

DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DE TRÊS TIPOS DE BIODIESEL SOBRE O CRESCIMENTO DA MICROALGA MARINHA *Tetraselmis chuii*

Thaís Fernandes Vêras; Débora Andrade Barros*
Solange Andrade Pereira**
Iracema Andrade Nascimento***
Vinícius Queiroz Araújo****

RESUMO: *Projetos buscando fontes mais limpas e baratas de energia vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos. O biodiesel (combustível biodegradável derivado de fontes alternativas como óleos vegetais) é menos poluente, uma vez que, ao ser queimado, produz uma quantidade inferior de gases, comparado à liberada na combustão de derivados do petróleo. Tornam-se então, importantes e necessários estudos para avaliar o efeito do biodiesel sobre a biota, caso esses biocombustíveis alcancem o meio ambiente. As microalgas se constituem na base das cadeias alimentares aquáticas. Alterações na taxa de crescimento destas microalgas podem ser interpretadas como o reflexo de alterações ambientais, como por exemplo, a presença de substâncias tóxicas. Este trabalho visou avaliar a toxicidade de três tipos de óleo vegetal e três tipos de biodiesel sobre o crescimento da microalga *Tetraselmis chuii*. O óleo denominado A1 é de mamona, A2 de Óleo e Gorduras Residuais (O.G.R.) e A3 é BLEND (50% de sua composição são provenientes do óleo de mamona e 50% de O.G.R.). Os três tipos de biodiesel B1, B2 e B3 foram formados a partir do óleo de mamona como matéria-prima, O.G.R. e BLEND, respectivamente. Os resultados indicaram o óleo A2 como sendo o mais tóxico (CI50-96h= 33,83%) e o óleo A3 apresentou o menor valor de toxicidade para *Tetraselmis chuii* (CI50-96h= 59,9%). Para os tipos de biodiesel, o B3 foi o mais tóxico (CI50-96h= 44,82%) e o biodiesel B2 teve o menor valor de toxicidade (CI50-96h = 56,74%).*

Palavras-chave: Testes ecotoxicológicos; Microalgas; Biodiesel.

1. INTRODUÇÃO

A população mundial vem crescendo a cada ano, conseqüentemente, este aumento populacional vem acompanhado de um maior consumo de energia. O Brasil segue, então, a tendência mundial de procurar alternativas viáveis de fontes energéticas que possam melhorar a qualidade e o suprimento seguro de energia.

As fontes alternativas de energia não devem ter apenas eficiência energética ou de suprimento, mas, sobretudo, devem estar relacionadas à sustentabilidade ambiental. Neste aspecto, o biodiesel promete revolucionar a matriz energética do País, por prover um tipo de energia renovável, cuja produção é garantida pelas condições climáticas e de solo no Brasil. O biodiesel pode ser importante produto para exportação e para a independência energética nacional, associada à geração de emprego e renda nas regiões mais carentes do Brasil. A sua

* Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Bahia – UFBA. Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia Marinha. thais_verasbio@yahoo.com.br

** Doutora, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia Marinha.

*** Pós-doutora, Institute of Applied Sciences University of North Texas, IAS. FTC (Faculdade de Tecnologia e Ciências)

**** Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Bahia – UFBA.

imensa extensão territorial associada a condições climáticas favorecem a produção de biomassa para fins alimentares e energéticos (CRISTINA, 2006).

O biodiesel é um combustível renovável derivado de fontes alternativas, como os óleos vegetais e as gorduras animais, obtido pelo processo denominado de transesterificação, que consiste numa reação química do óleo (vegetal ou animal) com um álcool (etanol ou metanol) na presença de um catalisador. Existem no Brasil inúmeras espécies vegetais (oleaginosas) que podem ser utilizadas para a produção do biodiesel, tais como mamona, soja, algodão, girassol, dendê, amendoim, babaçu, pequi, pinhão-manso, nabo forrageiro entre outras. Os óleos e as gorduras residuais (OGR), aqueles oriundos de frituras, também podem ser utilizados na produção do biodiesel (REDE BAIANA DE BIOCOMBUSTÍVEIS, 2006).

