

# APROVEITAMENTO DA GLICERINA DE BIODIESEL OBTIDA A PARTIR DE ÓLEO DE FRITURA PARA O CULTIVO DO FUNGO *ASPERGILLUS NIGER*

USE OF CRUDE GLYCERIN FROM WASTE COOKING OIL BIODIESEL FOR THE CULTIVATION OF THE FUNGUS *ASPERGILLUS NIGER*

## Thais Reis Victorino

Engenheira Química pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Mestre em Engenharia de Biosistemas pela UFF – Niterói (RJ), Brasil.

## Roberto Guimarães Pereira

Engenheiro Mecânico pela Universidade Gama Filho (UGF). Doutor em Engenharia Mecânica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio). Professor Titular do Departamento de Engenharia Mecânica da UFF – Niterói (RJ), Brasil.

## Sorele Batista Fiaux

Engenheira Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela UFRJ. Professora Associada do Departamento de Tecnologia Farmacêutica da UFF – Niterói (RJ), Brasil.

### Endereço para correspondência:

Sorele Batista Fiaux – Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense – Rua Mário Viana 523 – Santa Rosa – 24241-000 – Niterói (RJ), Brasil – E-mail: sorele\_fiaux@id.uff.br

## RESUMO

Glicerina tem sido gerada em grandes quantidades como um subproduto da indústria do biodiesel. Este estudo teve por objetivo avaliar o crescimento do fungo *Aspergillus niger* em um meio contendo glicerina de biodiesel e compará-lo com aquele obtido em meios com glicerol e sacarose, uma matéria-prima já usada em processos microbianos industriais. A glicerina foi obtida por transesterificação de óleo de cozinha residual com etanol e usada sem nenhuma purificação. O crescimento microbiano na glicerina foi comparável àquele obtido na sacarose e maior do que o obtido em glicerol. A glicerina impura provou-se uma matéria-prima apropriada para processos biotecnológicos utilizando *Aspergillus niger*. A utilização tecnológica desses dois passivos ambientais, a glicerina e o óleo de cozinha residual, contribui para a diminuição dos impactos ambientais e econômicos decorrentes de sua geração e descarte.

**Palavras-chave:** glicerina; óleo de cozinha residual; *Aspergillus niger*; biodiesel.

## ABSTRACT

Glycerin has been generated in large quantities as a byproduct of biodiesel production. This study aimed to evaluate the development of the fungi *Aspergillus niger* on medium containing glycerin from biodiesel and to compare it with that obtained in media with glycerol and sucrose, a raw material used in microbial industrial process. The glycerin was obtained by transesterification of waste cooking oil with ethanol and used without any previous purification. The microbial growth in glycerin was comparable to that obtained with sucrose and bigger than that obtained with glycerol. This impure glycerin proved to be a suitable raw material for *Aspergillus niger* biotechnological process. Technological use of these two environmental liabilities, glycerin and residual cooking oil, contributes to reduce the environmental and economic impacts of their generation and disposal.

**Keywords:** glycerin; waste cooking oil; *Aspergillus niger*; biodiesel.

## INTRODUÇÃO

Devido à elevada demanda pela industrialização e consequente exploração dos recursos naturais, uma quantidade muito grande de resíduos tem se acumulado no meio ambiente. Além de representar perdas de matéria-prima e energia, esses resíduos exigem investimentos significativos em tratamentos para controlar os efeitos da sua disposição no ambiente. Diversas formas de reaproveitamento de resíduos para a geração de energia ou de produtos de maior valor agregado têm sido estudadas, numa tentativa de minimizar os prejuízos ambientais e econômicos deles decorrentes (LIGUORI; AMORE; FARACO, 2013; MIRABELLA; CASTELLANI; SALA, 2014; SHEN; ZHAO; SHAO, 2014).

A composição dos resíduos é variável, podendo ser majoritariamente orgânica ou inorgânica. Resíduos orgânicos podem ser aproveitados em processos fermentativos, nos quais são utilizados como substratos para a geração de produtos com maior valor agregado como enzimas, ácidos, biopolímeros e antibióticos (LIGUORI; AMORE; FARACO, 2013). A vantagem está na alta disponibilidade e no baixo custo. Como exemplos de resíduos aproveitados em fermentação na indústria podem ser citados o soro de leite e a água de maceiração de milho (LADEIRA *et al.*, 2012; NASCIMENTO & MARTINS, 2006; TONI; IAMAMURA; DORTA, 2012).

