



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CULTIVO DE MICROALGAS UTILIZANDO EFLUENTES DA INDÚSTRIA  
BIOENERGÉTICA E AVALIAÇÃO DA CONVERSÃO EM BIODIESEL

Eng<sup>a</sup> ETIELE GREQUE DE MORAIS

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA

Orientador

RIO GRANDE, RS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CULTIVO DE MICROALGAS UTILIZANDO EFLUENTES DA INDÚSTRIA  
BIOENERGÉTICA E AVALIAÇÃO DA CONVERSÃO EM BIODIESEL

Eng<sup>a</sup> ETIELE GREQUE DE MORAIS

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do  
título de mestre em Engenharia  
Ciência de Alimentos

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA  
Orientador

RIO GRANDE, RS

2015

### Ficha catalográfica

M827c Morais, Eteie Greque de.  
Cultivo de microalgas utilizando efluentes da indústria bioenergética e avaliação da conversão em biodiesel / Eteie Greque de Morais. – 2015.  
101 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2015.

Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.

1. Microalgas 2. Biofixação 3. Biocombustíveis 4. Energia  
5. Glicerol I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Título.

CDU 664

## APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Etiele Greque de Moraes e aprovada em 30 de março de 2015, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa- FURG



Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto – FURG



Prof. Dra. Ana Priscila Centeno da Rosa – FURG



Prof. Dr. Ignácio Viéitez Osorio – UDELAR



**Dedico este trabalho aos meus pais e a minha irmã Michele.**



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Loiza e Leopoldino, por todo carinho e amor incondicionais e pelo apoio que sempre deram aos meus estudos

A minha irmã, Michele Moraes, pelos puxões de orelha, o terrorismo, e também pelo amor e o carinho. Por ser meu maior guia na trajetória acadêmica, exemplo de profissional e pessoa.

Ao meu querido orientador, Prof. Jorge Alberto Vieira Costa, pela oportunidade de a 7 anos trabalhar com microalgas, dedicação, amizade, confiança e pelas palavras e conselhos sempre certos

A iniciante científica e amiga, Ana Paula Cassuriaga, pela dedicação, responsabilidade e amor pelo trabalho, ainda que em um domingo ensolarado

As professoras Elisângela Radmann e Ana Priscila Centeno, pela amizade e palavras de tranquilidade no início do meu trabalho

Ao técnico Roque Zílio, pela disposição e ajuda na solução de problemas

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica, em especial: Bárbara Freitas, Jéssica Duarte, Bruna Vaz, Kricelle Deameci, Denise Prates, Milene Barcia e Cristiane Lisboa. Pela ajuda com o trabalho, amizade, alegria e momentos de descontração

Aos colegas “Uruguayos” do Laboratório de Grasas y Aceites: Natália Martinez, Eng. Nicollas Callejas, Eng<sup>a</sup>. Lucia Maceiras, Lucia Nogues, Nicolas Fusario, Prof. Jenne e Prof. Bruno Irigaray pela amizade, companheirismo, paciência, hospitalidade, ensinamentos e por fazerem tão feliz e agradável minha passagem pelo Uruguai.

Aos meus queridos orientadores Uruguaios: Prof. Ignacio Viertez e Prof. Iván Jackmaniann, pela acolhida, atenção, tempo dedicado e apoio dentro e fora da Universidade no período sanduíche.



A Universidade Federal do Rio Grande e Universidad de la República pela estrutura e recursos disponibilizados.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e pela experiência do intercâmbio

Gostaria de agradecer a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

**Muito obrigada!**

“An arrow can only be shot by pulling it backward. When life is dragging you back with difficulties, it means it’s going to launch you into something great. So just focus, and keep aiming.” (Autor desconhecido)



