

## CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO DO GLICEROL PROVENIENTE DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT BURMAN

**Felipe A. F. Antunes, Stephanie C. T. Tabuchi, Thais S. S. Milessi, Daniel J. L. L. Pinheiro, Tayrone D. Esteves, Messias B. Silva, Silvio S. da Silva**

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, EEL-USP/Departamento de Biotecnologia, CP 116 - CEP: 12602-810 Lorena-SP, felipeantunes22@gmail.com

**Resumo-** O glicerol é o principal subproduto da produção do biodiesel obtido durante a transesterificação de óleos. Em função do aumento da demanda desse biocombustível, surge a necessidade de estudos para novas aplicações desse subproduto, o qual se descartado ao meio ambiente, pode ter alto impacto ambiental. Uma alternativa é o emprego do glicerol como fonte de carbono em processos fermentativos, porém, a necessidade de preparar este composto para uso como substrato é evidente, uma vez que a matéria-prima e o processo utilizado para a fabricação do biodiesel podem influenciar em sua pureza, necessitando assim de um pré-tratamento para viabilizar o processo. Neste contexto, o presente trabalho visou apresentar um estudo exploratório de condições de tratamento do glicerol de biodiesel por meio das variáveis tempo de decantação, temperatura de aquecimento, tempo de aquecimento e pH final da acidificação de um processo. Para isso, utilizou-se um Planejamento experimental fatorial fracionado saturado Plackett Burman, consistindo de 8 experimentos, através do qual observou-se que a variável temperatura de aquecimento é significativa ao processo com 95% de confiança.

**Palavras-chave:** Aproveitamento de subprodutos, biotecnologia, glicerol

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

### Introdução

Atualmente, cada vez mais fontes renováveis de energia assumem importante papel no mundo contemporâneo devido à possibilidade de escassez de reservas de petróleo, aos preços flutuantes dos combustíveis fósseis e à poluição ambiental gerada pelo emprego desses combustíveis. A busca por fontes de energia renováveis e que assegurem o desenvolvimento sustentável levou a busca intensiva de combustíveis alternativos, como o biodiesel (BARBOSA, 2009; RIVALDI *et al*, 2007).

O método mais utilizado para a produção de biodiesel é o de transesterificação de diferentes tipos de óleos, que estimulados por um catalisador alcalino reagem quimicamente com um álcool, geralmente metanol ou etanol, para produzir ésteres (biodiesel) e glicerol (GONÇALVES *et al.*; 2009; MOTA *et al*, 2009). A Figura 1 apresenta um esquema da reação de transesterificação na produção de biodiesel.

A crescente produção de biodiesel tem causado um acúmulo de glicerol e sua consequente desvalorização. (CHI *et al.*, 2007). O estudo de novas aplicações para esse resíduo faz-se cada vez mais necessário, já que devido a sua alta demanda bioquímica de oxigênio, o glicerol não pode ser depositado em aterros, e as indústrias que utilizam o glicerol como matéria

prima não terão capacidade de absorver esse excesso de glicerina produzida (GONÇALVES *et al.*, 2009).

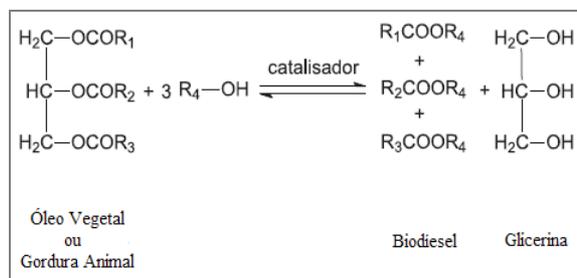


Figura 1 – Reação global de transesterificação de triacilglicerídeos para produção de biodiesel.

Uma alternativa é o emprego do glicerol como substrato em processos fermentativos, uma vez que este composto pode ser utilizado como fonte de carbono sob condições aeróbicas por muitas espécies de microrganismos, reduzindo os custos de produção e obtendo-se produtos de interesse comercial como ácido succínico e ácido propiônico (SILVA *et al* 2009; ARRUDA *et al*, 2007; WANG *et al.*, 2001; NEVOIGT, 1997). Sabe-se que diversos microrganismos são capazes de metabolizar o glicerol, e há vários estudos sendo desenvolvidos, principalmente com bactérias e leveduras (RIVALDI, 2007; AMARAL *et al*. 2009). Como

exemplo de uso de glicerol proveniente de biodiesel em processos fermentativos podemos citar a produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum* (REHMAN et al., 2008), hidrogênio e etanol por *Enterobacter aerogenes* (ITO et al. 2005), bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (BARBOSA 2009) e ribonucleotídeos por *Hansenula anomala* e *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* (RIVALDI, 2008).