Grandes quantidades de glicerina são formadas na produção de biodiesel (em torno de 10 m<sup>3</sup> de glicerina para cada 90 m<sup>3</sup> de biodiesel) (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009; SINGHABHANDHU & TEZUKA, 2010), resultando em impactos econômicos e ambientais que se agravam com a crescente demanda pelo biocombustível. Dada a importância do assunto, é crescente o número de trabalhos sobre o reaproveitamento desse resíduo (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

A glicerina contém de 50 a 60% de glicerol e outros componentes resultantes do processo (SINGHABHANDHU & TEZUKA, 2010). Uma possibilidade de estudo é o aproveitamento do glicerol da glicerina como substrato para a obtenção de substâncias de maior valor agregado pela ação de microrganismos em processos fermentativos. Alguns produtos que podem ser assim obtidos são o ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* (SILVA *et al.*, 2010), o 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum* (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000), a dihidroxiacetona por *Schizochytrium limacinum* (SONG *et al.*, 2007) e o etanol por *Klebsiella variicola* (SUZUKI *et al.*, 2014). Um dos impasses é

a presença de impurezas na glicerina, que podem inibir o microrganismo produtor (ALMEIDA, 2011; DOBSON; GRAY; RUMBOLD, 2012). Um grande desafio é a obtenção de linhagens microbianas que sejam tolerantes a essas impurezas (SUZUKI *et al.*, 2014; ALMEIDA, 2011; ITO *et al.*, 2005).

A composição da glicerina pode variar, entre outros aspectos, de acordo com a matéria-prima utilizada na produção do biodiesel. A principal matéria-prima dessa produção são os óleos vegetais de oleaginosas como a soja, o girassol e a canola. A produção dos óleos para esse fim depende da disponibilidade de terras para cultivo e tem sido criticada pelo uso da terra para produzir insumos não alimentícios. Uma forma de mitigar esses impasses é utilizar, na produção de biodiesel, óleo de cozinha residual (OCR) ou de fritura, um passivo ambiental com potencial superior a 30 mil toneladas por ano no Brasil (MOURA, 2010). As principais vantagens da utilização de OCR são a diminuição do custo pela eliminação da etapa de extração do óleo e com a matéria-prima, por se tratar de um resíduo, além da diminuição da poluição do solo e do lençol freático pelo não descarte do óleo na natureza (MOURA, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2013). É importante o apoio do governo e da iniciativa privada na coleta do óleo. Já existem postos de coleta de óleo de fritura no estado do Rio de Janeiro (GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, s.d.).

*Aspergillus niger* é um dos mais importantes microrganismos na biotecnologia, já bastante empregado industrialmente. Esse fungo vem sendo utilizado por várias décadas para produzir enzimas e ácido cítrico a partir de diferentes matérias-primas, inclusive resíduos (LIGUORI; AMORE; FARACO, 2013; ANDRÉ *et al.*, 2010; DESGRANGES & DURAND, 1990; LEGISA & MATTEY, 1986; VENEGAS *et al.*, 2013). É um fungo considerado não patogênico, podendo ser usado inclusive na indústria alimentícia, pois somente uma pequeníssima porcentagem das linhagens dessa espécie apresenta produção de toxinas (ANDRÉ *et al.*, 2010; SCHUSTER *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da utilização de glicerina residual do biodiesel de óleo de fritura sem purificação como fonte de carbono e energia para o fungo *Aspergillus niger*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Óleo de cozinha residual

#### *Procedência*

O OCR foi cedido pelo Auto Posto Ingá, localizado em Niterói, Rio de Janeiro, que faz parte do Projeto Posto Cidadão, monitorado pela Secretaria Municipal de Meio

Ambiente de Niterói. É um óleo de cozinha já utilizado, proveniente das casas dos moradores da região e de restaurantes que o utilizaram na fritura de alimentos.

#### *Composição em ácidos graxos*

A composição em ácidos graxos foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. A amostra para injeção foi preparada a partir de aproximadamente 370 mg do material lipídico, aos quais foram adicionados 5 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio 0,5 M, seguindo-se um aquecimento à ebulição sob refluxo por 3 a 5 minutos. À solução quente foram adicionados 15 mL do reagente de esterificação (cloreto de amônio e ácido sulfúrico concentrado em metanol), retornando-se ao refluxo por mais 3 minutos. Depois do resfriamento, a mistura foi colocada em funil de decantação e foram acrescentados 50 mL de água destilada e 25 mL de hexano para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Após a separação, a fase hexânica foi filtrada em presença de sulfato de sódio anidro. O extrato hexânico foi colocado em tubo lacrado e mantido congelado até a análise cromatográfica (SANTOS, 2010).

A cromatografia foi realizada em cromatógrafo (Shimadzu, modelo QP2010) equipado com detector de espectrometria de massas e coluna capilar de sílica fundida com fase 5% difenil/95% dimetil-polisiloxano, modelo RTX-5MS, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura. O gás de arraste foi o hélio, com fluxo de 0,76 mL.minuto<sup>-1</sup>. A temperatura inicial da coluna foi de 120°C, sendo mantida por 4 minutos e depois elevada até 230°C a uma taxa de 1°C.min<sup>-1</sup>, permanecendo a 230°C por 3 minutos. O tempo total da corrida foi de 117 minutos. A temperatura da fonte de íons, do injetor e da interface foi de 250°C. O modo de injeção foi split (taxa de Split 1:50) e o intervalo de *m/z* foi de 40,00 a 500,00. A quantidade de amostra injetada foi de 1 µL diluída em hexano. Os diferentes ácidos graxos foram identificados por comparação dos seus espectros de massas com os espectros de padrões pertencentes à biblioteca do equipamento.