O biodiesel pode substituir total ou parcialmente o óleo diesel de petróleo (em caminhões, tratores, etc.), ou motores estacionários. Pode ser utilizado puro (B100) ou em misturas de diversas proporções (REDE BAIANA DE BIOCOMBUSTÍVEIS, 2006). No Brasil, a adição de 2% de biodiesel no diesel, hoje facultativa, deverá se tornar obrigatória, gerando uma demanda de mercado estimada hoje em 800 milhões de litros por ano para este novo combustível, possibilitando uma redução da importação de petróleo (REDE BAIANA DE BIOCOMBUSTÍVEIS, 2006).

Diversas são as vantagens na utilização do biodiesel em relação ao diesel derivado do petróleo. O consumo de combustíveis fósseis derivados do petróleo apresenta um impacto significativo na qualidade do meio ambiente. A poluição do ar, as mudanças climáticas, os derramamentos de óleo e a geração de resíduos tóxicos são resultados do uso e da produção desses combustíveis. A poluição do ar das grandes cidades é, provavelmente, o mais visível impacto da queima dos derivados de petróleo. O biodiesel permite que se estabeleça um ciclo fechado de carbono no qual o CO₂ é absorvido quando a planta cresce e é liberado quando o biodiesel é queimado na combustão do motor (BIODIESELBR, 2007).

O biodiesel produzido no Brasil, segundo pesquisas (Roseli Ferrari da ESALQ), é menos tóxico do que o produzido por outros países. Isso está relacionado ao fato de que os demais países utilizam o metanol como matéria-prima, enquanto que no Brasil adiciona-se etanol para a reação de transesterificação. Substituir derivados de petróleo pelos combustíveis de biomassa (álcool e óleos vegetais) seria uma forma racional, rápida e econômica de reduzir emissões, visando afastar a ameaça cada vez maior do aquecimento global e redução do efeito estufa. No entanto, poucos estudos foram feitos em bases biológicas, para avaliar qual o efeito sobre a biota, quando esses biocombustíveis alcançarem o meio ambiente.

As microalgas planctônicas são habitantes naturais das camadas de superfície de todas as águas interiores (continentais) e marinhas. São os principais produtores da matéria orgânica necessária à alimentação e sobrevivência de todos os demais organismos aquáticos. Os despejos municipais e industriais que alcançam o meio aquático podem conter concentrações variáveis de compostos nutricionais para o fitoplâncton e também compostos tóxicos, além de outras substâncias altamente complexas (AIDAR *et al.*, 2002, p.262). Desse modo, é importante que se possa prever os possíveis efeitos de poluentes, como o biodiesel, na população das microalgas, usando espécies sensíveis em testes de toxicidade.

O presente projeto teve como objetivo avaliar a toxicidade dos três tipos de óleo vegetal e três de biodiesel sobre o crescimento da microalga marinha *Tetraselmis chuii*.

2. METODOLOGIA

2.1. Acondicionamento das amostras

Foram recebidas no laboratório, amostras de três tipos de biodiesel (B1, B2 e B3) e três tipos de óleo vegetal (A1, A2 e A3). O A1 é composto de óleo de mamona, o A2 de Óleos e Gorduras Residuais (O.G.R.) e o A3, óleo blenda (50% de sua composição são provenientes do óleo da mamona e 50% de O.G.R.). Na composição dos biodiesel, foi mantida a rota metílica e catálise básica, mudando-se apenas a matéria-prima. O biodiesel B1 teve como matéria-prima o óleo de mamona; B2 teve o OGR (Óleos e Gorduras Residuais); e o biodiesel B3 teve como matéria-prima a BLEND (50% óleo mamona e 50% OGR).