A pureza do glicerol proveniente do biodiesel varia de 55 a 90%, dependendo da matéria-prima e do processo utilizado na fabricação do biocombustível (AMARAL et al., 2009). Entre as impurezas encontradas podemos citar NaOH, metanol, ácidos graxos livres, sais de ácido graxo, ésteres, compostos de enxofre, proteínas e minerais (THOMPSON; HE, 2006). Tais impurezas fazem com que o glicerol de biodiesel tenha baixo valor agregado. Além disso, decréscimo na viabilidade e mudanças morfológicas como perda de forma e danos na membrana celular foram observados em células expostas a ácidos graxos insaturados (HAZELL; GRAHAM, 1990; KNAPP; MELLY, 1986), que podem estar presentes no glicerol bruto oriundo da produção à partir de óleos vegetais (REHMAN et al., 2008). Desta maneira, entre os desafios da utilização deste subproduto em processos fermentativos, destaca-se a necessidade de uma etapa de tratamento visando a remoção dessas impurezas e de sais como cloretos, fosfatos ou sulfatos de sódio ou potássio, os quais permanecem na fase do glicerol e podem interferir no metabolismo microbiano (REHMAN et al., 2008; ITO et al., 2005). Já a presença de nutrientes adicionais como fontes de carbono, nitrogênio, cálcio, magnésio, fósforo e sódio no resíduo de glicerol exercem efeito positivo no crescimento de microrganismos (ÇELIK et al., 2008).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo exploratório por meio de um Planejamento experimental fatorial fracionado saturado Plackett Burman buscando identificar melhores e/ou alternativas condições para o tratamento do glicerol bruto proveniente de biodiesel visando sua utilização como fonte de carbono em processos fermentativos.

## Metodologia

**Matéria prima e tratamento do glicerol bruto:** Utilizou-se glicerina gentilmente cedida pela Usina de Biodiesel Bioverde Indústria e Comércio de Biocombustíveis Ltda, localizada na cidade de Taubaté/SP.

O glicerol foi submetido a tratamento baseado na metodologia determinada por Rehman et al. (2008) e modificada por Barbosa (2009), a qual

constitui na adição de ácido fosfórico 85% e aquecimento à 70°C, visando separar sabão e outras impurezas e neutralizar o excesso de NaOH utilizado como catalizador no processo de transesterificação, seguidos por decantação em funil de separação, etapa na qual observa-se a formação de duas fases distintas, uma contendo glicerol e outra ácidos graxos, possibilitando-se assim a obtenção do glicerol tratado.

**Avaliação da influência de fatores no tratamento do glicerol:** Avaliou-se a influência na eficiência do tratamento do glicerol das seguintes variáveis: Tempo de decantação (A); Temperatura de aquecimento (B); Tempo de aquecimento (D) e pH final da acidificação (E). Para isso empregou-se um Planejamento Fatorial Fracionado saturado Plackett-Burman L8. Os níveis das variáveis empregados se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 – Níveis das variáveis do planejamento Plackett-Burman

Variável	Nível (+)	Nível (-)
Tempo de decantação (A)	48 h	24 h
Temperatura de Aquecimento (B)	80°C	60°C
Tempo de Aquecimento (D)	4 h	2 h
pH final (E)	7,0	4,0

Como variável resposta considerou-se a concentração final de glicerol em g.L<sup>-1</sup> observada após o tratamento. A matriz do planejamento Plackett-Burman é mostrada na Tabela 2. As variáveis C, F e G presentes na matriz correspondem às variáveis fantasmas envolvidas no processo com o intuito de se estimar o erro experimental.

**Métodos Analíticos:** As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sep pak (MILIPORE) e a determinação das concentrações de glicerol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo SCHIMADZU-LC 10 AD (Kyoto – Japão), equipado com coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), acoplado a um detector de índice de refração RID-6A, com eluente ácido sulfúrico 0,01N a um fluxo de 0,6 µl.min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 45°C e volume de amostra injetado de 20µl.