#### *Determinação da viscosidade dinâmica e da viscosidade cinemática do óleo de cozinha residual*

Duas análises foram realizadas em reômetro (RS 50 RheoStress/Precitech Instrumental LTDA) para a determinação da viscosidade dinâmica: uma à temperatura

constante de 40°C e a outra variando entre 25 e 90°C. A viscosidade cinemática foi determinada em viscosímetro cinemático tipo Cannon-Fenske, também a 40°C.

#### **Obtenção da glicerina: reação de transesterificação para produção de biodiesel**

Hidróxido de sódio foi dissolvido em álcool etílico na proporção de 1% (m.v<sup>-1</sup>) em Erlenmeyer com o auxílio de um agitador magnético. O frasco foi mantido vedado para evitar a evaporação do álcool e a absorção de umidade do ar. Após a dissolução total do hidróxido de potássio (catalisador), óleo de fritura (filtrado e seco a 110°C por uma hora) foi adicionado à solução lentamente sob agitação, numa relação de volume de álcool e de óleo de 2:5, até a mistura completa. O con-

junto foi colocado em ultrassom (Hielscher UP 200S Ultrasonic Processor Ultrasound Technology) com amplitude de 60% por 15 minutos, para a reação. Após esse tempo, a mistura foi mantida em funil de separação por um dia para a separação das fases. A glicerina (fase pesada), de cor castanho-escura, foi transferida para um frasco e armazenada à temperatura ambiente até o momento do uso.

## Ensaio com a glicerina

### *Microrganismo, meio de cultivo e inoculação*

Foi utilizado o fungo filamentosso *Aspergillus niger* INCQS 40065, gentilmente cedido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). O microrganismo foi conservado em solo estéril à temperatura ambiente. O meio de cultivo para o experimento teve a seguinte composição em (g.L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25 e (em mg.L<sup>-1</sup>): Fe<sup>+2</sup> (como FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 0,3; Zn<sup>+2</sup> (como ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 0,4; Mn<sup>+2</sup> (como MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O), 0,15; Cu<sup>+2</sup> (como CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), 0,4; pH 5,0, acres-

### *Crescimento do microrganismo*

O experimento foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. Foram utilizados como fontes de carbono a glicerina do biodiesel obtida neste trabalho, a sacarose PA e o glicerol PA adicionados ao meio de cultivo na concentração de 40,5; 51,1 e 47,5 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A sacarose e o glicerol PA foram utilizados como controles. A glicerina foi usada sem purificação, e os Erlenmeyers foram incubados a 30°C e sob agitação de 150 rpm em shaker (Marconi,

cido da fonte de carbono e esterilizado a 121°C por 15 minutos. A inoculação foi feita a partir de esporos previamente obtidos em meio batata dextrose (BDA). Os esporos foram suspensos com solução 0,1% de Tween 80, e a concentração foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Volume suficiente da suspensão de esporos foi transferido para o meio de cultivo, de forma que a concentração final no meio fosse 10<sup>5</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>.

modelo MA 830/400) por 5 dias. As amostragens, constituídas do conteúdo total do frasco, foram feitas em duplicata. A concentração celular foi determinada pelo método do peso seco de células, secando-se o micélio a 80°C por 24 h, após separação do meio por filtração em papel de filtro seco e tarado e lavagem com água. O pH foi determinado no meio após filtração, utilizando-se pHmetro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Óleo de cozinha residual**

O OCR utilizado no estudo apresentou coloração amarelo-escura e sólidos em suspensão, que foram separados por filtração. O óleo foi seco antes da reação, pois a umidade nele presente poderia interferir ou gerar formação de sabão, o que dificultaria a separação posterior dos produtos (ARAÚJO *et al.*, 2013). Uma análise qualitativa da composição do triglicerídeo presente no OCR foi realizada por cromatografia gasosa para verificar a qualidade do óleo de fritura utilizado. O Quadro 1 mostra a identificação dos ácidos graxos correspondentes a cada pico obtido na análise cromatográfica do OCR e suas estruturas moleculares. Ainda com a mesma intenção, a viscosidade cinemática e a viscosidade dinâmica foram determinadas.

A composição de ácidos graxos do OCR mostrou-se bastante parecida com a dos óleos de soja, algodão, coco, sebo bovino e banha encontrada em relatos da

literatura (CHRISTOFF, 2007; FANGRUI & MILFORD, 1999; ZHENZHONG *et al.*, 2010).