## RESUMO

As microalgas são um grupo de micro-organismos unicelulares ou multicelulares, fotossintéticos que tem capacidade, em sua maioria, de utilizar fontes de carbono orgânica e inorgânica para seu desenvolvimento. A biomassa microalgal vem sendo proposta como matéria-prima para a produção de energia e outros produtos devido a alta produtividade, possibilidade de utilizar águas residuais e o fato de não serem necessárias terras férteis para o cultivo. Além de sintetizar e armazenar lipídios em forma de triacilgliceróis para produção de biodiesel, elas podem utilizar efluentes tanto líquidos quanto gasosos proveniente da produção e aplicação deste biocombustível como nutriente para seu desenvolvimento. O trabalho teve como objetivo cultivar microalgas utilizando efluentes líquido (glicerol) e gasoso (CO<sub>2</sub>) da indústria bioenergética e avaliar a capacidade de conversão em biodiesel da biomassa obtida. O trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi realizado o cultivo mixotrófico das microalgas *Spirulina* sp LEB18, *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus actus* LEB 116 em biorreatores tubulares de 1,8 L de volume útil em estufa termostatizada a 30 °C e 43,2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de iluminância. Foram utilizados nos experimentos o meio de cultivo padrão de cada microalga complementado com glicerina P.A 0,01 mol.L<sup>-1</sup> em batelada e batelada alimentada. Foram avaliados o desenvolvimento das microalgas nos diferentes modos de cultivo com substrato glicerol, rendimento de biodiesel e quantificados os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). As microalgas não tiveram suas produtividades afetadas pelos modos de cultivo. Dentre as cepas estudadas, *Spirulina* sp LEB 18 obteve o máximo rendimento em biodiesel (51,5%) no experimento em batelada, com percentual lipídico de 24,1%. De acordo com a composição de FAMES, o óleo produzido também nesta condição, seria o mais estável com 58,3% de ésteres saturados e 29,9% insaturados. As microalgas estudadas apresentaram composição de ácidos graxos semelhantes a de óleos produzidos a partir de vegetais superiores (C16 e C18) e presença do ácido oleico (18:1), indicador de qualidade do biodiesel. Na segunda etapa, foi realizado o cultivo da microalga *Spirulina* sp LEB 18 utilizando 10% (v/v) CO<sub>2</sub> como fonte de carbono e com redução da fonte de nitrogênio. O cultivo foi realizado em escala piloto em fotobiorreator tubular horizontal equipado com *air lift* de 150 L de volume útil em estufa termostatizada a 30° C e 43,2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de iluminância. Foram avaliadas a capacidade de biofixação de CO<sub>2</sub> e desenvolvimento da microalga além da composição da biomassa em lipídios, carboidratos e proteínas. Foi obtido o rendimento teórico de biodiesel através da transesterificação *in situ* e convencional além da avaliação qualitativa do óleo a ser obtido pela microalga através da composição de ésteres metílicos. *Spirulina* apresentou em sua composição proteínas (47,3%), carboidratos (13,4%) e lipídios (32,7%). Os lipídios avaliados quanto à produção de biodiesel apresentaram rendimento teórico de 19,8% para transesterificação *in situ* e 47,9% para transesterificação convencional destacando a importância da avaliação das condições de extração do óleo microalgal. A microalga teve capacidade de biofixar 160 mg.L.d<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> gerando biomassa a uma produtividade máxima de 0,02 g.L.d<sup>-1</sup>. Os biocompostos produzidos possuem aplicabilidade nas indústrias alimentícia farmacêutica e energética. Os resultados obtidos no trabalho reforçam a ideia da aplicação do conceito de fotobiorrefinaria para o aproveitamento de todos os compostos da microalga viabilizando a produção de bioprodutos, em especial, biocombustíveis, tornando o processo ainda mais sustentável. O consumo de CO<sub>2</sub> e glicerol como fonte nutricional além de reduzir os custos do processo fecham um ciclo dentro do conceito de biorrefinaria microalgal, podendo consumir o efluente produzido através da produção e aplicação de biocombustíveis. A biomassa microalgal possui potencial para produção de biodiesel que pode ser aplicado em substituição ou em mistura com diesel tradicional.

