab CL580-86V) e posterior liofilização (Liotop L101).

Análise Reológica

Após extração dos polímeros extracelulares, foi feita uma solução 0,4%(m/v) do EPS quantificado em cada condição, e refrigerada por 12h para análise reológica em reômetro (Haake Rheotest 2.1).

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

A curva padrão gerou uma relação matemática ($[Absorbância] = 1,4449 \cdot [Biomassa] - 0,0672$, $R^2 = 0,9932$), da qual foi possível estabelecer as concentrações de biomassa obtida nos cultivos heterotrófico e mixotrófico, baseados no consumo de glicerol em diferentes condições de processos, conforme mostrada na Figura 1.

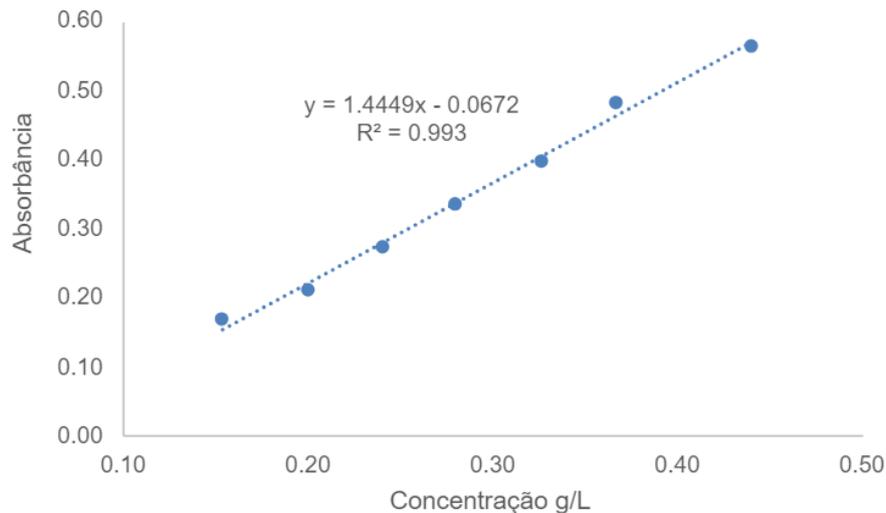


Fig.1- Curva padrão da biomassa de *Chlorella vulgaris*.

O cultivo heterotrófico permaneceu em atividade durante 6 dias (Figura 2). Através da análise dos dados, observou-se que os picos nas condições de 0,5 g/L, 2,5 g/L e 4,5 g/L de glicerol apresentaram, respectivamente, 0,57 g/L (dia 3), 3,25 g/L (dia 6) e 3,36 g/L (dia 2) de biomassa microalgal. O comportamento demonstra relação direta entre a concentração de glicerol e o crescimento celular, indicando que as microalgas em questão se adaptaram bioquimicamente ao glicerol e foram capazes de utilizá-lo como fonte exógena de energia, em razão da falta de luz artificial.

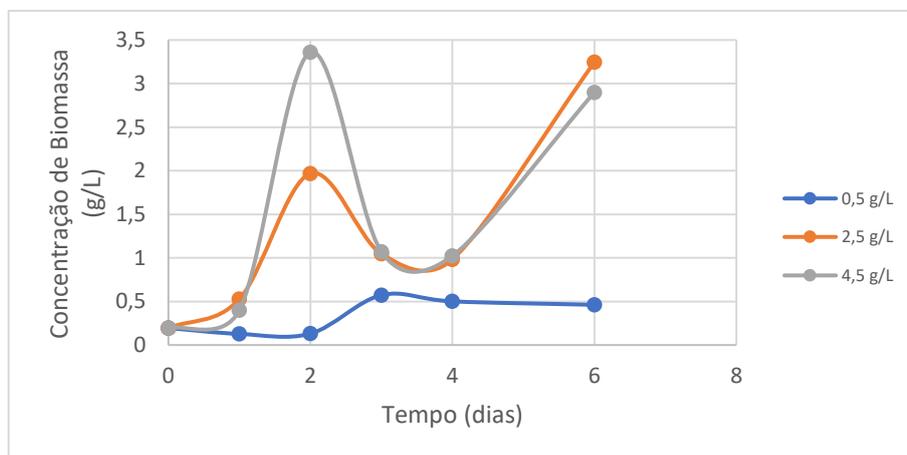


Fig.2- Concentração de biomassa *Chlorella vulgaris* em cultivo heterotrófico.

O cultivo mixotrófico foi monitorado por 7 dias, obtendo-se valor máximo de concentração no início do experimento (dia 0) em todas as amostras, com valor de 0,191 g/L, havendo queda no dia posterior. O segundo maior valor encontrado só foi possível observar no 4º dia na concentração de 4,5 g/L de glicerol, com 0,145 g/L de biomassa (Figura 3). O comportamento dos dados demonstra que a produções máximas de

biomassa ocorreram em menores quantidades e em menos dias, quando comparadas com o cultivo heterotrófico. Isso pode estar relacionado com a inserção de duas fontes de energia, sendo a luminosidade sua fonte natural e preferencial. Para melhor elucidação, é necessário quantificar o consumo de glicerol neste processo.