A viscosidade dinâmica a 40°C foi de 0,038 Pa.s, numa faixa de taxa de cisalhamento de 0 a 70 s<sup>-1</sup>. Foi observado, também, decréscimo da viscosidade dinâmica com o aumento da temperatura, sendo o valor da viscosidade a 25°C igual a 0,06593 Pa.s e a 84°C, igual a 0,0115 Pa.s. A viscosidade cinemática determinada a 40°C foi de 36,87 cSt, próxima à encontrada no trabalho de Moura (2010), a 40°C. Os resultados também são bem próximos daqueles obtidos para os óleos de pinhão manso, canola e soja (ARJUN; WATTS; RAFIQU, 2008; BOFFITO *et al.*, 2013; PARASCHIV; TAZEROUT; KUNCSE, 2008).

A deterioração do óleo durante a fritura pode trazer problemas à reação de transesterificação e gerar produtos indesejáveis (ARAÚJO *et al.*, 2013), o

**Quadro 1 – Ácidos graxos do óleo de cozinha residual identificados por análise em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas.**

Tempo de retenção (minutos)	Nome dos ácidos graxos	Fórmula molecular	Estrutura molecular
33,7	Mirístico	$C_{15}H_{30}O_2$	
49,4	Palmitoleico	$C_{15}H_{30}O_2$	
51,6	Palmítico	$C_{17}H_{34}O_2$	
66,3	Linoleico	$C_{19}H_{34}O_2$	
66,9	Elaidico	$C_{19}H_{36}O_2$	
67,2	Oleico	$C_{19}H_{36}O_2$	
67,4	12-cis-octadecadienoato	$C_{19}H_{34}O_2$	
67,9	Linolênico	$C_{19}H_{32}O_2$	
69,1	Esteárico	$C_{19}H_{38}O_2$	
83,3	13-cis-eicosenóico	$C_{19}H_{36}O_2$	
85,7	Araquídico	$C_{21}H_{42}O_2$	
101,2	Behênico	$C_{23}H_{46}O_2$	

que pode resultar em um biodiesel e a respectiva glicerina de baixa qualidade. A qualidade da glicerina a ser utilizada como matéria-prima no processo biotecnológico pode influenciar na adaptação do microrganismo ao meio de cultivo e na qualidade

### Obtenção da glicerina

A reação de transesterificação utilizando OCR resultou em 13% de glicerina, índice comparável com o tradicionalmente relatado (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009; SINGHABHANDHU & TEZUKA, 2010). Esse bom resultado corrobora a qualidade do OCR anterior-

### Utilização da glicerina de biodiesel de óleo por *Aspergillus niger*

O meio de cultivo apresentou uma camada superficial de material oleoso após a esterilização. Provavelmente os ácidos graxos residuais resultantes da reação de transesterificação, que não são solúveis em água, solmente utilizado em meios de cultivo, formaram essa camada. Na primeira amostragem do meio com glicerina do biodiesel (24 horas de cultivo), essa fase oleosa era muito aparente e permaneceu em parte com a biomassa. Para que não houvesse alteração na determinação da concentração celular, a biomassa foi lavada com 15 mL de hexano, de forma a solubilizar o óleo, após a filtração do meio de cultivo. Nos demais tempos esse procedimento não foi necessário, pois a camada de óleo desapareceu do meio, provavelmente consumida pelo microrganismo.

A sacarose e o glicerol foram utilizados como fonte de carbono em experimentos controle. A primeira, por ser uma fonte de carbono bastante utilizada para o crescimento de *A. niger*, inclusive industrialmente; o segundo, por ser o principal componente da glicerina do biodiesel. O crescimento celular obtido a partir de aproximadamente a mesma concentração em massa de cada fonte de carbono utilizada está apresentado na Figura 1.

*A. niger* apresentou bom crescimento na presença de todas as fontes de carbono. As taxas de crescimento nos meios contendo sacarose e glicerina foram similares e maiores do que as observadas em meio contendo glicerol. A concentração máxima de biomassa foi obtida em 150 horas, sendo a maior obtida em meio contendo glicerina como fonte de carbono (22,8 g.L<sup>-1</sup>). Essa foi 5% maior do que a obtida em sacarose e 27% maior do que a obtida em glicerol PA.

do produto obtido (SAMUL; LEJA; GRAJEK, 2014). Pelas análises de composição, viscosidade dinâmica e viscosidade cinemática, o óleo de fritura utilizado no presente projeto apresentou boa qualidade para o uso pretendido.

mente verificada. A glicerina apresentou coloração castanho-escura. O teor de glicerol foi de aproximadamente 30% (m.m<sup>-1</sup>), resultado menor do que o que tem sido relatado na literatura (SINGHABHANDHU & TEZUKA, 2010).