Palavras-chave: biofixação de CO<sub>2</sub>, biocombustíveis, energia, glicerol.



## ABSTRACT

Microalgae are a group of unicellular or multicellular, photosynthetic microorganisms with capacity, in most cases, to use organic and inorganic carbon sources for its development. Microalgal biomass has been proposed as a raw material for energy and other products production due to high productivity and flexibility of cultivation. Microalgae are capable to use waste water and there's not necessary fertile land for cultivation. In addition to synthesize and store lipids in the form of triglycerides to biodiesel production, they can use both liquid and gas biofuel production and application waste for its development. The aim was to cultivate microalgae with liquid (glycerol) and gas (CO<sub>2</sub>) effluente of bioenergetic industry and evaluate obtain biomass biodiesel conversion capacity. The work was divided into two stages. In the first step was performed mixotrophic cultivation of *Spirulina* sp LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 and *Scenedesmus actus* 116 LEB microalgae strains in tubular photobioreactor (1,8 L) at 30° C and 43.2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> illuminance. Were used in the experiments standard culture médium for each microalga supplemented with purê glycerine 0.01 mol L<sup>-1</sup> in batch and fed-batch cultures. We assessed the development of microalgae in different modes of cultivation with substrate glycerol, biodiesel yield and quantified the fatty acid methyl esters (FAMES). Microalgae haven't had their productivity affected by cultivation modes. Among the strains studied, *Spirulina* sp LEB 18 had a higher yield of biodiesel (51.5%) in bach cultivation, with lipid percentage of 24.1%. According to FAMES composition, the oil, also produced in this condition, would be the more stable with 58.3% of saturated FAMES and 29.9% unsaturated. Microalgae showed fatty acid composition similar to oils produced from higher plants (C16 and C18) and the presence of oleic acid (18: 1), an indicator of quality biodiesel. In the second step was performed cultivating *Spirulina* sp LEB 18 using 10% (v/v) CO<sub>2</sub> as the carbon source and nitrogen source reduction. Cultivation was carried out on a pilot scale in horizontal tubular photobioreactor equipped with air lift, 150 L working volume at 30 ° C and 43.2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> illuminance. Were evaluated biofixation capacity of CO<sub>2</sub> and development of microalgae beyond the composition of biomass into lipids, carbohydrates and proteins. Was obtained theoretical yield of biodiesel by *in situ* and conventional transesterification, and qualitative evaluation of oil was made by using the composition of FAME. *Spirulina* composition presented macronutrients: protein (47.3%). carbohydrates (13.4%) and lipids (32.7%). Lipids evaluated for biodiesel production presented theoretical yield of 19.8% for transesterification *in situ* and 47.9% for conventional highlighting the importance of evaluating the extraction conditions of microalgal oil. The microalgae had biofixation capacity of 160 mgCO<sub>2</sub>.Ld<sup>-1</sup> generating biomass to a maximum throughput of 0.02 g.Ld<sup>-1</sup>. Produced biocompounds have applicability in the pharmaceutical, food and energy industries. The obtained results reinforce the application of the photobiorrefinery concept to take advantage of all of microalgae compounds enabling the production of bioproducts, in particular biofuels, making it a even more sustainable process. The consumption of CO<sub>2</sub> and glycerol as nutritional sources, reduce costs and closing a cycle within the concept of microalgal biorefinery, may consume the waste produced by the production and application of biofuels. The microalgal biomass has potential for biodiesel production that can be applied in place of or in combination with traditional diesel fuel.

