

## EXEMPLO 1

# BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA BIOENERGIA

Fabrine Souza de Andrade<sup>1\*</sup>, Fernanda Almeida Soares dos Santos<sup>1</sup>, Iracema Andrade Nascimento<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 40170-290, Brasil. \*fabrine\_andrade@hotmail.com

**Palavras-chave:** Microalgas, Bioprospecção, Biocombustível.

### Introdução:

Apesar da crescente demanda em energia para o setor de transporte, atualmente, a principal fonte de combustível utilizada no mundo é derivada do petróleo, que gera poluição, principalmente pela emissão de gases que intensificam o efeito estufa. Biocombustíveis, mais eco-compatíveis, podem atuar como possíveis substitutos parciais, mas o alto custo em nutrientes e água na produção agrícola de oleaginosas fomenta barreiras para seu desenvolvimento e aproveitamento. As microalgas podem apresentar uma maior eficácia como principal matéria-prima de biocombustíveis por serem mais produtivas e capazes de fixar mais CO<sub>2</sub> por área, além de poderem ser cultivadas durante o ano todo. Os custos de produção, entretanto ainda não são competitivos. A identificação de espécies produtivas em óleo (para biodiesel) e em carboidratos (para etanol) é essencial para viabilizar custos.

Para a realização do trabalho, foram escolhidas 6 espécies dulciaquícolas pertencentes ao Banco de Microalgas do Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR – IB/UFBA): *Ankistrodesmus falcatus*, *Ankistrodesmus fusiformis*, *Chlamydocapsa bacillus*, *Coelastrum indicum*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Kirchneriella lunaris*. A escolha dessas espécies relaciona-se com a necessidade de um estudo ampliado dessas microalgas, de forma a abordar a composição química em diferentes fases de crescimento, tornando possível uma avaliação e comparação entre os produtos-foco que poderão ser obtidos em cada fase.

### Objetivo:

O objetivo do trabalho foi identificar cepas locais de microalgas capazes de suprir as cadeias produtivas de biodiesel e álcool, através da identificação química dos produtos-foco contidos na biomassa, e pela dinâmica de crescimento e produtividade.

### Materiais e métodos:

As microalgas escolhidas (Tabela 1) pertencem à classe Chlorophyceae, ocorrem em água doce e estão no Banco de Microalgas do LABIOMAR/IB.

**Tabela 1:** Espécies selecionadas do Banco de Microalgas.

Família	Espécies	Local de origem
Selenastraceae	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> (Corda) Ralfs, 1848	Lagoa do Caixão (Salvador, BA)
	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda ex Korshikov, 1953	Lagoa do Caixão (Salvador, BA)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> Hindák, 1990	Instituto Oceanográfico - USP (São Paulo, SP)
Oocystaceae	<i>Kirchneriella lunaris</i> (Kirch.) Möb, 1894	Lagoa do Caixão (Salvador, BA)
Palmellopsidaceae	<i>Chlamydocapsa bacillus</i> (Teiling) Fott, 1972	Lagoa do Abaeté (Salvador, BA)
Scenedesmaceae	<i>Coelastrum indicum</i> W.B.Turner	Lagoa do Caixão (Salvador, BA)

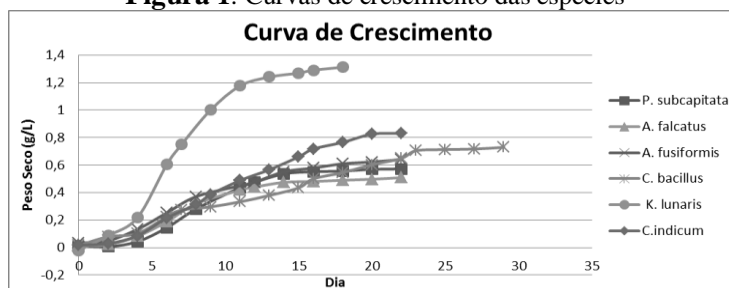
O cultivo de cada espécie foi feito em batelada iniciando-se com inóculos de 10 ml transferidos, na fase exponencial para Erlemeyers contendo CHU-13 modificado. O acompanhamento final dos cultivos foi feito em duas séries em triplicata de Erlemeyers contendo 600 ml de meio além do inoculo de transferência, na fase exponencial para cada microalga. Três das culturas de cada microalga foram retiradas no momento em que a espécie finalizou a fase exponencial e os outros 3, após 5 dias quando, em tempo médio, as microalgas finalizam a fase estacionária. Durante o cultivo todas as espécies foram mantidas sob condições controladas Standards (temperatura de 25°C, agitação constante, fotoperíodo 12:12 - claro:escuro) e sob adição

