

Produção de Lipídios por *Phaeodactylum tricornutum* Utilizando Glicerina como Fonte de Carbono

Daniela Almeida Nogueira ¹, Natália Torres Ribeiro ², Carlos André Veiga Burkert ¹

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos – Laboratório de Engenharia de Bioprocessos

CEP 96203-900 - Rio Grande – RS - E-mail: ribeironatalia@hotmail.com

²Universidade Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos
Rio Grande – RS

RESUMO

*O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento celular, o acúmulo de lipídios e o perfil de ácidos graxos no cultivo mixotrófico da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, utilizando como fonte de carbono glicerina de grau analítico e glicerina residual obtida da produção de biodiesel em diferentes concentrações (0,03 M, 0,05 M e 0,07 M). Ao utilizar a glicerina de grau analítico e a glicerina residual no cultivo, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações, para a biomassa máxima. Os maiores teores de lipídios foram obtidos com 0,03 M, para a glicerina de grau analítico ($48,0 \pm 1,34$ %) e para a glicerina residual ($49,0 \pm 1,4$ %). Com relação ao perfil de ácidos graxos, foram obtidos teores maiores de ácidos graxos monoinsaturados, ficando em 45,1% em glicerina de grau analítico e 37,1% em glicerina residual.*

Palavras-chave: Glicerina, lipídios, biomassa, ácidos graxos, *Phaeodactylum tricornutum*.

INTRODUÇÃO

Devido aos inúmeros incentivos governamentais que tem impulsionado a produção de biodiesel, tal combustível está sendo produzido largamente, e um fator preocupante frente a este crescimento é o destino da glicerina excedente, uma vez que para cada tonelada de biodiesel obtido são gerados cerca de 100 Kg deste coproduto, provocando efeitos adversos à viabilidade econômica do biodiesel¹. A disposição da glicerina excedente constitui um sério problema para a produção do biodiesel, e é fundamental buscar alternativas para seu consumo, na forma bruta e/ou como derivado de alto valor agregado, viabilizando economicamente o aumento da produção de biodiesel². 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 outros³. A glicerina residual vem sendo investigada como fonte de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado, uma vez que é considerada uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por diversos micro-organismos sob condições aeróbicas e anaeróbicas para obtenção de energia metabólica⁴.



Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento celular, o acúmulo de lipídios e o perfil de ácidos graxos no cultivo mixotrófico da microalga marinha, *Phaeodactylum tricornutum*, utilizando como fonte de carbono glicerina de grau analítico e glicerina residual obtida da produção de biodiesel.

MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos foi utilizada a microalga marinha *P. tricornutum*, 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 1 L, contendo 900 mL do meio Conway⁵, utilizando água marinha com ajuste de salinidade em 28 ups. Os fotobiorreatores foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo. As condições de cultivo foram: temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de 3000 Lx , fotoperíodo integral e agitação constante através da injeção de ar estéril. Nos cultivos mixotróficos foram testados os seguintes meios de cultivo: meio Conway adicionado de glicerina de grau analítico ou glicerina residual (82,09% de pureza) em diferentes concentrações (0,03 M, 0,05 M e 0,07 M). 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 625 nm^6 e posterior conversão à concentração (g L^{-1}) por uma curva de calibração previamente construída. Ao término dos experimentos foi realizada a quantificação de lipídios utilizando o método de Bligh & Dyer⁷. Para a determinação do perfil de ácidos foi utilizada a cromatografia gasosa. 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 1(a) e 1(b) mostram as curvas de crescimento da microalga *Phaeodactylum tricornutum* ao longo de 11 dias de experimento, utilizando glicerina de grau analítico e glicerina residual, respectivamente, nas concentrações de 0,03 M, 0,05 M e 0,07 M.