Mesmo não tendo sido feito pré-tratamento na glicerina do biodiesel, as impurezas presentes não afetaram o crescimento do fungo, ao contrário do que tem sido relatado para outros microrganismos (PYLE; GARCIA; WEN, 2008; ATHALYE; GARCIA; WEN, 2009). Aparentemente, alguns resíduos da reação de produção do biodiesel, como os resíduos de triglicerídeos (óleo de fritura utilizado) ou de ácidos graxos livres, contribuíram para o crescimento de *A. niger*. Essa afirmativa pode ser verificada por meio da comparação entre o crescimento em glicerol PA e o crescimento em glicerina. Papanikolaou *et al.* utilizaram OCR para gerar biomassa de algumas linhagens de *Aspergillus*, o que constitui um indicativo da possível contribuição desse resíduo para o crescimento microbiano na glicerina do biodiesel (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2011).

O pH do meio de cultivo decresceu até aproximadamente 70 horas, mantendo-se estável após esse tempo em 2,0 e 1,5 no meio com glicerina e no meio com sacarose, respectivamente. Embora o pH nesses meios tenha se estabilizado em 70 horas, o fungo continuou a crescer até o final do experimento. No meio com glicerol, o pH decresceu até 1,5 no tempo total de cultivo, o mesmo valor final do meio com sacarose.

A morfologia do micélio também apresentou diferença de acordo com o meio. No meio de cultivo contendo sacarose, *A. niger* se apresentou na forma de *pellets* bem formados; nos meios contendo glicerol e glicerina de biodiesel, o micélio se apresentou mais fragmentado (Figura 2).