Keywords: biofuels, CO<sub>2</sub> biofixation, energy, glycerol,



## NOMENCLATURA

$\mu_{\text{máx}}$  - velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ )

**AGL** – ácidos graxos livres

**ATP** - adenosina trifosfato

$C_{\text{biodiesel}}$  – concentração de biodiesel ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$C_{\text{lipídios}}$  – concentração de lipídios ( $\text{g.L}^{-1}$ )

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**FA** - acúmulo de CO<sub>2</sub> fixado ( $\text{g CO}_2$ )

**FAME** - ésteres metílicos de ácidos graxos

**FBRT** – fotobiorreator tubular

$F_{\text{CO}_2}$  - fixação diária máxima (%)

**FD** - fixação diária de CO<sub>2</sub> ( $\text{g CO}_2_{\text{fixado}} \text{g}^{-1} \text{CO}_2_{\text{injetado}} \text{dia}$ )

**FDA** - Food and Drug Administration

**GRAS** - Generally Recognized as Safe

$M_{\text{C}}$  - massa molar do carbono ( $\text{g mol}^{-1}$ )

$M_{\text{CO}_2}$  - massa molar do dióxido de carbono ( $\text{g mol}^{-1}$ )

**MeOH** - metanol

$m_{\text{id}}$  - massa de CO<sub>2</sub> injetada diariamente ( $\text{g CO}_2$ )

$P_{\text{máx}}$  - produtividade máxima ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )

**PSI** - fotossistema I

**PSII** - fotossistema II

$R_{\text{biodiesel}}$  – rendimento de biodiesel teórico (%)

$t_{\text{lipídios}}$  – teor de lipídios na biomassa (%)

$V_{\text{biorreator}}$  - volume de meio no biorreator (L)

$x_{\text{cbm}}$  - fração mássica de carbono ( $\text{gC g}^{-1} \text{amostra}$ )

$X_{\text{máx}}$  - concentração celular máxima ( $\text{g L}^{-1}$ )





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos óleos de *Spirulina platensis*, Girasol, Palma, Diesel e Normas americana e européia.....45

### **Artigo 1 - CULTIVO MICROALGAL PARA GERAÇÃO DE ENERGIA UTILIZANDO EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Tabela 1 - Composição meio Zarrouk e BG-11 modificado.....57

Tabela 2 – Concentração celular ( $X_{max}$ , g.L<sup>-1</sup>), produtividade máxima ( $P_{max}$ , g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), teor de lipídios na biomassa ( $t_{lipídios}$ , %, p/p), rendimento de biodiesel teórico ( $R_{biodiesel}$ , % p/p) para, concentração de lipídios ( $C_{Lipídios}$ , g/L) e de biodiesel ( $C_{biodiesel}$ , g/L) para as microalgas *Spirulina* sp LEB 18 (SP), *Chlorella fusca* LEB 111 (CF) e *Scenedesmus actus* LEB 116 (SA) nas condições: adição de glicerina 0,01 M (1) no tempo 0 d, (2) no tempo 10 d e (3) nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d.....63

Tabela 3 - Composição de ácidos graxos (% p/p) para os cultivos das microalgas *Spirulina* sp LEB 18.(SP), *Chlorella fusca* LEB 111 (CF) e *Scenedesmus actus* LEB 111 cultivadas nas condições: adição de glicerina 0,01 M (1) no tempo 0 d, (2) no tempo 10 d e (3) nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d.....66

### **Artigo 2 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOFIXAÇÃO CO<sub>2</sub> E PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR *Spirulina* sp LEB 18**

Tabela 1 - Composição do meio Zarrouk.....74

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (% p/p) para os cultivos da microalga *Spirulina* sp LEB 18. cultivada em FTBR horizontal (Tubular) e comercialmente em *raceway* (Comercial).....79



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curva de crescimento de um micro-organismo em cultivo descontínuo onde: (A) ordenadas lineares e (B) semilogarítmica.....	34
Figura 2 - Metabolismo de assimilação do glicerol e seus possíveis produtos.....	39
Figura 3 - Representação esquemática da síntese de ácido graxo de cadeia longa a partir de ácido palmítico.....	43
Figura 4 - Equação de transesterificação. R representa a cadeia carbônica dos ácidos graxos e R1 s cadeia carbônica do álcool reagente.....	46
Figura 5 - Diagrama esquemático da extração de lipídios por solvente orgânico apolar e por mistura de solvente polar e apolar onde: (●) lipídios; (○) solvente orgânico apolar; (◇) solvente orgânico polar; (1) solvente orgânico penetra através da membrana celular; (2) interação do solvente orgânico com os lipídios; (3) formação de complexo solvente-lipídios; (4) difusão do complexo solvente-lipídios através da membrana celular; (5) difusão do complexo solvente-lipídios através do filme estático de solvente orgânico formado ao redor da célula.....	50