As amostras recebidas no laboratório foram mantidas resfriadas a 4°C até o momento das análises. Todo material utilizado na execução dos testes foi anteriormente lavado com sabão neutro, descontaminado em ácido nítrico a 10%, enxaguado e esterilizado. Como água de diluição, foi utilizada água do mar natural filtrada e esterilizada, com salinidade de 28, pH entre 7,5 e 8,5 mol/L.

2.2. Organismo-Teste

A microalga utilizada como organismo teste foi a *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae), faz parte do fitoplâncton, que se constitui na base das cadeias alimentares aquáticas. É uma alga cosmopolita, bastante sensível ao efeito de xenobióticos. Tem sido muito utilizada na alimentação de organismos aquáticos e como organismo-teste em testes ecotoxicológicos. Alterações na taxa de crescimento desta microalga podem ser interpretadas como o reflexo de alterações ambientais, como por exemplo, a presença de substâncias tóxicas. Tais efeitos nessa taxa de crescimento poderão também afetar outros níveis da cadeia alimentar.



Figura 1. Microalga *Tetraselmis chuii*. Podem ser observados os 4 flagelos.
Aumento 400X

2.3. Tratamento das amostras

O tratamento das amostras foi realizado de acordo com a API, RP 13H, First Edition, May 1, 1984. Drilling Fluid Bioassays; Federal Register, v. 50 no. 165, p.34631-34636, August 6, 1985.

Os produtos testados foram agitados e diluídos em frasco de Mariote, na proporção 1/9 em água do mar na salinidade de 28‰ (água de diluição), e reagitados com agitador magnético na velocidade de 150 rpm por 20 horas. Após este período, deixou-se o extrato decantar e separou-se a fração solúvel em água (FSA). A FSA de cada produto foi mantida sob agitação com agitador magnético, até a retirada das alíquotas necessárias ao preparo dos diferentes tratamentos. Foram feitas diluições, de forma a obter as concentrações-teste em %V/V da FSA.

Em paralelo aos testes com as amostras de produtos, foi realizado um teste com a substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$), o DSS, para determinação da sensibilidade e saúde das microalgas. Como controle foi utilizado um controle branco ou negativo, contendo apenas água de diluição. Este controle foi testado em triplicata.

2.4. Teste de toxicidade com a microalga

A metodologia para esta análise seguiu a Norma ISO 10253: 1995(E), que padronizou um método para determinação dos efeitos tóxicos causados por compostos químicos sobre o crescimento de microalgas marinhas. O princípio do teste consiste na exposição de um inóculo monoespecífico, em crescimento exponencial, da microalga *Tetraselmis chuii*, à diluições da substância testada, por um período mínimo de 72h. A inibição do crescimento celular é medida por meio da redução no crescimento celular em comparação ao controle, estando em condições idênticas. Após 96h de exposição, foram feitas contagens das microalgas em câmara de Neubauer para determinação da densidade celular em todas as réplicas (3) de cada tratamento. Os efeitos observados incluem ações sinérgicas, antagônicas e aditivas de todos os componentes físicos, químicos e biológicos das amostras, que afetam adversamente as funções bioquímicas e fisiológicas dos organismos-testes, a nível de inibição do crescimento das populações das microalgas.

2.5. Análise estatística

Com os valores obtidos, após a contagem celular, foram calculados o Percentual de Inibição do Crescimento, Taxa de Duplicação Diária (K) (que corresponde ao número de reproduções diárias das microalgas) e a CI50-96h, em relação ao controle.

Os resultados dos testes foram expressos em % de CI50 (concentração da amostra teste que causou a Inibição no Crescimento dos organismos-testes em 50%). Os valores de % de Inibição, da Taxa de Duplicação Diária (K) das microalgas, e de CI50-96h, foram calculados diretamente pelo Método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977).

Com os valores de CI50-96h obtidos das análises, foi feita uma análise de variância (ANOVA) através do Programa GraphPad InStat (1997), com o objetivo de verificar a significância entre esses valores.