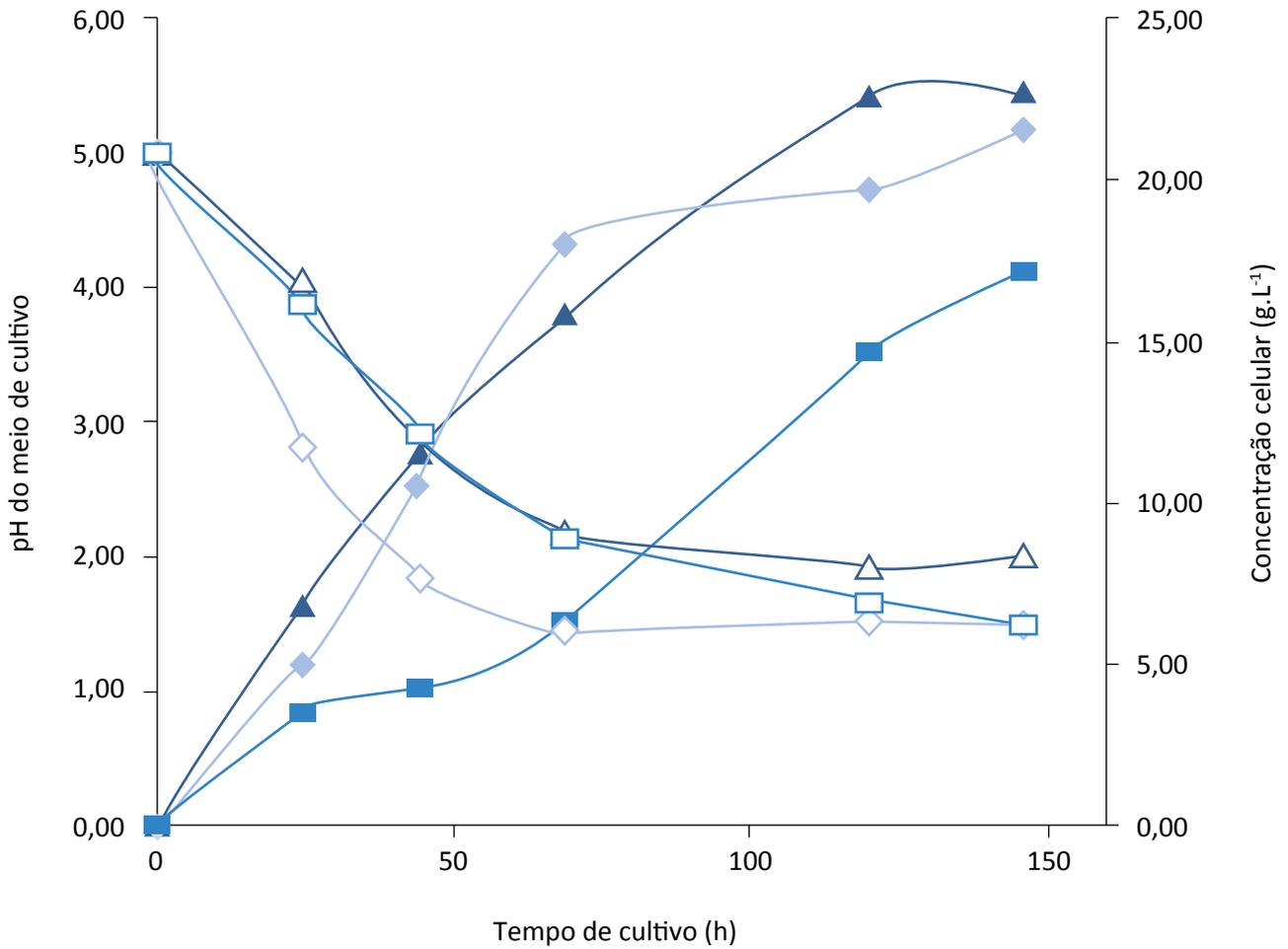


Figura 1 – Concentração celular e pH em função do tempo de cultivo em meio contendo sacarose PA, 51,1 g.L<sup>-1</sup> (♦, ◊), glicerol PA, 47,5 g.L<sup>-1</sup> (■, □) e glicerina de biodiesel, 40,5 g.L<sup>-1</sup> (▲, Δ).

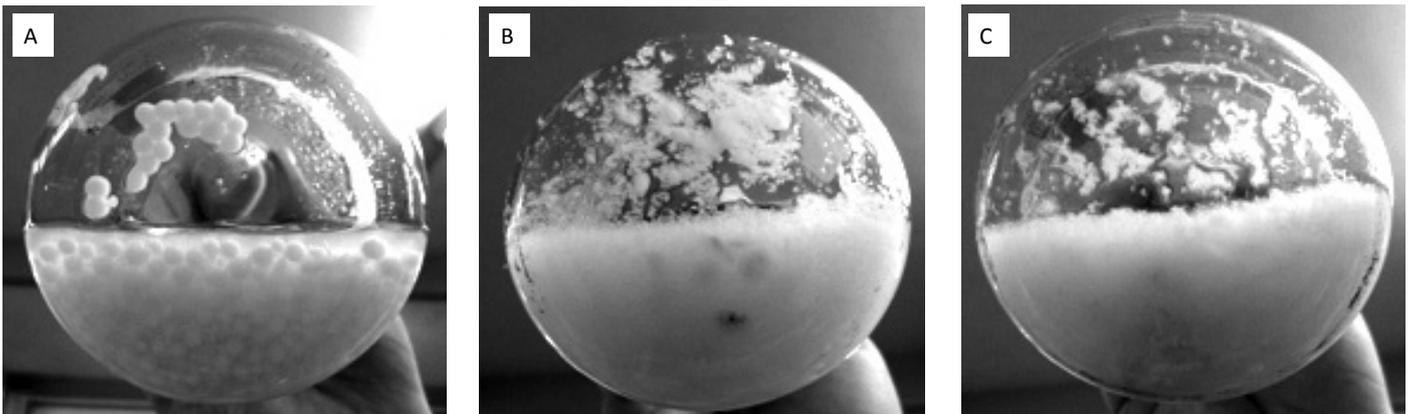


Figura 2 – Morfologia dos pellets de *Aspergillus niger* nos três diferentes meios: (A) sacarose; (B) glicerol; (C) glicerina de biodiesel.

A glicerina de biodiesel obtida a partir de OCR, sem nenhuma purificação, foi utilizada com sucesso para o crescimento de *A. niger*. Esse fato mostra o seu potencial de reaproveitamento em bioprocessos utilizando esse fungo, com diminuição dos impactos econômicos e ambientais da geração tanto desse resíduo quanto do OCR. Não foi necessária purificação prévia da glicerina para o cultivo, fato que valoriza ainda mais a aplicação, pois evita os custos decorrentes da purificação.

As poucas pesquisas feitas sobre o cultivo de *A. niger* utilizando glicerina de biodiesel como fonte de carbono mostram seu grande potencial para a obtenção de substâncias de interesse. É conhecido que *A. niger*, pelo seu desenvolvimento em meio apropriado, leva à formação de vários ácidos orgânicos, a depender das condições de cultivo (LIGUORI; AMORE; FARACO, 2013; STEIGER *et al.*, 2013). A formação de ácido oxálico já foi observada em meio contendo glicerina de biodiesel obtida a partir de óleos comerciais (ANDRÉ *et al.*, 2010). Há relatos da utilização do meio de cultivo enriquecido com esse ácido, resultante da ação de *A. niger* sobre a glicerina de biodiesel em condições apropriadas, para o branqueamento de caulim (MUSIAL; CIBIS; RYMOWICZ, 2011). A glicerina de biodiesel também já foi utilizada como complemento ao meio sólido na produção de ácido cítrico por *A. niger* a partir de torta de tungue (SCHNEIDER *et al.*, 2014). A redução do pH no presente estudo mostra que é possível obter ácidos a partir de glicerina de óleo de fritura sem prévia purificação.

Também são encontrados estudos de aplicação da glicerina em cultivos de *A. niger* para a obtenção de lipídeos microbianos, chamados de *single cell oil* (ANDRÉ *et al.*, 2010; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2011).