de 2% de CO<sub>2</sub>. Para determinação do produtividade, mediu-se a concentração das culturas em intervalos de 48 horas, através de densidade óptica, o que possibilitou o traçado das curvas de crescimento e a determinação dos parâmetros cinéticos. Os teores de nitrato e fosfato (Tabela 2) da fase inicial do cultivo, e final das fases exponencial e estacionária foram determinados, utilizando-se protocolos desenvolvidos no LABIOMAR. Ao final de cada fase, as culturas passaram pela separação do meio líquido e coleta através da centrifugação e secagem por liofilização. A biomassa seca de cada espécie foi submetida e analisada para identificação da quantidade de macromoléculas. Para a determinação dos teores de lipídios, foi aplicada a técnica de extração com clorofórmio/metanol (Freeman et al., 1957). Para a determinação de proteínas totais utilizou-se a técnica de Bradford (1976) e para os carboidratos, o método utilizado foi o do fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956).

## Resultados e discussão:

Os resultados em termos de crescimento com base nos quais foram determinados os parâmetros cinéticos são apresentados na Figura 1.

**Figura 1:** Curvas de crescimento das espécies



As análises químicas relativas aos teores iniciais e finais de nitrato e fosfato (Tabela 2) nas fases exponencial e estacionária para cada espécie, assim como a análise química para quantificação das principais macromoléculas celulares após as etapas de coleta e secagem da biomassa de cada espécie, são apresentadas nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2:** Teores de Nitrato e fosfato nas culturas em diferentes fases

Fase	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	<i>Chlamydocapsa bacillus</i>	<i>Coelastrum indicum</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	<i>Kirchneriella lunaris</i>
	Fase Exponencial			Fase Estacionária		
Espécies	Lipídios	Proteínas	Carboidratos	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	21,13	49,09600212	17,19218	24,425	37,80326	7,252039
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	20,97	41,170433	16,02747	22,96	39,37923	5,722914
<i>Chlamydocapsa bacillus</i>	14,1875	54,84549015	10,41031	18,36667	60,91424	8,646667
<i>Coelastrum indicum</i>	19,575	4,589645445	5,397541	24,675	5,090929	3,821111
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	31,62	20,6710557	7,305138	33,9	35,45995	5,096535
<i>Kirchneriella lunaris</i>	14,38333	64,81632102	4,917468	17,5	61,01277	4,819973

**Tabela 3:** Porcentagem de Lipídios, Proteínas e Carboidratos de cada fase das espécies.

Espécies	Fase Exponencial			Fase Estacionária		
	Lipídios	Proteínas	Carboidratos	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	21,13	49,09600212	17,19218	24,425	37,80326	7,252039
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	20,97	41,170433	16,02747	22,96	39,37923	5,722914
<i>Chlamydocapsa bacillus</i>	14,1875	54,84549015	10,41031	18,36667	60,91424	8,646667
<i>Coelastrum indicum</i>	19,575	4,589645445	5,397541	24,675	5,090929	3,821111
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	31,62	20,6710557	7,305138	33,9	35,45995	5,096535
<i>Kirchneriella lunaris</i>	14,38333	64,81632102	4,917468	17,5	61,01277	4,819973

A taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) foi obtida a partir dos valores encontrados na fase exponencial de cada espécie (Tabela 4).

**Tabela 4** - Taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) e suas relações na fase exponencial das microalgas.

Espécies	T1	T2	t (T2-T1)	N1 (mg/L)	N2 (mg/L)	N2/N1	$\mu$	D (g/L)	G (day)	G (hour)
<i>A. falcatus</i>	4	12	8	0,082918	0,440346	5,31059	0,208713	0,301109	3,321056	79,70535
<i>A. fusiformis</i>	2	10	8	0,050849	0,424005	8,33856	0,265111	0,382475	2,614551	62,74924
<i>C. bacillus</i>	4	23	19	0,10247	0,70458	6,875964	0,101475	0,146398	6,830695	3,513552
<i>C. indicum</i>	4	15	11	0,08583	0,879667	10,24892	0,211561	0,305218	3,276345	78,63227
<i>P. subcapitata</i>	4	12	8	0,043546	0,475003	10,90801	0,298687	0,430914	2,320646	55,69551
<i>K. lunaris</i>	4	11	7	0,218747	1,176549	5,378583	0,240346	0,346747	2,88395	69,21481

Dentre as espécies selecionadas, *Pseudokirchneriella subcapitata* apresenta a maior taxa de crescimento específico ( $\mu \approx 0,3$ ). Observa-se na sua composição celular, grande quantidade de lipídios (33,9%), caracterizando essa espécie como uma possível opção de matéria-prima para produção do biodiesel, devido a sua taxa de crescimento ser relativamente alta. Com a bioprospecção, é possível aliar estes dois parâmetros fundamentais, que definem qual espécie seria mais adequada como matéria-prima na produção de biodiesel.