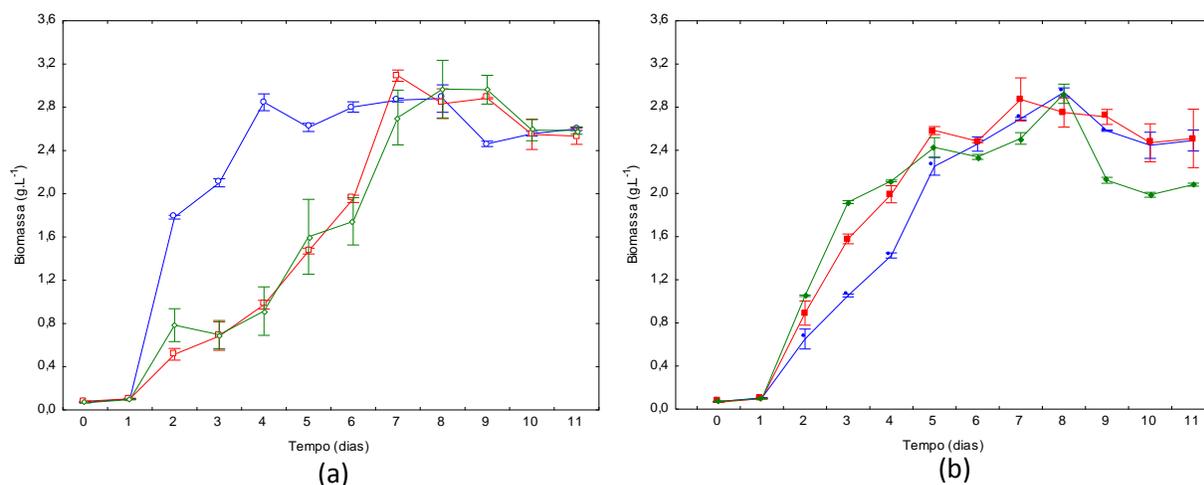
Com a glicerina de grau analítico a biomassa máxima para a concentração de 0,03 M foi atingida no 4º dia de cultivo, obtendo-se $2,84 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto que nas concentrações de 0,05 M e 0,07 M a biomassa máxima foi alcançada no 7º e 8º dia de cultivo, obtendo-se, $3,09 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,96 \pm 0,26 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Com a glicerina residual pode-se observar que a biomassa máxima para a concentração de 0,05 M foi atingida no 7º dia de cultivo, obtendo-se $2,87 \pm 0,19 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto que nas concentrações de 0,03 M e 0,07 M a maior produção de biomassa foi alcançada no 8º dia de cultivo, obtendo-se $2,93 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,92 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

Para o conteúdo lipídico da biomassa de *P. tricornutum* utilizando glicerina de grau analítico foi alcançado um teor de $48,0 \pm 1,3\%$ (0,05 M), não sendo observada diferença significativa entre as concentrações utilizadas, enquanto que para a glicerina residual o maior acúmulo de lipídios foi alcançado na concentração de 0,03 M, com $49,0 \pm 1,4\%$, diferindo significativamente das demais concentrações. Na concentração de 0,03 M, quando passou da glicerina de grau analítico para a utilização da glicerina residual, não houve diferença no teor lipídico (respectivamente, $50,4 \pm 2,0\%$ e $49,0 \pm 1,4\%$), enquanto que nas concentrações de 0,05 M e 0,07 M houve diminuição no acúmulo de lipídios, de $48,0 \pm 1,3\%$ para $43,3 \pm 0,3\%$, e de $50,0 \pm 1,4\%$ para



45,4 ± 1,3%, respectivamente. Morais⁸, em seu estudo comparando a produção de lipídios em diferentes concentrações de glicerol, utilizando a microalga *P. tricornutum*, verificou que maior concentração utilizada (0,15 M) foi a que produziu menor teor de lipídios em relação às demais concentrações utilizadas, o que permite confirmar que o aumento da concentração de glicerol não está diretamente relacionado à elevação da produção de lipídios. Uma possível explicação para a queda da produção de lipídios com o aumento na concentração de glicerina residual pode estar no fato da existência de algum interferente nesta fonte de carbono que afeta o metabolismo da microalga *P. tricornutum*.

Figura 1 – Crescimento celular de *P. tricornutum* (a) Glicerina de grau analítico: (○) 0,03 M; (□) 0,05 M; (◇) 0,07 M. (b) Glicerina residual: (●) 0,03 M; (■) 0,05 M; (◆) 0,07 M.