Esses podem servir de fonte de ácidos graxos importantes para a indústria farmacêutica, mas recentemente ganharam espaço como matéria-prima potencial para a produção de biodiesel (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008). Os lipídeos são extraídos diretamente do micélio. Em *A. niger* crescido em glicerina, a maior proporção de lipídeos em relação à biomassa foi obtida no início da fase estacionária de crescimento (ANDRÉ *et al.*, 2010). André *et al.* (2010), estudando a produção de lipídeos, obtiveram crescimento de *A. niger* entre 6 e 8 g.L<sup>-1</sup> a partir de até 60 g.L<sup>-1</sup> de glicerina purificada — 70% em glicerol (m.m<sup>-1</sup>). No presente estudo foi possível obter mais de 20 g.L<sup>-1</sup> de biomassa a partir de glicerina sem purificação, um grande potencial para a obtenção de lipídeos, considerando-se que eles são proporcionais à biomassa no início da fase estacionária de crescimento.

Também podem ser citadas como produtos potenciais para o cultivo de *A. niger*, embora ainda não tenham sido verificadas em glicerina de biodiesel, a vanilina e as lipases (LIGUORI; AMORE; FARACO, 2013; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008; 2011; SALIHU *et al.*, 2012).

A carência de estudos sobre o desenvolvimento de *A. niger* em meios contendo glicerina de biodiesel ainda é grande. As poucas pesquisas encontradas utilizaram glicerina purificada e com teor de glicerol próximo a 70%. O presente estudo mostrou que mesmo gliceras obtidas a partir de matérias-primas residuais como o OCR e contendo baixo teor de glicerol (30%) podem ser utilizadas com vantagem, sem purificação prévia para o cultivo de *A. niger*. A possibilidade do uso de glicerina sem purificação tem como boa consequência a diminuição dos custos do processo. Espera-se que a exploração desse potencial tenha sido estimulada pelos resultados aqui apresentados.

## CONCLUSÕES

O estudo mostrou que a glicerina subproduto do biodiesel obtido de OCR é uma matéria-prima apropriada para processos biotecnológicos utilizando o fungo *Aspergillus niger*. Essa matéria-prima proporcionou crescimento ligeiramente maior do fungo do que a sacarose, substrato geralmente utilizado em bioprocessos com *Aspergillus niger*, e substancialmente maior do que o glicerol, principal componente da glicerina de biodiesel. As impurezas presentes na glicerina do biodiesel de OCR não inibiram o crescimento

do microrganismo, mas, ao contrário, parecem ter influenciado positivamente em seu desenvolvimento. Mais ainda, a aplicação da glicerina obtida a partir da transesterificação de OCR reduz o impacto ambiental e econômico ao utilizar dois passivos: a própria glicerina e o OCR. Produtos que podem ser citados para a produção por *A. niger* a partir da glicerina do biodiesel de OCR são: ácido oxálico, lipídeos, lipases, vanilina, ácido cítrico e solução ácida para branqueamento de minerais industriais.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro. À professora Kátia Gomes de Lima Araújo e seus alunos pelo apoio prestado na análise

cromatográfica. Às alunas de Iniciação Científica do Laboratório de Reologia (LARE) pelo apoio prestado na determinação da viscosidade cinemática. Ao Laboratório Universitário Rodolpho Albino (LURA) pelo apoio material.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. M. Microrganismos para produção de químicos a partir da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel. *Circular Técnica Embrapa*, n. 7, 2011.
- ANDRÉ, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A.; SARRISA, D.; KOMAITISA, M.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*, v. 31, p. 407-416, 2010.
- ARAÚJO, C. D. M.; ANDRADE, C. C.; SILVA, E. S.; DUPAS, F. A. Biodiesel production from used cooking oil: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 445-452, 2013.
- ARJUN, B. C.; WATTS, K. C.; RAFIQU, M. I. Waste cooking oil as an alternate feedstock for biodiesel production. *Energies*, v. 1, p. 3-18, 2008.
- ATHALYE, S. K.; GARCIA, R. A.; WEN, Z. Use of biodiesel-derived crude glycerol for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregular*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 2739-2744, 2009.
- BOFFITO, D. C.; PIROLA, C.; GALLI, F.; DI MICHELE, A.; BIANCHI, C. L. Free fatty acids esterification of waste cooking oil and its mixtures with rapeseed oil and diesel. *Fuel*, v. 108, p. 612-619, 2013.
- CHRISTOFF, P. *Produção de biodiesel a partir do óleo residual de fritura comercial. Estudo de caso: Guaratuba, litoral paranaense*. 65 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento e Instituto de Engenharia do Paraná, Brasil, 2007.
- DESGRANGES, C.; DURAND, A. Effect of pCO<sub>2</sub> on growth, conidiation, and enzyme production in solid-state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* TS. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 12, p. 546-551, 1990.
- DOBSON, R.; GRAY, V.; RUMBOLD, K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 39, p. 217-226, 2012.
- FANGRUI, M.; MILFORD, A. H. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 1-15, 1999.
- GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. *Programa reciclagem de óleos vegetais (PROVE)*. [s.d.] Disponível em: <<http://www.rj.gov.br/web/informacaopublica/exibeconteudo?article-id=1043072>>. Acesso em: 15 fev. 2017.
- ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience Bioengineering*, v. 100, n. 3, p. 260-265, 2005.
- LADEIRA, S. A.; DELATORRE, A. B.; ANDRADE, M. V. V.; MARTINS, M. L. L. Utilização da pectina, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus* sp. Termofílico. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, n. 1, p. 92-98, 2012.