Tabela 2 – Matriz experimental do planejamento fatorial Plackett-Burman

Ensaio	A	B	C	D	E	F	G
1	+	+	+	-	+	-	-
2	+	+	-	+	-	-	+
3	+	-	+	-	-	+	+
4	-	+	-	-	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-	+
7	-	+	+	+	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-

## Resultados

Os ensaios relativos ao tratamento do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel segundo o planejamento fatorial Plackett-Burman, assim como suas respectivas concentrações de glicerol obtidas após o tratamento (variável resposta) encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações de glicerol obtidas no planejamento Plackett-Burman

Ensaio	A	B	C	D	E	F	G	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )
1	+	+	+	-	+	-	-	949,4
2	+	+	-	+	-	-	+	946,4
3	+	-	+	-	-	+	+	729,8
4	-	+	-	-	+	+	+	912,8
5	+	-	-	+	+	+	-	829,0
6	-	-	+	+	+	-	+	953,3
7	-	+	+	+	-	+	-	1036,8
8	-	-	-	-	-	-	-	684,9

Com base nos valores de concentração de glicerol obtidos, calculou-se os efeitos dos fatores, a variância global e o erro experimental do planejamento. A posse desses valores possibilitou os cálculos dos valores de t, os quais foram comparados ao valor do t crítico, obtido por meio da tabela Critical Values of t, utilizando-se o número de variáveis fantasmas, ou seja, 3 como grau de liberdade em nível de 5%. No teste de significância, se o t calculado for maior ou igual ao t crítico, então, o fator em questão é significativo, com um grau de confiança igual a 95%. Os valores dos efeitos de cada variável envolvida no processo

assim como seus respectivos valores de t estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Efeitos e teste t das variáveis envolvidas no planejamento Plackett-Burman

Variáveis	Efeitos	t
A	-33,3	-0,77
B	162,1	3,74
C	74,0	-
D	122,1	2,82
E	61,7	1,42
F	-6,5	-
G	10,6	-

\*tcrítico = 3,182 para grau de liberdade = 3

Uma vez que o valor tabelado para t crítico neste caso é de 3,182, observa-se que a variável B (Temperatura de aquecimento) mostrou-se significativa ao processo.

## Discussão

Em todos os ensaios realizados no planejamento observou-se considerável concentração de glicerol após o tratamento, o que evidencia a aplicabilidade desta metodologia na obtenção de um glicerol proveniente da produção de biodiesel empregável como fonte de carbono em processos fermentativos. A viabilidade do glicerol como fonte de carbono também foi confirmada por Rivaldi, (2008) Barbosa, (2009); Rehman et al. (2008) e Ito et al. (2005), os quais realizaram ensaios fermentativos com *Hansenula anomala* e *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Clostridium butyricum* e *Enterobacter aerogenes*, respectivamente, e observaram o crescimento desses microrganismos em meios nos quais glicerol proveniente do biodiesel foi utilizado como substrato.

Observa-se que, utilizando-se um grau de confiança de 95%, a única variável significativa no processo foi a Temperatura de Aquecimento (B), cujo efeito foi positivo, indicando que o nível alto (80°C) é o mais adequado ao processo. Tal fato pode ser explicado pela maior evaporação de impurezas presentes no glicerol bruto, como o metanol, que quando presente no meio de fermentação pode ocasionar a inibição do crescimento do microrganismo.

Ressalta-se que os fatores que não apresentaram significância poderão ser significantes para esse mesmo processo, considerando outros graus de confiança que não o de 95%. É o que acontece com a variável Tempo

de Aquecimento (D), que nas condições analisadas não foi significativa, porém se fosse utilizado um grau de confiança de 90% o t crítico seria de 2,353 e esta variável seria então significativa.

As demais variáveis (A e E) na região e condições de estudo em questão não se provaram significativas, podendo assim ser empregadas no nível de maior interesse ao processo.

Desta maneira, o melhor ajuste a ser aplicado para este estudo seria acidificação até pH 7,0; 24 horas de decantação, seguida de aquecimento a 80° C durante 2 horas e uma segunda decantação de 24 horas. Desta maneira uma quantidade significativa de glicerol poderia ser obtida utilizando as condições mais interessantes economicamente e de acordo com os resultados obtidos no estudo do planejamento fatorial empregado.