Entre as espécies de mesmo gênero, *Ankistrodesmus falcatus* e *Ankistrodesmus fusiformis*, percebe-se, em comparação ao grupo analisado, valores mais altos de carboidratos na fase exponencial (17,19% e 16%, respectivamente) e uma taxa de crescimento específico mediana ( $\mu \approx 0,21$  e  $\mu \approx 0,26$ , respectivamente). Porém, na fase estacionária, há um aumento dos valores de lipídios, concomitante com um declínio na taxa de carboidratos, cujos valores foram bem mais baixos que os indicados em literatura, fato que necessita ser novamente averiguado. Apesar destas espécies serem consideradas boas produtoras de carboidratos, trabalhos do grupo (Nascimento et al, 2013) as apontam como boas produtoras de óleo e, portanto, apropriadas para a produção de biodiesel.

As espécies *Coelastrum indicus*, *Chlamydocapsa bacillus* e *Kirchneriella lunaris* não se mostraram como as mais adequadas para inserção na cadeia de biocombustíveis. Porém, como possuem grandes quantidades de proteínas, estas podem ser analisadas como matéria-prima para outros fins, como cosméticos, farmacêuticos, etc.

### Conclusão:

Neste trabalho, conclui-se que as espécies *Ankistrodesmus falcatus*, *Ankistrodesmus fusiformis*, *Pseudokirchneriella subcapitata* são importantes microalgas para a bioenergia, seja para a produção de biodiesel ou etanol, apresentando características fundamentais para complementar os grupos de organismos capazes de produzir combustíveis ecocompatíveis.

### Agradecimentos:

Este trabalho foi apoiado pelos Projetos n. 574712/2008-9 e 551134/2010-0 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Programa Jovens Talentos para Ciência – CAPES - Bolsista 2012/2013.

### Referências:

- NASCIMENTO, I. A. *et al.* **Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria.** BIOENERG RES, v. 6, p. 1-13, 2013.
- CABANELAS, I. T. D. *et al.* **Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal.** Bioresource Technology, v. 131, p. 429-436, 2013.

## EXEMPLO 2

# METABOLISMO MICROBIANO DA GLICERINA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS: UMA REVISÃO

Ricardo de Oliveira Mota <sup>\*1</sup>, Amaro Emiliano Trindade Silva <sup>1</sup>.

<sup>\*1</sup> Núcleo de Biotecnologia Ambiental, Mestrado Profissional em Tecnologias Aplicáveis a Bioenergia, Faculdade de Tecnologia e Ciências, FTC. Avenida Luís Viana Filho, 8812, Módulo IV, Nível I, Paralela. CEP 41.741-590, Salvador (BA).

Email: [ricardoomota@gmail.com](mailto:ricardoomota@gmail.com)

## Introdução

Glicerol (propano-1,2,3-triol) é um composto orgânico, subproduto da transesterificação de óleos vegetais com metanol/etanol via catálise básica. Para cada 1000 kg de biodiesel produzido, 100 kg de glicerol é gerado. Em 2020 estima-se que 1,4 bilhões de litros de glicerol serão gerados a partir da produção de biodiesel. O glicerol possui relativo valor agregado, todavia, alguns microrganismos são capazes de metaboliza-lo em produtos ainda mais rentáveis (MOTA, 2009; RIVALDI, 2008).

O glicerol é assimilado por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para diferentes fins, inclusive como fonte de carbono. Ao atravessar a membrana plasmática por transporte ativo ou passivo, o glicerol pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas independentes, gerando produtos de considerável valor agregado, como: ácidos succínico e propiônico, bioetanol, biohidrogênio, biosurfactantes e commodities como ácido cítrico, lipídeos, 1,3 Propanodiol e 1,2 Propanodiol (RIVALDI, 2008). O glicerol também pode ser utilizado como bioestimulante na geração de biogás e biorremediação de áreas contaminadas com produtos orgânicos (SARKAR *et al*, 2005).

## Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo fazer um levantamento da bibliografia científica e processos de patente voltados para o metabolismo microbiano da glicerina oriunda da produção de biodiesel em subprodutos de maior valor agregado, publicados entre 2001 e 2013.

## Resultados e Discussão

Efetivou-se um levantamento das publicações de artigos e registros de patentes sobre metabolismo microbiano do glicerol oriundo da produção de biodiesel. Um total de vinte e três artigos foram encontrados no banco de dados do “pubmed” utilizando-se o termo “*Glycerol*” enquanto apenas quatro artigos foram encontrados no banco de dados do “Scielo” digitando-se “Glicerol” (Figura 1). Dentre os artigos detectados no “pubmed”, ~35% foram publicados no ano de 2012. Neste mesmo período, vinte patentes foram registradas no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) e trinta e sete no “Espacenet” (Figura 2). Destas patentes, respectivamente 35% e 46% foram depositadas em 2011. Esses levantamentos mostram a relevância e atualidade do tema, assim com o crescente interesse em melhor destinar o glicerol gerado nas usinas de biodiesel.

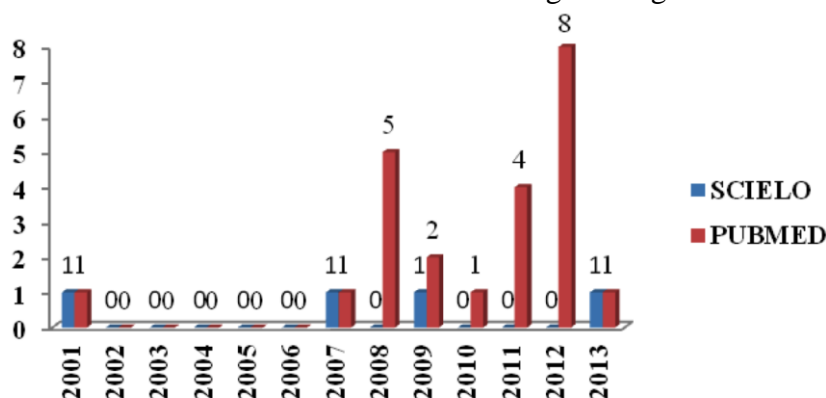


Figura 1: Artigos Publicados na Temática Metabolismo Microbiano do Glicerol de 2001 a 2013

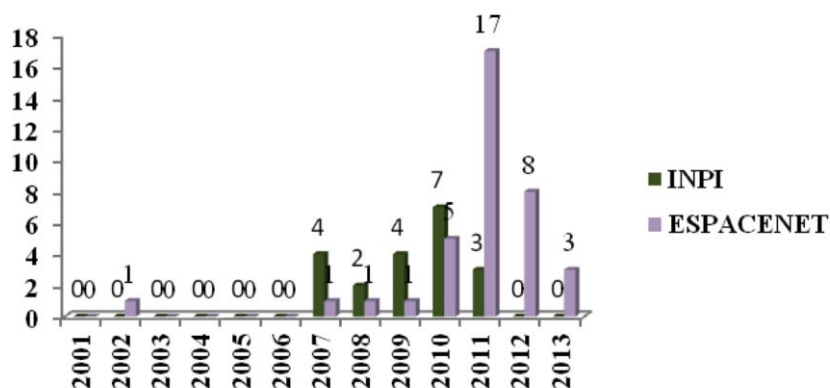


Figura 2: Patentes sobre Metabolismo Microbiano do Glicerol de 2001 a 2013

Dentre as rotas conhecidas para metabolismo microbiano do glicerol, podemos citar dois exemplos que atraem considerável interesse comercial: a produção de ácido cítrico e lipídeos, em processos fermentativos utilizando-se microrganismos eucariontes, e a produção de 1,2 e 1,3 propanodiol, em processos fermentativos utilizando-se bactérias sob crescimento anaeróbico.

A produção de ácido cítrico e de lipídeos é endereçada por algumas leveduras e fungos filamentosos capazes de armazenar grandes quantidades de lipídeos na forma intracelular, sendo conjuntamente denominados de microrganismos oleaginosos. O acúmulo desses lipídeos é associado a exaustão de fontes chave de nutrientes, mais particularmente do nitrogênio, no meio de cultura (RATLEDGE & WYNN, 2002). Neste caso, o carbono continuamente assimilado é convertido em ácido cítrico, mas este deixa de ser processado pela citrato-desidrogenase, devido a inativação desta enzima chave. O ácido cítrico acumulado nas mitocôndrias é secretado para o citoplasma e clivado pela ATP-citrato-liase em acetil-CoA. Esta unidade, por sua vez, é condensada sucessivamente pelos ácidos graxos sintases (do Inglês, *Fatty Acid Synthases*, FAS) para biossíntese de gordura (PAPANIKOLAOU & AGGELIS, 2002). Interessantemente, fontes residuais de glicerol, como o glicerol derivado das plantas de biodiesel, podem ser utilizadas como substrato para cultivo desses microrganismos oleaginosos e consequente acúmulo de ácido cítrico ou lipídeos, incluindo-se inclusive triacilgliceróis que podem ser substrato para produção de mais biodiesel.