- LEGISA, M.; MATTEY, M. Glycerol as an initiator of citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 8, p. 258-259, 1986.
- MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a Review. *Journal of Cleaner Production*, v. 65, p. 28-41, 2014.
- 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. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.
- MOURA, B. S. *Transesterificação alcalina de óleos vegetais para produção de biodiesel: avaliação técnica e econômica*. 146 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 2010.
- MUSIAL, I.; CIBIS, E.; RYMOWICZ, W. Designing a process of kaolin bleaching in an oxalic acid enriched medium by *Aspergillus niger* cultivated on biodiesel-derived waste composed of glycerol and fatty acids. *Applied Clay Science*, v. 52, p. 277-284, 2011.
- NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.
- PAPANIKOLAOU, S.; DIMOU, A.; FAKAS, S.; DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; AGGELIS, G. Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal of Applied Microbiology*, v. 110, p. 1138-1150, 2011.
- PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenergy*, v. 32, n. 1, p. 60-71, 2008.
- PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHEZ, P.; PARISSET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Journal of Biotechnology*, v. 77, p. 191-208, 2000.
- PARASCHIV, M.; TAZEROUT, M.; KUNCSEK, R. Bio-fuels employable at all seasons obtained by vegetable oils processing. *Termotehnica*, n. 2, p. 60-64, 2008. Disponível em: <<http://www.agir.ro/buletine/585.pdf>>. Acesso em: maio 2014.
- PYLE, D. J.; GARCIA, R. J.; WEN, Z. Producing Docosahexaenoic Acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 3933-3939, 2008.
- SALIHU, A.; ALAM, Z.; ABDULKARIMA, I.; SALLEH, H. M. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 58, p. 36-44, 2012.
- SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. *Annals of Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 891-898, 2014.
- SANTOS, F. L. *Novas rações extrusadas para camarão enriquecidas de proteínas do soro do leite e de sementes de linhaça*. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- SCHNEIDER, M.; ZIMMER, G. F.; CREMONESE, E. B.; SCHNEIDER, R. C. S.; CORBELLINI, V. A. By-products from the biodiesel chain as a substrate to citric acid production by solid-state fermentation. *Waste Management and Research*, v. 32, n. 7, p. 653-660, 2014.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 426-435, 2002.

SHEN, Y.; ZHAO, P.; SHAO, Q. Porous silica and carbon derived materials from rice husk pyrolysis char. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 188, p. 46-76, 2014.

SILVA, L. V.; RIBEIRO, R. R.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; PESSOA, L. F. P. Potential application of raw glycerol from biodiesel in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Chemical Engineering Transactions*, v. 20, p. 211-216, 2010.

SINGHABHANDHU, A.; TEZUKA, T. A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstock. *Energy*, v. 35, p. 2493-2504, 2010.

SONG, X.; ZHANG, X.; KUANG, C.; ZHU, L.; GUO, N. Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88 using response surface methodology. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1391-1397, 2007.

STEIGER, M. G.; BLUMHOFF, M. L.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 1-5, 2013.

SUZUKI, T.; NISHIKAWA, C.; SETA, K.; SHIGENO, T.; NAKAJIMA-KAMBE, T. Ethanol production from glycerolcontaining biodiesel waste by *Klebsiella variicola* shows maximum productivity under alkaline conditions. *New Biotechnology*, v. 31, n. 3, p. 246-253, 2014.

TONI, J. C. V.; IMAMURA, K. B.; DORTA, C. Reaproveitamento do soro de leite bovino para produção de biomassa por *Kluyveromyces marxianus* 229. *Alimentus*, n. 2, p. 1-22, 2012.

VENEGAS, I. M.; FUENTES-HERNANDEZ, J.; GARCIA-RIVERO, M.; MARTINEZ-TRUJILLO, A. Characteristics of *Aspergillus niger* xylanases produced on rice husk and wheat bran in submerged culture and solid-state fermentation for an applicability proposal. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 48, p. 1798-1807, 2013.

ZHENZHONG, W.; XINHAI, Y.; SHAN-TUNG,T.; JINYUE, Y.; DAHLQUIST, E. Biodiesel production from waste cooking oil catalyzed by TiO<sub>2</sub>-MgO mixed oxides. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 9570-9576, 2010.