

## Área: Tecnologia de Alimentos

# BALANÇO DE ÁGUA DO BIODIESEL (3G) PRODUZIDO A PARTIR DO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *PHORMIDIUM AUTUMNALE*

**Paola Lasta; Washington Henrique Vilas Boas; Stefania Fortes**

**Siqueira; Mariany Costa Deprá; Leila Queiroz Zepka; Eduardo Jacob-Lopes\***

*Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil*

*\*e-mail: jacoblopes@pq.cnpq.br*

**RESUMO** – O objetivo do trabalho foi estabelecer o balanço de água do biodiesel 3G produzido a partir do cultivo heterotrófico de *Phormidium autumnale*. O estudo centrou-se na otimização dos parâmetros do processo e na avaliação da pegada de água azul e verde em diversos cenários baseados em microalgas. Os resultados demonstraram uma maior produção de biomassa (6,17 m<sup>3</sup>/kg) e lipídeos (1,23 m<sup>3</sup>/kg) no cenário C40. Por outro lado, uma menor pegada de água foi alcançada no cenário C20 com uma pegada de água de 14,19 m<sup>3</sup>/kg e 3,95x 10<sup>-5</sup> m<sup>3</sup>/kg para a pegada de água verde e azul, respectivamente.

**Palavras-chave:** microalgas; biodiesel (3G); cultivo heterotrófico.

## 1 INTRODUÇÃO

A expansão esperada no setor de bioenergia no mundo vem ao encontro do desenvolvimento sustentável. No entanto, a produção de biocombustíveis é uma preocupação crescente na sociedade moderna, em parte devido à produção da biomassa energética e suas relações com a escassez de recursos hídricos. Assim, a avaliação do uso da água no ciclo de vida de produtos e serviços torna-se uma ferramenta importante de gestão, principalmente quando relacionada ao processo de produção de biocombustíveis (MÜLLER, 2012).

A produção de combustíveis fósseis a partir de microalgas ganhou atenção significativa ao longo das últimas décadas. Muitas espécies de microalgas apresentam alto potencial devido ao seu rápido crescimento celular e por possuírem alto teor de lipídeos que após esterificados são adequados para a produção de biodiesel, em comparação com biomassa terrestre (LOOR et al., 2016).

Esses recursos permitem que as microalgas apresentem diversas vantagens sobre culturas oleaginosas convencionais como o milho, soja e girassol, como alta produtividade lipídica, capacidade de duplicação da concentração celular em 24h e a não competitividade por terras aráveis (RASHID, et al. 2014). No entanto, a produção de biocombustível à base de microalgas ainda não é economicamente competitiva com as fontes de combustíveis fósseis tradicionais, devido as altas demandas de água exigidas nos sistemas de cultivo.

O balanço de água é classificado em três principais tipos de pegada de água: a verde, azul e cinza. A pegada de água verde está relacionada a água que é adicionada ao produto durante o processo de produção do

biodiesel, já a pegada de água azul relaciona-se com as águas superficiais ou subterrâneas que evaporam ou são agregadas ao produto final. Por outro lado, a pegada de água cinza está relacionada ao volume de água necessário para diminuir a poluição gerada durante o processo produtivo que será jogada para a bacia. As microalgas apresentam grande vantagem em relação a pegada de água cinza, uma vez que esses micro-organismos têm a capacidade de remover a carga de poluente do efluente que será lançada na bacia hidrográfica (DEPRÁ, 2018).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi estabelecer a balanço de água do biodiesel 3G produzido a partir do cultivo heterotrófico de *Phormidium autumnale*. O estudo centrou-se na otimização dos parâmetros do processo e na avaliação da pegada de água azul e verde em diversos cenários baseados em microalgas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Definição de meta e escopo

Os dados experimentais foram obtidos a partir de experimentos realizados em laboratório, onde foram selecionados os requisitos necessários para o processo e para o inventário. Posteriormente, os dados foram normalizados para uma unidade funcional de 1 kg de biodiesel.

Como a indústria de biocombustíveis de microalgas ainda é um processo recente, faltam dados sobre a produção de microalgas em grande escala. No presente estudo, foram utilizadas observações laboratoriais combinadas com dados publicados de processos industriais conhecidos (PRAGYA et al, 2016; XU et al, 2011; ADESANYA et al, 2014).