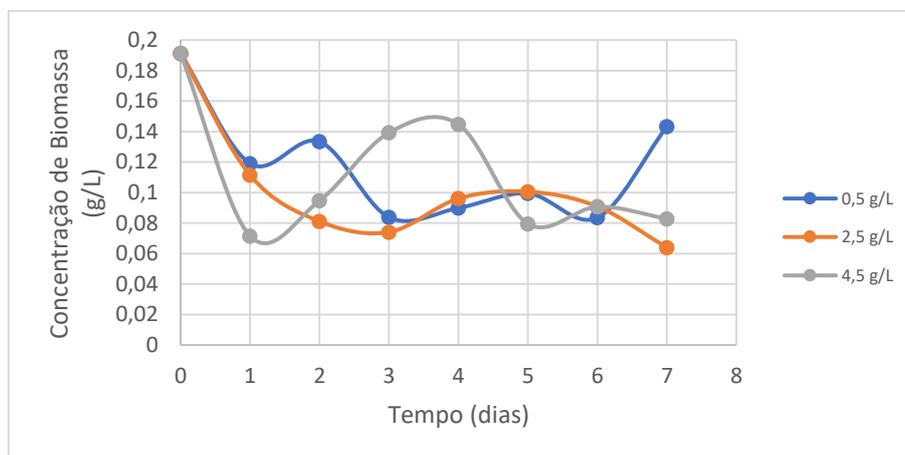


Fig.3- Concentração de biomassa *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico.

Os sobrenadantes dos cultivos são capazes de conter substâncias poliméricas extracelulares, resultantes de estresse causados por condições adversas. A principal característica dessas substâncias é o aumento da viscosidade do meio, gerando a possibilidade da obtenção de agente viscosificante.

Na Tabela 1 foi possível observar a presença de EPS em todas as produções, exceto no EPS 1 (2,5 g/L) em cultivo heterotrófico. Todas as amostras apresentaram comportamento pseudoplástico com índices de comportamento (n) menores que 1. Em relação a viscosidade aparente, o meio contendo 2,5 g/L (EPS 2) heterotrófico apresentou o maior valor, com 193,7 mPa.s. Seu índice de consistência (k) também se encontra como indicativo desses resultados, já que quanto maior seu valor, maior a viscosidade do fluido.

Parâmetros	Heterotrófico			Mixotrófico		
	EPS 1	EPS 2	EPS 3	EPS 1	EPS 2	EPS 3
Viscosidade aparente (mPa.s) *	-	193,17	180,51	161,64	175,03	153,85
k	-	2200,4	2076,1	1582,3	1862,9	1545,3
n	-	0,244	0,241	0,291	0,265	0,283
R2	-	0,968	0,978	0,968	0,972	0,973

* 25°C e 25 s⁻¹

Tabela 1- Parâmetros reológicos em cultivo de *Chlorella vulgaris*.

Em meio heterotrófico, devido à ausência de luz, a microalga passa por estresse maior, fazendo com que o EPS fosse produzido em resposta a esse ambiente, já que em condições naturais haveria contato com fonte luminosa.

Em meio mixotrófico, os resultados apresentaram fluidos levemente menos pseudoplásticos e menor viscosidade, além de ter ocorrido maior dificuldade em sua extração. Isto pode ser justificado por sua exposição a luz, que promove condições menos “agressivas” a microalga, favorecendo uma menor produção dos exopolissacarídeos relação ao heterotrófico.

Nos dois cultivos é possível perceber que a concentração de 2,5 g/L de glicerol apresentou os melhores resultados considerando cada cultivo individualmente.

CONCLUSÕES:

A partir da avaliação dos dados obtidos foi possível concluir que a *Chlorella vulgaris* é capaz de produzir bioprodutos utilizando o glicerol como suplemento de carbono. O cultivo heterotrófico apresentou um melhor resultado na produção de biomassa microalgal, atingindo valor máximo de 3,36 g/L em 4,5 g/L de glicerol. Todas as amostras de sobrenadante apresentaram comportamento pseudoplástico, implicando na síntese de exopolissacarídeos na presença desse efluente. O estresse causado pela ausência de luminosidade favoreceu essa síntese e nas características do EPS, tendo 2,5 g/L de glicerol como melhor concentração nos dois cultivos.

REFERÊNCIAS:

CARVALHO, N. S. VALORAÇÃO DO GLICEROL BRUTO A PARTIR DO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE MICROALGAS: OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPRODUTOS. Orientador: Denilson de Jesus Assis. 2022. 147 p. Dissertação (Mestrado) - Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2022.

MARINO, Victor Fernandes. Análises dos parâmetros de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RUY, Alisson Dias da Silva et al. Avaliação econômica e ambiental de um novo processo de produção de 1, 3-propanodiol a partir do glicerol bruto. 2023.

SAFI, Carl et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SCHMITZ, Roberta; MAGRO, Clinei D.; COLLA, Luciane Maria. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

FOMENTO

O trabalho contou com espaço e recursos externos disponibilizados pelo Laboratório de Pescados e Cromatografia Aplicada (LAPESCA – UFBA).