2.6. Montagem dos testes

A microalga *T. chuii* (Fig.1), cultivada no Banco de Microalgas do Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento do Instituto de Biologia-UFBA, foi submetida à diferentes concentrações (4,6; 10,0; 22,0, 46,0 e 100,0%) das Frações Solúveis em Água (FSA) obtidas de cada produto. As culturas foram mantidas sob condições controladas de temperatura ($\pm 23^\circ C$), salinidade (28‰), iluminação (± 4000 lux), e agitadas manualmente uma vez ao dia. Após 96 horas de exposição das microalgas às FSA dos produtos, foi feita a determinação da densidade celular em cada replicata (3) de cada concentração. O possível efeito adverso de cada tipo de biodiesel, diesel e óleos, foi determinado através do cálculo da CI50 e da taxa de duplicação diária das culturas após 96h de exposição. A densidade celular serviu de base para o cálculo das CI50-96h, e dos valores de K, através do método estatístico Trimmed Spearman-Kärber.

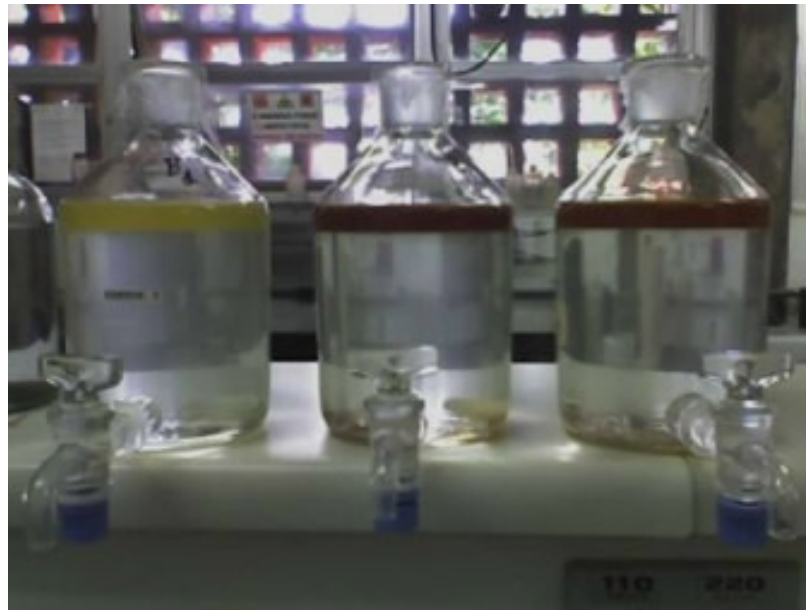


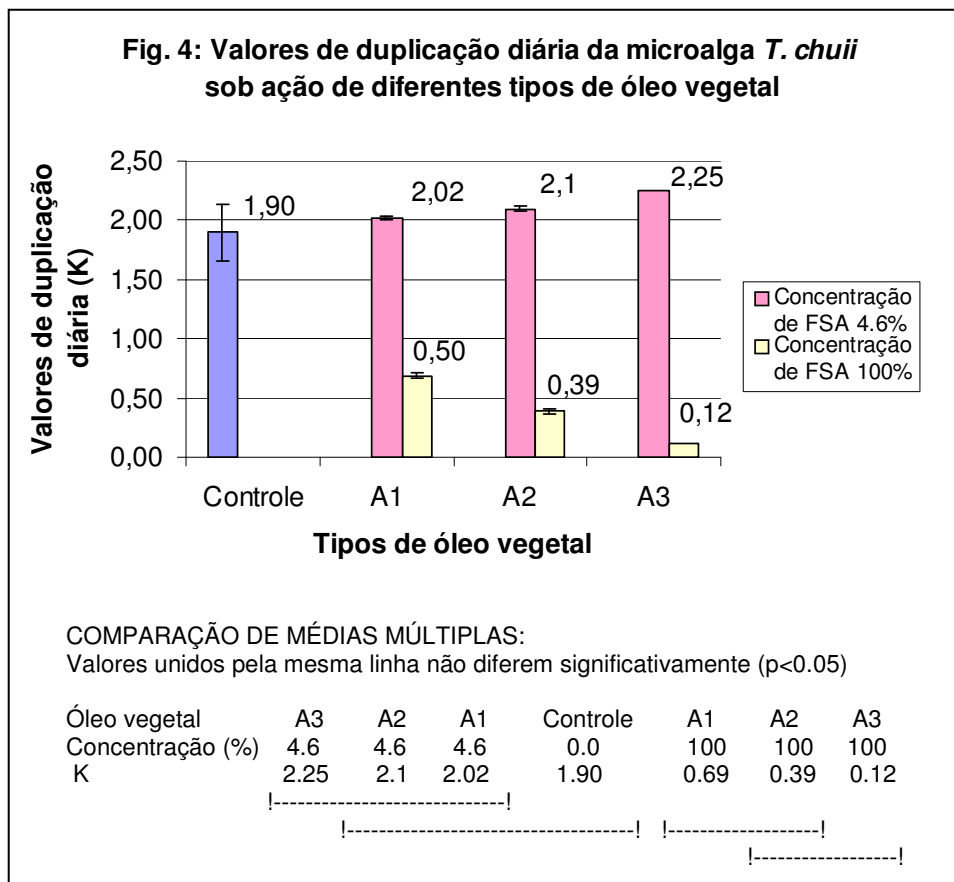
Figura 2. Frascos de Mariote contendo as frações solúveis dos três tipos de biodiesel.



Figura 3. Algas expostas à FSA dos produtos petroquímicos, acondicionadas em sala ambiente, por 96h.

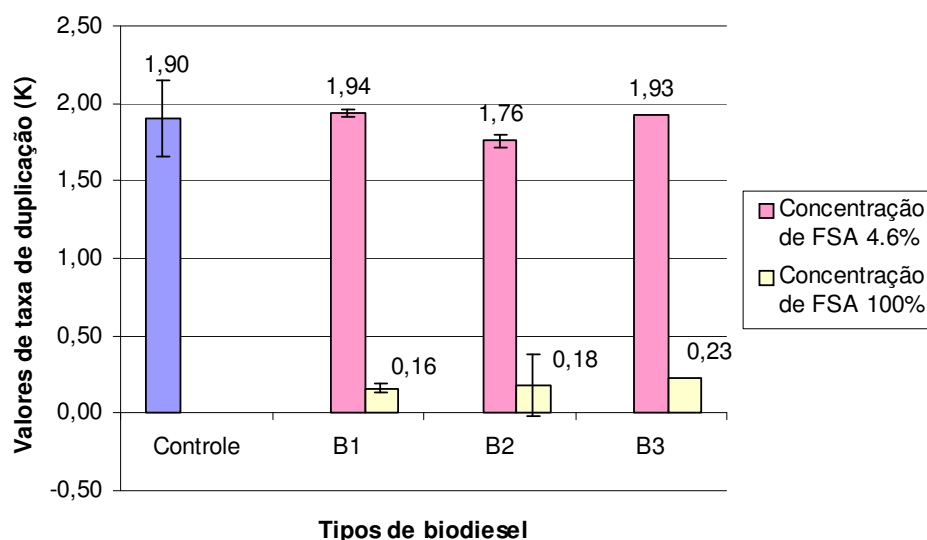
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do método estatístico Trimmed Spearman-Kärber foram calculadas, além da CI50 -96h, as Taxas de Duplicação Diárias nos diferentes tratamentos com a *T. chuii* (Fig. 4).