### 2.2 Cultivo e colheita de biomassa de microalgas

As culturas de *Phormidium autumnale* foram originalmente isoladas do deserto de Cuatro Ciénegas (26°59'N, 102°03'W-México). As culturas de estoque foram propagadas e mantidas em ágar-ágar solidificado (20 g/L) contendo meio BG11 sintético (RIPPKA et al, 1979). As condições de incubação utilizadas foram a temperatura de 25°C, uma densidade de fluxo de fótons de 15  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  e um fotoperíodo de 12:12 h (luz: escuro). Para obter os inóculos na forma líquida, utilizou-se 1 mL de meio sintético estéril onde ficaram inclinados, as colônias foram raspadas e depois homogeneizadas com a ajuda de tubos misturadores. Todo o procedimento foi realizado de forma asséptica.

### 2.3 Descrição do processo

Os experimentos foram realizados em um biorreator, alimentado com 2,0 L de meio de cultura. As condições experimentais foram as seguintes: concentração inicial de inóculo de 100 mg/L, temperatura de 30°C, pH ajustado para 7,6, aeração de 1 VVM (volume de ar por volume de cultura por minuto) e ausência de luz. O meio de cultura consistiu em meio sintético BG11 modificado e suplementado com diferentes concentrações de sacarose para obter relações carbono/nitrogênio de 20 (C20), 30 (C30), 35 (C35), 40 (C40), 50 (C50), 60 (C60), 70 (C70) e 80 (C80). A concentração de sacarose foi ajustada estequiometricamente de acordo com a metodologia

proposta por Francisco et al, 2015.

As amostragens foram realizadas de forma asséptica a cada 24 horas durante a fase de crescimento do micro-organismo. A dinâmica do pH para o cultivo em biorreator, foi determinada por potenciômetro e a concentração celular através de gravimetria por meio da filtração de um volume conhecido em filtro 0,45µm de diâmetro. A concentração celular e a quantidade de lipídeos foram determinadas através de gravimetria.

Para a extração de lipídeos totais da biomassa, foi utilizado 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 quantidade de lipídeos foi determinada por gravimetria a partir do extrato total de clorofórmio, evaporando-se o solvente em atmosfera de nitrogênio e posteriormente seco em estufa e submetido a peso constante.

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).

## 2.4. Pegada de água

A pegada de água (WF) foi determinada pela soma da água utilizada no sistema durante todas as etapas do processo de biodiesel de microalgas, expressa em m<sup>3</sup>/kg de biodiesel.

### 2.4.1.1. Pegada de água azul

A pegada de água azul refere-se à quantidade de água incorporada no produto. Foi determinado pela taxa de evaporação de acordo com a Eq. (1):

$$WF_{\text{azul}} = \text{evaporação da água azul} + \text{incorporação} + \text{fluxo de retorno} \quad (1)$$

### 2.4.2.2. Pegada de água verde

A pegada de água verde refere-se ao volume de água consumida no processo de produção, mais a água incorporada no cultivo de acordo com a Eq. (2):

$$WF_{\text{verde}} = \text{evaporação da água verde} + \text{incorporação} + \text{fluxo de retorno} \quad (2)$$

Neste estudo, a pegada de água associada ao processo de cultura é causada pela evaporação, portanto, não será considerada a pegada de água cinza, uma vez que as microalgas têm a capacidade de remoção da carga de poluição do efluente que será lançada na bacia hidrográfica, portanto, será considerado apenas a pegada de água verde e azul.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Balanco de água

O balanço da água do processo para a obtenção do biodiesel inclui todas as entradas e saídas de água ao longo de toda a cadeia produtiva. Nesse sentido, foram calculadas a pegada de água verde e azul, de todo o processo de produção de biodiesel a partir da microalga *Phormidium autumnale* e os resultados estão resumidos na Tabela I.

**Tabela I**

Produção de biomassa, lipídeos e balanço de água da produção de biodiesel a partir de microalgas.