Com relação ao grau de insaturação, observa-se que a microalga *P. tricornutum* apresentou um percentual mais elevado de ácidos graxos monoinsaturados (AGMs) em meio contendo glicerina de grau analítico (45,1%) do que em meio contendo glicerina residual (37,1%), com destaque para os ácidos hexadecaenóico (16:1, ácido palmítoleico), 31,5% e 15,7%, respectivamente; e octadecenóico (18:1n-9, ácido oléico), com 11,61% e 20,5%, respectivamente.

Para os ácidos graxos saturados (AGSs) estes percentuais foram de 33,5% a 36,8%, respectivamente, para glicerina de grau analítico e glicerina residual, com destaque para o ácido hexadecanóico (16:0, ácido palmítico), com 24,8% e 25,9%, respectivamente. Teor semelhante foi encontrado por Borges-Campos⁹ para *P. tricornutum*, obtendo um valor de AGS de 35%. Segundo Chist¹⁰, a abundância de AGS e de AGM entre 14 e 18 carbonos aponta para o uso dessas espécies como matéria-prima para a produção de biodiesel.

Para os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) obteve-se 21,4% destes compostos quando utilizada a glicerina de grau analítico, e 26,1% quando utilizada a glicerina residual. O ácido linoleico (18:2n-6) foi obtido em maior proporção quando utilizada a glicerina residual (2,9%, sendo 0,9% para a glicerina de grau analítico), o ácido docosadienóico atingiu um teor de 2,8% para ambos os cultivos e o ácido docosahexaenóico – DHA (22:6n-3) foi obtido em um teor menor quando glicerina de grau analítico foi substituída por glicerina residual (de 0,9% para 0,6%). Os ácidos γ -linolênico (18:3n-6) e ácido α -linolênico (18:3n-3) passaram de 5,2% a



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

4,7%, e de 5,2% a 8,3%, respectivamente; e o ácido eicosapentaenóico (20:5n-3), EPA, passou de 5,0% para 2,2%, respectivamente, para glicerina de grau analítico e glicerina residual.

CONCLUSÕES

Comparando glicerina de grau analítico e glicerina residual para esta microalga, não foram observadas diferenças significativas em relação à biomassa máxima atingida para todas as concentrações de substrato. Quanto ao teor de lipídios da biomassa de *P. tricornutum*, os maiores teores foram obtidos na concentração de 0,03 M, tanto para a glicerina de grau analítico, quanto para a glicerina residual, atingindo-se valores de, respectivamente, $50,4 \pm 2,0\%$ e $49,0 \pm 1,4\%$. Para esta mesma concentração de substrato, os teores para os AGMs foram de 45,1% em glicerina de grau analítico e 37,1% em glicerina residual. Para os AGPIs, observou-se aumento no teor do ácido α -linolênico (de 5,2% para 8,3%) e no ácido araquidônico (de 1,4% para 4,6%), quando utilizada a glicerina residual. Com base no acima exposto, pode-se afirmar que é possível utilizar a glicerina residual oriunda da produção do biodiesel no cultivo da *P. tricornutum*, aproveitando desta forma o coproduto com impurezas, sem tratamentos prévios, de baixo custo, permitindo agregar valor à cadeia produtiva do biodiesel.

REFERÊNCIAS

- (1) BOWKER, M.; DAVIES, P.R.; AL-MAZROAI, L. S. Photocatalytic reforming of glycerol over gold and palladium as an alternative fuel source. **Catalysis Letters**, v. 128, n. 3-4, p. 253-255, 2009.
- (2) BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J.; LIMA, D. P. Glicerol: Um breve histórico e aplicação em síntese estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.
- (3) 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.
- (4) RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 37, p. 44-51, 2008.
- (5) WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London Ser. II**, v.25, p. 1-53, 1966.
- (6) GARCÍA, C. M. C.; SEVILLA, F. J. M.; FERNANDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: Growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 239 – 248, 2000.
- (7) BLIGH, G. E.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- (8) MORAIS, K. L. C. **Análise e desenvolvimento de Aquicultura da Microalga *Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos**. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- (9) BORGES-CAMPOS, V.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição de dez espécies de microalgas marinhas em cultivo estanque. **Ciência Rural**, v. 40, p.339 – 347, 2010.
- (10) CHIST, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294 – 306, 2007.