Como a condição de ajuste não se encontra na matriz experimental do planejamento é interessante a realização de experimentos de confirmação para a validação dos resultados obtidos. O ensaio 7, que mais se aproxima do melhor ajuste, mostrou-se o mais eficiente entre todos os ensaios, rendendo uma concentração de 1036,8 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, este ensaio evidencia a necessidade de estudar possíveis interações entre B e D, uma vez que neste tratamento a variável D foi utilizada em seu nível positivo.

Neste trabalho observou-se que o tempo de decantação pode não ter sido suficiente para se obter duas fases distintas, uma contendo glicerol e a outra ácidos graxos. Assim, em um estudo seguinte seria interessante investigar um intervalo maior entre os níveis do Tempo de Decantação (A), com tempos mais elevados, de forma que a separação das fases seja mais eficiente e de mais fácil visualização.

Como a metodologia Placket-Burman caracteriza-se por um estudo exploratório e não de otimização de processos, seria interessante ainda como continuidade do presente trabalho a realização de um estudo empregando a metodologia de superfície de resposta utilizando-se as variáveis que mostraram-se significativas e com potencial neste trabalho (tempo e temperatura de aquecimento) visando-se assim otimizar as condições de tratamento.

### Conclusão

A partir dos resultados obtidos por meio do estudo exploratório pôde-se avaliar a influência de variáveis na eficiência do processo de pré-tratamento de glicerol bruto. Entre as variáveis analisadas, considerando um grau de confiança de 95%, a Temperatura de Aquecimento foi o único fator significativo, devendo ser ajustado em nível

alto (80 °C). Os demais fatores podem ser empregados em níveis de acordo com a facilidade e viabilidade de ajuste do processo. Ressalta-se que na literatura consultada não foi encontrado até o momento nenhum estudo descrevendo aplicação de metodologias de planejamento experimental para determinação de condições de tratamento do glicerol bruto. Desta maneira, este trabalho serve como base para a realização de estudos de otimização do pré-tratamento do glicerol bruto, visando assim uma padronização do seu tratamento para sua utilização em diferentes processos, em vista da demanda de glicerol, seu impacto no meio ambiente e por um fortalecimento contínuo do desenvolvimento sustentável.

### Agradecimentos

Agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

### Referências

- 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.
- ANP – Agência Nacional de Petróleo. Disponível em [http://www.udop.com.br/download/estatistica/anp\\_biodiesel/2011/0111\\_boletim\\_mensal.pdf](http://www.udop.com.br/download/estatistica/anp_biodiesel/2011/0111_boletim_mensal.pdf). Acesso em 19 de junho de 2011.
- ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica, **Revista Analytica**, v.26, p. 56-62, 2007.
- BARBOSA, C.R. Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. 2009, 135 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena/USP, Lorena, 2009.
- ÇELIK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; ÇALIK, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for Fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial and Engineering Chemistry Research** V.47, p. 2985-2990, 2008.

- CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosaheptaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry** V.42, p.1537-1545, 2007.
- GONÇALVES, B.R.L.; PEREZ, L.; ÂNGELO, A.C.D. Glicerol: Uma Inovadora Fonte de Energia Proveniente da Produção de Biodiesel, Anais do 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production, São Paulo, Brasil, 2009.
- HAZELL, S.L.; GRAHAM, D.Y. Unsaturated fatty acids and viability of *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. **Journal of Clinical Microbiology** V. 28, p.1060–1061, 1990.
- ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering** V.100, p.260–265, 2005.
- KNAPP, H.R.; MELLY, H.A. Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids. **Journal of Infect Disease** V. 154, p.84–94, 1986.
- MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L. Glicerol: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel, **Química Nova**, v.32, p.639-648, 2009.
- NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p.231-241, 1997.
- REHMAN, A.; WIJESSEKARA, R.G.; NOMURA, N.; SATO, S.; MATSUMURA, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2008.
- RIVALDI, J. D. C. Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para obtenção de biomassa e ribonucleotídeos. 2008. 125p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena/USP, Lorena, 2008.
- RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILLO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de Biodiesel. **Biotec. Ciên. e Desenvolvimento**, V. 37, p.44-51, 2007.
- SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology, **Biotechnology Advances**, v.27, p.30-39, 2009.
- THOMPSON, J.C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p.261-265, 2006.
- WANG, Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: A review, **Biotechnology Advances**, v.19, p. 201-223, 2001.