### **Artigo 1 - CULTIVO MICROALGAL PARA GERAÇÃO DE ENERGIA UTILIZANDO EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Figura 1 - Fotobiorreator tubular vertical.....	58
Figura 2 – Curvas de crescimento (a) <i>Spirulina</i> sp LEB 18, (b) <i>Scenedesmus actus</i> LEB 116 e (c) <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 onde: adição de glicerol 0,01mol.L <sup>-1</sup> nos tempos (●) 0 d, 5 d, 10 d e 15 d, (◆) 10 d e (□) 0 d.....	61

### **Artigo 2 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOFIXAÇÃO CO<sub>2</sub> E PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR *Spirulina* sp LEB 18**

Figura 1 - Esquema do biorreator tubular horizontal equipado com <i>air-lift</i> .....	73
Figura 2- Curva de crescimento da microalga <i>Spirulina</i> sp LEB 18.....	77



## APÊNDICES

### A

- Figura 1A – Inóculos das microalgas *Spirulina* sp LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus actus* LEB 116 em fotobiorreatores erlenmeyers.....97
- Figura 2A – Experimento em fotobiorreator tubular vertical com as microalgas *Spirulina* sp LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus actus* LEB 116 com adição de glicerina 0,01 mol.L<sup>-1</sup> sob difentes formas de condução do cultivo.....97
- Figura 3A – Experimento microalga *Scenedesmus actus* LEB 116 experimentos: A e B - duplicata cultivo sem adição de glicerina, C e D – Cultivo com adição de glicerina, 0,01 mol.L<sup>-1</sup> batelada alimentada com adição nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d onde (1) 3 dias de experiment e (2) 5 dias de experiment.....98
- Figura 4A – Experimento microalga *Scenedesmus actus* LEB 116 após 5 dias de experimento. (A) cultivo sem adição de glicerina e (B) cultivo com adição de glicerina, 0,01 mol.L<sup>-1</sup> batelada alimentada com adição nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d. (1) Visualização dos aglomerados celulares a partir da aproximação do reator. (2) Visualização dos aglomerados celulares em microscópio 40x.....98
- Figura 5A – Cultivo em fotobiorreator tubular horizontal equipado com *air-lift* da microalga *Spirulina* sp LEB-18 em meio Zarrouk utilizando CO<sub>2</sub> (10% v/v) como fonte de carbono e redução da fonte nitrogenada (KNO<sub>3</sub>) em 50%. (A) Inóculo e (B) Início do experimento.....99
- Figura 6A – Biodiesel extraído do experimento com microalga *Spirulina* sp LEB 18 cultivada em fotobiorreator tubular horizontal equipado com *air-lift*, meio Zarrouk utilizando CO<sub>2</sub> (10% v/v) como fonte de carbono e redução da fonte nitrogenada (KNO<sub>3</sub>) em 50%.....99
- Figura 7A – Cromatografia em camada delgada amostras: (A) biodiesel de óleo de soja e (B)(C) duplicata biodiesel microalgal.....99

### B

- Figura 1 B Curva de crescimento *Scenedesmus actus* LEB 116 (●) e *Chlorella fusca* LEB 111 (□) cultivadas em meio complementado com glicerina P.A. 0,05 mol.L<sup>-1</sup>.....100
- Figura 2 B Esquema fotobiorreator tubular vertical adaptado com bomba de circulação de meio de cultivo (a) Esquema em funcionamento inóculo de *Chlorella fusca* LEB 111 em meio complementado com glicerina P.A. 0,01 mol.L<sup>-1</sup> (1d) e (b) Montagem do sistema.....101