A taxa de duplicação diária (K) no controle foi de 1,90 divisões/dia (Fig.4). Na concentração de 4,6% das FSA dos três óleos A1, A2 e A3, as taxas de duplicação diária foram maiores do que a do controle (respectivamente 2.02, 2.1 e 2.25 divisões/dia), indicando efeito de “hormesis” (estímulo no crescimento da população de microalgas); O valor de K no óleo A3 (2.25 divisões/dia) diferiu positivamente ($p < 0.05$) do controle. Na concentração de 100%, todos os valores de K foram baixos e diferiram negativamente do controle.

Fig. 5: Valores de duplicação diária da microalga *T. chuii* sob ação de diferentes tipos de biodiesel



COMPARAÇÃO DE MÉDIAS MÚLTIPLAS:

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p < 0.05$)

Biodiesel	B1	B3	Controle	B2	B3	B2	B1
Concentração (%)	4.6	4.6	0.0	4.6	100	100	100
K	1.94	1.93	1.90	1.76	0.23	0.18	0.16

!-----! !-----!

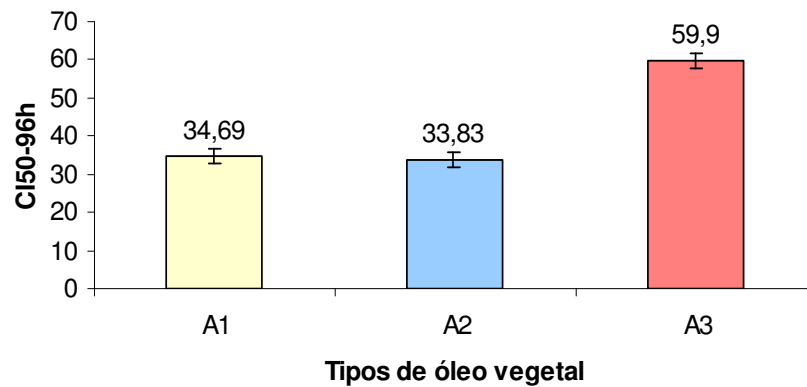
Em relação aos biodiesel (Fig.5), na concentração 4,6% das FSA, os valores de K para B1 e B3 (respectivamente 1.94 e 1.93 divisões/dia), foram maiores que o controle, indicando a ocorrência do efeito de hormesis. O valor de K obtido para B2 foi menor que o do controle, porém não diferiu significativamente deste ($p > 0.05$). Na concentração de 100% das FSA dos biodiesel os valores de K foram menores e diferiram significativamente ($p < 0.05$) do valor do controle e dos valores obtidos na concentração 4.6%.

Valores de K acima do valor do controle obtidos nos testes podem estar associados ao fato de as microalgas estarem utilizando o produto como fonte de nutrientes (fonte de carbono) adicional para a alimentação, permitindo um aumento no crescimento diário das culturas.

Já os valores de K encontrados em todos os produtos na concentração de 100% da FSA, foram inferiores a uma (01) duplicação diária. Esses resultados apontam um efeito muito tóxico dos produtos analisados (óleos e biodiesel) nesta concentração.

Considerando-se os resultados dos testes ecotoxicológicos com os 3 tipos de óleos (A1, A2 e A3) (Fig.6) verificou-se que o óleo A2 foi o mais tóxico para as microalgas (valor de $CI_{50-96h} = 33,83\%$), seguido pelo óleo A1 ($CI_{50-96h} = 34,69\%$). Não foi observada diferença significativa ($p > 0.05$) entre os valores de CI_{50} obtidos nos testes com os óleos A1 e A2. Já o resultado do teste com o óleo A3 mostrou um valor mais alto de CI_{50-96h} (59,9%), indicando ser este o menos tóxico dos três para a *Tetraselmis chuii*. (Fig.6). Este valor diferiu significativamente dos encontrados nos testes com os óleos A1 e A2.