Cenários	Biomassa	Óleo	Verde WF	Azul WF	Total WF
	(Kg/m <sup>3</sup> )	(Kg/m <sup>3</sup> )	m <sup>3</sup> /kg de biodiesel	m <sup>3</sup> /kg de biodiesel	m <sup>3</sup> /kg de biodiesel
C20	2,7 <sup>a</sup> ±0,03	0,54 <sup>a</sup> ±0,01	14,19 <sup>a</sup> ±0,01	3,95x10 <sup>-5</sup> <sup>a</sup> ±0,01	14,19 <sup>a</sup> ±0,01
C30	5,26 <sup>b</sup> ±0,03	1,05 <sup>b</sup> ±0,01	21,28 <sup>b</sup> ±0,01	7,68x10 <sup>-5</sup> <sup>b</sup> ±0,01	21,28 <sup>b</sup> ±0,01
C35	5,6 <sup>c</sup> ±0,03	1,12 <sup>c</sup> ±0,01	24,82 <sup>c</sup> ±0,02	8,19x10 <sup>-5</sup> <sup>b</sup> ±0,01	24,82 <sup>c</sup> ±0,01
C40	6,17 <sup>d</sup> ±0,03	1,23 <sup>d</sup> ±0,01	28,38 <sup>d</sup> ±0,01	9x10 <sup>-5</sup> <sup>c</sup> ±0,01	28,38 <sup>d</sup> ±0,01
C50	5,33 <sup>b</sup> ±0,03	1,06 <sup>b</sup> ±0,02	35,48 <sup>e</sup> ±0,01	7,75x10 <sup>-5</sup> <sup>b</sup> ±0,01	35,48 <sup>e</sup> ±0,01
C60	2,9 <sup>e</sup> ±0,03	0,58 <sup>f</sup> ±0,01	42,57 <sup>f</sup> ±0,01	4,24x10 <sup>-5</sup> <sup>a</sup> ±0,01	42,57 <sup>f</sup> ±0,01
C70	1,9 <sup>f</sup> ±0,03	0,38 <sup>g</sup> ±0,02	49,68 <sup>g</sup> ±0,01	2,7x10 <sup>-5</sup> <sup>d</sup> ±0,01	49,68 <sup>g</sup> ±0,01
C80	1,68 <sup>g</sup> ±0,03	0,33 <sup>h</sup> ±0,01	56,28 <sup>h</sup> ±0,01	2,41x10 <sup>-5</sup> <sup>d</sup> ±0,01	56,28 <sup>h</sup> ±0,01

Dentro da mesma coluna, letras iguais não apresentam diferença (p <0,05) pelo teste de Tukey.

O melhor desempenho do processo foi evidenciado entre os cenários C30-C50, com produção máxima de biomassa e lipídeos no cenário C40. Nessa condição, a produção média de biomassa foi de 6,17 kg/m<sup>3</sup> resultando em uma produção de lipídeos de 1,23 kg/m<sup>3</sup>. Estes resultados mostram que no metabolismo heterotrófico a produção de lipídeos intracelulares pela microalga *Phormidium autumnale* é criticamente afetado pela relação carbono/nitrogênio no meio de cultura.

A pegada de água azul representa os requisitos de água que foram incorporadas durante o processo de produção de biodiesel. O WF azul varia entre os cenários; o menor consumo de água azul é representado pelo cenário C80, C70 e C20, com 2,41x10<sup>-5</sup> m<sup>3</sup>/kg; 2,7x10<sup>-5</sup> m<sup>3</sup>/kg e 3,95x10<sup>-5</sup> m<sup>3</sup>/kg, respectivamente. Além disso, para a pegada de água verde, os cenários que demonstraram que o menor consumo de água são representados nos cenários C20 (14,19 m<sup>3</sup>/kg), C30 (21,28 m<sup>3</sup>/kg), C35 (24,82 m<sup>3</sup>/kg) seguido de C40 (28,38 m<sup>3</sup>/kg). De acordo com Handler et al. 2012, uma vez que os biorreatores heterotróficos são sistemas fechados, eles só necessitam do volume necessário para o cultivo da biomassa. Este volume é em média 0,00075 m<sup>3</sup>/kg, que se refere à quantidade de água utilizada pela biomassa para o metabolismo, o que justifica o baixo consumo de água em todos os processos.

Em contraste, o WF total é a soma de WFs azul e verde, e é representado pelo o equilíbrio entre elas. Em todos os cenários, as pegadas totais de água aumentam com o aumento da concentração de sacarose utilizada durante o processo, como o esperado. O cenário que apresentou o menor consumo de água foi o C20 (3,95x10<sup>-5</sup> m<sup>3</sup>/kg), seguido de C30, C35 e C40.



A fim de se obter a viabilidade do processo, a pegada de água do biodiesel de microalgas foi comparada com a pegada de água (WF) para a produção de bioetanol. De acordo com Pereira et al. 2015, para o bioetanol, a pegada total de água produzida a partir de cana-de-açúcar é de 7700 m<sup>3</sup>/kg ou 4600 m<sup>3</sup>/kg de água verde, 2500 m<sup>3</sup>/kg de água azul, considerando as necessidades de irrigação e 500 m<sup>3</sup>/kg de água cinza. Em contraste, o biodiesel de microalgas tem uma menor pegada de água em comparação com o bioetanol, porque as microalgas não possuem WF cinza, devido ao metabolismo heterotrófico desses microrganismos ter capacidade de conversão simultânea dos poluentes presentes nas águas residuárias.