## SUMÁRIO

RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xix
LISTA DE FIGURAS .....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral .....	29
2.2 Obejtivos específicos.....	29
3 JUSTIFIC2ATIVA .....	31
4. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA.....	33
4.1 Microalgas .....	33
4.1.1 Biofixação de CO <sub>2</sub> por microalgas .....	35
4.1.2 Cultivo de microalgas utilizando glicerol como fonte de carbono.....	36
4.2 Metabolismo de lipídios em microalgas.....	39
4.2.1 Acúmulo de carboidratos no interior da célula.....	41
4.2.2 Formação de acetil-CoA/Malonil-CoA .....	41
4.2.3 Síntese de ácido palmítico e ácidos graxos de cadeia longa .....	42
4.3 Biodiesel Microalgal .....	43
4.4 Transesterificação de lipídios .....	46
4.4.1. Catálises homogêneas ácidas e básicas .....	47
4.4.2. Catálise heterogênea química .....	47
4.4.3 Catálise heterogênea enzimática.....	48
4.4.4 Transesterificação <i>in situ</i> .....	48
4.5 Extração de lipídios de microalgas por solventes orgânicos.....	49
4.6 Considerações finais.....	51
5. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO .....	53



5.1. Artigo 1 - CULTIVO MICROALGAL PARA GERAÇÃO DE ENERGIA UTILIZANDO EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL .....	55
5.1.1 Introdução .....	56
5.1.2 Materiais e Métodos.....	57
5.1.2.1 Micro-organismos e preparação de inóculos .....	57
5.1.2.2 Condições de cultivo.....	57
5.1.2.3 Crescimento celular e parâmetros cinéticos.....	58
5.1.2.4 Quantificação de lipídios .....	59
5.1.2.5 Determinação de ésteres metílicos e composição de ácidos graxos .....	59
Rendimento de biodiesel.....	59
5.1.3 Resultados e Discussão .....	60
5.1.4 Conclusão.....	67
5.1.5. Referencias Bibliográficas .....	67
5.2 Artigo 2 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOFIXAÇÃO CO <sub>2</sub> E PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR <i>Spirulina</i> sp LEB 18.....	70
5.2.1. Introdução .....	71
5.2.2. Materiais e Métodos.....	72
5.2.2.2 Condições de cultivo.....	72
5.2.2.3 Crescimento celular e parâmetros cinéticos.....	73
5.2.2.4 Caracterização da biomassa .....	74
Composição de carboidratos, proteínas e lipídios.....	74
Determinação de ésteres metílicos e composição de ácidos graxos .....	74
Rendimento de biodiesel.....	75
Transesterificação <i>in situ</i> .....	75
Biofixação de CO <sub>2</sub> .....	75
5.2.3. Resultados e Discussão .....	76
5.2.4. Conclusão.....	80
5.2.5. Referencias Bibliográficas .....	81

6. CONCLUSÃO GERAL .....	85
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	87
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
10. APÊNDICE .....	96



## 1 INTRODUÇÃO

O uso contínuo de combustíveis derivados do petróleo é reconhecido como forma de obtenção de energia não sustentável devido suas fontes esgotáveis e sua contribuição para o acúmulo de gases do efeito estufa. A aplicação de biocombustíveis provenientes de fontes biológicas, surgem como alternativa energética sendo propostos como promissora rota para redução da emissão de CO<sub>2</sub> e dependência mundial por combustíveis fósseis (PANDEY et al., 2014). O biodiesel é um biocombustível, geralmente produzido por meio de plantas oleaginosas como soja e palma (TRAN, CHEN, CHANG, 2013). Problemas associados ao cultivo de vegetais superiores para a produção de biocombustíveis estão relacionados principalmente a safra e a quantidade de terra disponível para plantio (PANDEY et al., 2014). Além disso, o uso de alimentos para essa finalidade pode gerar um aumento no preço desses produtos, muitos básicos para a alimentação humana (THOMPSON; MEYER, 2013).