A produção de 1,2-Propanodiol (1,2-PDO) e 1,3-Propanodiol (1,3-PDO) pode ser obtida a partir do crescimento de algumas bactérias utilizando-se o glicerol como única fonte de carbono, e sob anaerobiose. São conhecidos poucos exemplos de microrganismos capazes de fermentar glicerol em 1,2-PDO. Nestes casos, as vias fermentativas típicas requerem a conversão do glicerol em dihidroxiacetona (DHA), através de um processo glicolítico e envolvendo a ação da enzima glicerol desidrogenase (glyDH-II). Sequencialmente, a DHA é convertida em DHA fosfato (DHAP) por intermédio da enzima dihidroxiacetona cinase utilizando fosfoenol piruvato (PEP) como doador de fosfato. Por fim, o DHAP é reduzido em 1,2-PDO, pela ação da DHA cinase. No caso de 1,3-PDO, o glicerol é reduzido pela ação da enzima glicerol desidratase (*dhaB*) produzindo-se 3-hidroxi propanaldeído que, por sua vez é convertido a 1,3-PDO pela enzima dehidrogenase (*dhaT*) (CLOMBURG, 2013). Apesar de promissora, a produção de propanodiol a partir do metabolismo bacteriano é embaraçada pelo fato de que as bactérias associadas a esse metabolismo e com maior taxa de produção são pertencentes a gêneros ou até mesmo espécies patogênicas ao homem, tais como: *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium butyricum*. O 1,2-PDO é utilizado como anticongelante, em fluidos térmicos, plastificantes, termofixos e cosméticos (CLOMBURG, 2013), enquanto o 1,3-PDO pode ser precursor de polipropileno tereftalato (PPT) ou polimetileno

tereftalato (PMT), utilizados para a produção de fibras sintéticas (RAYNAUD *et al.*, 2003; GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2005, 2006).

## Conclusão

Com o desenvolvimento de processos de conversão de glicerol em produtos de maior valor agregado a produção de biodiesel pode tornar-se mais viável e fomentar o estabelecimento de biorefinarias.

## Referências

AMON, T. *et al.* Optimising methane yield from anaerobic digestion of manure: Effects of diary system and glycerine supplementation. *International Congress Series*, v. 1293, p. 217-220, jul. 2006;

BACKES, G. M. *Avaliação do processo de digestão anaeróbia na geração de energia a partir de dejetos suínos e bovinos de leite com suplementação de glicerina residual bruta oriunda da produção de biodiesel*. Centro Universitário Univates. Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento. Tese de Dissertação de Mestrado. Lajeado (RS), 2011;

CLOMBURG, J. M. and GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends Biotechnol* 31: 20-28, 2013;

GONZÁLEZ-PAJUELO M, MEYNIAL-SALLES I, Mendes F, Andrade JC, VASCONCELOS I, SOUCAILLE P. Metabolic engineering of *Clostridium butyricum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metab Eng* 2005;7:329–36;

GONZÁLEZ-PAJUELO M, MEYNIAL-SALLES I, MENDES F, SOUCAILLE P, VASCONCELOS I. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266 and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1 (pSPD5). *Appl Env Microbiol* 2006;72:96-101;

MOTA, C. J. A, SILVA, C. X. A, GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 639-648, 2009;

PAPANIKOLAOU S., AGGELIS G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol.* 2002 Mar;82(1):43-9;

RATLEDGE C., WYNN J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol.* 2002; 51:1-51;

RAYNAUD C, SARÇABAL P, MEYNIAL-SALLES I, CROUX C, SOUCAILLE P. Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PDO) operon of *Clostridium butyricum*. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:5010–5;

RIVALDI, J. D., SARROUB, B. F., FIORILO, R., SILVA, S. S. Glicerol de Biodiesel. *Biociência & Desenvolvimento* n° 37, p44, 2008;

SARKAR, D *et al.* Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, n. 136, p. 187 – 195, 2005;