Por outro lado, a pegada de água do biodiesel a partir do óleo de soja é muito maior do que a microalga, porque exige quantidades relativamente grandes de irrigação em combinação com menores rendimentos de biodiesel por unidade de cultivo (MEKONNEN et al., 2011). A pegada de água para o biodiesel do óleo de soja é de cerca de 42x10<sup>-5</sup> m<sup>3</sup>/kg de água por quilo de biodiesel produzindo, esse valor é muito maior quando comparado com o cenário (C40 (28,38 m<sup>3</sup>/kg)) de maior consumo de água no estudo.

## 4 CONCLUSÃO

O balanço de água biodiesel de terceira geração produzido a partir do cultivo heterotrófico de *Phormidium autumnale* demonstraram uma maior produção de biomassa (6,17 m<sup>3</sup>/kg) e lipídeos (1,23 m<sup>3</sup>/kg) no cenário C40. Por outro lado, uma menor pegada de água foi alcançada no cenário C20 com uma pegada de água de 14,19 m<sup>3</sup>/kg e 3,95x10<sup>-5</sup> m<sup>3</sup>/kg para a pegada de água verde e azul, respectivamente. Assim, o biodiesel produzido a partir do cultivo heterotrófico da microalga *Phormidium autumnale* torna-se uma fonte alternativa competitiva, uma vez que, usa menos água para produção de biodiesel em comparação com outras matérias-primas convencionais.

## 5 AGRADECIMENTOS

O financiamento para esta pesquisa foi fornecido pela Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS).

## 6 REFERÊNCIAS

- BLIGH, E. G., DYER, J. W. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can. J. Biochem. Physiol.* v.37, p.911–917, 1959.
- DEPRÁ, M. C., ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E. **Introductory Chapter: Life Cycle Assessment as a Fundamental Tool to Define the Biofuel Performance.** Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/frontiers-in-bioenergy-and-biofuels/introductory-chapter-life-cycle-assessment-as-a-fundamental-tool-to-define-the-bio-fuel-performance>>. Acesso em: 25/03/2018.
- FRANCISCO, E. C., FRANCO, T. T., ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E. **From waste-to-energy: the process integration and intensification for bulk oil and biodiesel production by microalgae.** *J. Environ. Chem. Eng.* **3**, p. 482-487, 2015.

HANDLER, A. R., CANTER, C. E., KALNES, T. N., LUPTON, F.S., KHOLIGOV, O., SHONNARD, D.R., BLOWERS, P. **Evaluation of environmental impacts from microalgae cultivation in open-air raceway ponds: Analysis of the prior literature and investigation of wide variance in predicted impacts.** *Algal Res* **1**, p.83-92, 2012.

HARTMAN, L., LAGO, R. C. A. **A rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids.** *Lab. Pract.*, v. 22, p. 475-476, 1976.

LOOR, A., ORTEGA, D.; LODEIROS, C.; SONNENHOLZNER, S. **Early life cycle and effects of microalgal diets on larval development of the spiny rock-scallop, *Spondylus limbatus* (Sowerby II, 1847).** *Aquaculture*, v. 450, p. 328-334, 2016.

MEKONNEN, M. M., HOEKSTRA, A. Y. **The green, blue and grey water footprint of crops and derived crop products.** *Hidrol. Earth Syst. Sc.* **15**, p. 1577-1600, 2011.

MÜLLER, G. T. **Emprego da pegada hídrica e da análise de ciclo de vida para a avaliação do uso da água na cadeia produtiva do biodiesel de soja.** *Lume. Repositório digital.* Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/61924>>. Acessado em: 30/03/2018.

PEREIRA, L. G., CHAGAS, M. F., CAVALETT, O., BONOMI, O. **Life cycle assessment of butanol production in sugarcane biorefineries in Brazil.** *J. Clean. Prod.* **96**, p.557-568, 2015.

PRAGYA, N., PANVED, K. **Life cycle assessment of green diesel production from microalgae.** *Renew. Energ.* **86**, p. 623-632, 2016.

RASHID, N., REHMAN, M., SADIQ, M. **Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production.** *Renew. Sust. Energ. Reviews*, v.40, p. 760-778, 2014.

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