Fig. 6: Valores de CI50 resultantes da ação da FSA de óleos vegetais sobre o crescimento da microalga *T.chuii* após 96h de exposição

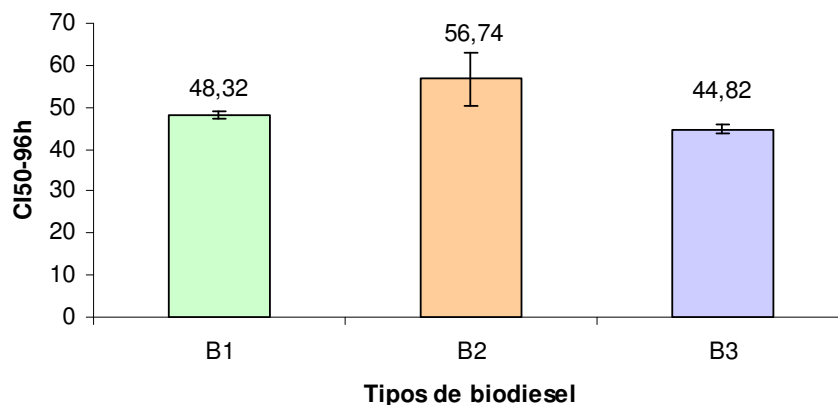


COMPARAÇÃO DE MÉDIAS MÚLTIPLAS:

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p < 0.05$)

Biodiesel	A3	A1	A2
Valores CI50	59,9	34,69	33,83
	!-----!	!-----!	!-----!

Fig. 7: Valores de CI50 resultantes da ação da FSA de três tipos de biodiesel sobre o crescimento da microalga *T.chuii* após 96h de exposição



COMPARAÇÃO DE MÉDIAS MÚLTIPLAS:

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p < 0.05$)

Biodiesel	B2	B1	B3
Valores CI50	56,74	48,32	44,82
	!-----!	!-----!	!-----!

Nos testes realizados com os três tipos de biodiesel (Fig.7), o B3 apresentou uma CI50-96h= 44,82%, seguido do B1 (CI50-96h= 48,32%) e o B2 (CI50-96h= 56,74%). Os valores obtidos com os biodiesel B1 e B2 não diferiram significativamente entre si ($p>0.05$); no entanto o valor obtido com o diesel B3 diferiu significativamente do valor obtido com o diesel B2.

Se levar em conta que o óleo A2 foi o que apresentou maior toxicidade para as microalgas (CI50-96h= 33,83%), esperava-se que o biodiesel B2, que é composto deste óleo, fosse também o mais tóxico. No entanto os resultados apontaram o biodiesel B3 como o mais tóxico para a *T.chuii*. Os resultados obtidos sugerem que a toxicidade dos biodiesel analisados, sobre o organismo-teste utilizado, não deve estar relacionada com o tipo de óleo componente, mas possivelmente com a quantidade de catalisador utilizada no processo de transesterificação.

Pereira *et al.* (2001, p.345; 2002, p.272; e 2003, p.57), em testes com a FSA do diesel automotivo, utilizando o mesmo organismo-teste, obtiveram valor médio de CI50-96h= 38,41%, mais baixo que os encontrados neste trabalho com 3 tipos de biodiesel, indicando o diesel automotivo como mais tóxico para a microalga *T.chuii*.

Testes de toxicidade com as FSA dos biodiesel B1, B2 e B3, e dos óleos A1, A2 e A3, utilizando a microalga *Skeletonema costatum* como organismo-teste, apresentaram valores de CI50-96h muito baixos (B1= 1,29%; B2= 8,27% e B3= 5,48%; A1= 0,5%; A2= 0,88%, A3= 6,67%) em relação aos encontrados nos testes com a *T.chuii*, indicando um maior efeito tóxico dos produtos para a *S.costatum*. Desse modo, a microalga *Tetraselmis chuii* mostrou ser mais resistente e menos sensível aos produtos analisados do que a *Skeletonema costatum*, sendo esta a mais indicada para ser utilizada em testes de toxicidade.