A biomassa microalgal tem sido proposta como matéria-prima para a produção de energia e outros bioprodutos. Além da alta produtividade, para o cultivo de microalgas podem ser utilizadas águas residuais, não são necessárias terras férteis e a colheita pode ser realizada diariamente. Esses micro-organismos possuem habilidade de se desenvolver em diferentes condições ambientais, podendo ser cultivados o ano inteiro. Possuem capacidade de modificar eficientemente seu metabolismo lipídico sob condições de estresse celular tornando-se interessantes para síntese de triacilgliceróis apolares, substrato para produção de biodiesel (DAMIANI et al., 2010). O conteúdo médio de lipídios das células microalgais pode variar entre 1% e 70%, compostos de glicerol, açúcares ou bases esterificadas em ácidos graxos saturados ou insaturados (SPOLAORE et al., 2006; LOURENÇO, 2006).

A produção de biocombustíveis por microalgas possui como principal desafio a redução dos custos de produção. O cultivo destes micro-organismos requer meios de cultura compostos por diversos nutrientes, incluindo carbono, que representa cerca de 50% do total de compostos (DOUCHA, STRAKA; LIVANSKY, 2005). Pesquisas na área de biotecnologia microalgal para produção de energia, tem focado o estudo de substratos mais econômicos. A aplicação de efluentes industriais, incluindo os da própria indústria bioenergética, como glicerol e CO<sub>2</sub>, representa uma redução nos custos de produção e tratamento destes fluidos (FENG et al., 2014). Outra alternativa para redução de custos da produção de biocombustíveis de origem microalgal, envolvem a produção de biocompostos, de alto valor agregado paralelamente dentro do conceito de fotobiorrefinaria (GOUVEIA, 2011).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Cultivar microalgas utilizando efluentes líquido (glicerol) e gasoso (CO<sub>2</sub>) da indústria bioenergética e avaliar a capacidade de conversão em biodiesel da biomassa obtida.

### 2.2 Obejtivos específicos

Avaliar a capacidade de produção de lipídios e desenvolvimento celular por microalgas utilizando efluentes liquido (glicerol) e gasoso (CO<sub>2</sub>) produzidos a partir da produção de biodiesel;

Selecionar microalgas que apresentem máximo teor de lipídios e rendimento de biodiesel em cultivos complementados com glicerol;

Avaliar a capacidade de biofixação de CO<sub>2</sub> e produção de biodiesel pela microalga *Spirulina* sp LEB-18;

Determinar o perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos das microalgas cultivadas para avaliação da qualidade do biodiesel a ser extraído.



### 3 JUSTIFICATIVA

O diesel, combustível de origem fóssil, tem função essencial na economia industrial de um país pelo seu uso no transporte de bens industriais e agroindustriais. Segundo dados da Agência Nacional de Petróleo (ANP) o óleo diesel representa 55,7% na matriz de combustíveis veiculares no Brasil. A elevada demanda de energia no mundo industrializado e os problemas de poluição causados devido ao uso difundido de combustíveis fósseis, tornam cada vez mais necessário estudar fontes de energia renováveis de duração ilimitada e de menor impacto ambiental. Esta constatação estimulou o interesse recente na busca de fontes alternativas para combustíveis derivados do petróleo (MEHER et al., 2006).

A biomassa microalgal pode ser utilizada na formulação de diversos bioprodutos devido sua composição rica em nutrientes como proteínas, lipídios e carboidratos que vem sendo muito estudados como fonte de energia (MORAIS; COSTA, 2007a). Esses microorganismos reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular, a manipulação de condições de cultivo, presença ou ausência de nutrientes, estimulam a biossíntese de determinados compostos. Os lipídios são um dos principais componentes das microalgas e desempenham importante papel nutricional como fonte de energia e ácidos graxos essenciais (NELSON; COX, 2011). Além disso, os ácidos graxos de microalgas podem ser utilizados para produção de biodiesel que é um combustível menos poluente que o diesel de petróleo (MORAIS; COSTA, 2008).