Conclui-se, deste trabalho, que todos os produtos analisados foram tóxicos para a microalga *T.chuii*, podendo causar sérios problemas para a biota aquática, caso, de alguma maneira, alcancem o meio ambiente. Sugere-se que seja feita uma avaliação na metodologia de extração dos óleos e reformulação na composição dos biodiesel estudados, visando uma diminuição do efeito tóxico desses produtos.

4. CONCLUSÃO

Desde que poucos estudos têm sido realizados comparando os efeitos tóxicos de produtos petroquímicos em microalgas, os resultados encontrados demonstram que tais dados podem fornecer fundamentos para futuros estudos com o objetivo de subsidiar a tomada de decisões relativas à prevenções de efeitos tóxicos de derivados de petróleo nos ambientes marinhos e estuarinos, influenciados pelo desenvolvimento industrial.

Os altos valores de CI50-96h encontrados nos testes com os três tipos de biodiesel, indicam esses produtos como os menos tóxicos e os óleos A1 e A2, como os mais tóxicos dentre os analisados, para a microalga *T.chuii*. No entanto, apesar de baixas concentrações de alguns produtos analisados não terem conferido toxicidade às microalgas, aparentemente devido ao efeito de hormesis (quando as microalgas utilizam o carbono como fonte de alimento), esta evidência não deve ser interpretada como ausência de prejuízo aos ecossistemas.

Os valores K encontrados nos testes com a *T.chuii* sob ação dos produtos petroquímicos estudados, indicam que o aumento das concentrações de FSA aumenta a toxicidade desses produtos.

As técnicas utilizadas comprovaram ser adequadas para avaliar a toxicidades dos produtos estudados, mostrando respostas consistentes e de boa precisão entre os testes realizados, de modo que poderão futuramente ser utilizados para avaliação da toxicidade de

outros produtos, no sentido de tornar possível a geração de produtos cada vez mais eco-compatíveis.

O estudo é inovador, não apenas pela metodologia utilizada, que poderá ser futuramente empregada para subsidiar a geração de combustíveis mais eco-compatíveis, derivados da indústria de petróleo nacional, mas pela escassez de dados relativos à avaliação de toxicidade de produtos petroquímicos.

5. REFERÊNCIAS

Aidar, E.; Pereira, S. A.; Sousa, E. C. P. M.; Brasil-Lima, G. M. S. Testes de toxicidade com microalgas. In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda, 2002, p.262.

BIODIESELBR. **TUDO SOBRE O BIODIESEL**, 2007. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/biodiesel.htm>>. Acesso em 20 de maio de 2007.

CRISTINA, M. **Biodiesel: o combustível do futuro**. Ciência em Rede, jan., fev., mar., 2006.

PEREIRA, S.A.; SILVA, C.C.; NASCIMENTO, I.A.; RODRIGUES, A.R.; VALENÇA, A.R. **Impacto de poluentes petroquímicos na fotossíntese da microalga *Tetraselmis chuii***. Livro de Resumos da 53ª Reunião Anual da SBPC, Salvador-Ba, Jul./2001, p.345.

PEREIRA, S.A., VALENÇA, A.R., NASCIMENTO, I.A., PAIXÃO, J.F., BARROS, D.A. **Efeitos de produtos petroquímicos na fotossíntese e crescimento de microalgas**. Livro de Resumos do VII Cong. Brasileiro de Ecotoxicologia e V Reunião da SETAC Latinoamericana. Vitória, ES. Outubro de 2002, p.272.

PEREIRA, S.A.; BARROS, D.A.; NASCIMENTO, I.A. **Testes de toxicidade utilizando microalgas marinhas: efeitos de produtos petroquímicos**. Livro Resumos, IV Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação, Salvador, Ba, 2003, p.57.

REDE BAIANA DE BIOCOMBUSTÍVEIS. **O BIODIESEL**, 2007. Disponível em: <<http://www.rbb.ba.gov.br/index.php?menu=obiodiesel>>. Acesso em: 14 de maio de 2007.