Na área energética as microalgas tem se destacado devido a habilidade de se desenvolver em diferentes condições ambientais e capacidade de modificar o metabolismo, tornando-se interessantes para síntese de triacilgliceróis apolares (TAGs), o melhor substrato para produção de biodiesel (DAMIANI et al., 2010). Para o cultivo de microalgas podem ser utilizadas terras não usadas para a agricultura, diferente das fontes de alimentos utilizadas para produção de biodiesel como a soja (COSTA; MORAIS, 2011). O uso de alimentos para a produção de biocombustíveis pode acarretar no aumento do preço desses produtos, muitos básicos para a alimentação humana como os cereais (THOMPSON; MEYER, 2013).

O cultivo de microalgas, especialmente utilizando resíduos ricos em nutrientes, constituem possibilidade promissora de obtenção de compostos com potencialidade para a geração de energia, ao mesmo tempo que favorece uma forma de controle para estes materiais. Podem crescer utilizando o CO<sub>2</sub>, principal gás de efeito estufa, proveniente da queima de combustíveis fósseis, como única fonte de carbono pelo metabolismo autotrófico, ou utilizar fontes de carbono orgânicas, como glicerol pelo metabolismo heterotrófico e mixotrófico (ANDRADE; COSTA, 2008). O glicerol é um efluente da conversão de óleos vegetais em



biodiesel. Após a reação de transesterificação aproximadamente 10% da matéria-prima é convertida a glicerol. Como consequência, uma grande quantidade de glicerol vem se acumulando e a utilização deste composto como fonte de carbono é uma forma de agregar valor a esta matéria-prima através da geração de bioprodutos. As microalgas quando cultivadas com glicerol podem sintetizar metabólitos de alto valor agregado, como por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa (ABAD; TURON, 2012).

O Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande, desde 1996, trabalha na linha de pesquisa em torno das propriedades e condições de cultivo de microalgas (MORAIS et al., 2014). Entre os diversos aspectos pesquisados, já foram estudados substratos alternativos para o crescimento (FREITAS, 2012; BRACHER, 2015; MORAIS; DUARTE, 2012), configurações de fotobiorreatores e modos de cultivo (MORAES, 2014; RADMANN, et al., 2007), efeito de fatores como temperatura (COLLA et al., 2004), iluminância (ANDRADE; COSTA, 2007), taxa de renovação e concentração de corte (MOREIRA, 2014) no crescimento e composição da biomassa de microalgas. Nos estudos relacionados a produção de biocombustíveis, foram realizados *screening* de cepas para a produção de bioetanol (MARGARITES, 2010; MARGARITES, 2014) e produção de biometano (ANDRADE, 2009; FRANK, 2013, GOULARTE, 2014). Em relação ao estudo de substratos alternativos para o crescimento e produção de biocombustíveis, o presente trabalho pretende contribuir de modo significativo nas pesquisas do grupo de trabalho.

## 4. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

### 4.1 Microalgas

As microalgas são organismos que desempenham um papel chave nos ecossistemas aquáticos. Estima-se que cerca de 40% da fotossíntese global é executada por esses micro-organismos. São responsáveis pela base da maior parte da cadeia trófica aquática. Em alguns ambientes costeiros, a biomassa de microalgas pode igualar ou até mesmo ultrapassar a biomassa de bactérias (MORENO-GARRIDO, 2008). Esses micro-organismos reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular. Desta maneira, a manipulação de condições de cultivo, presença ou ausência de determinados nutrientes, estimula a biossíntese de compostos. Este fato foi pela primeira vez referenciado por Tamiya (1957) em Richmond (1990), que modificou a composição da biomassa de *Chlorella*, principalmente o seu teor em lípidos e proteínas, variando as condições de cultivo.

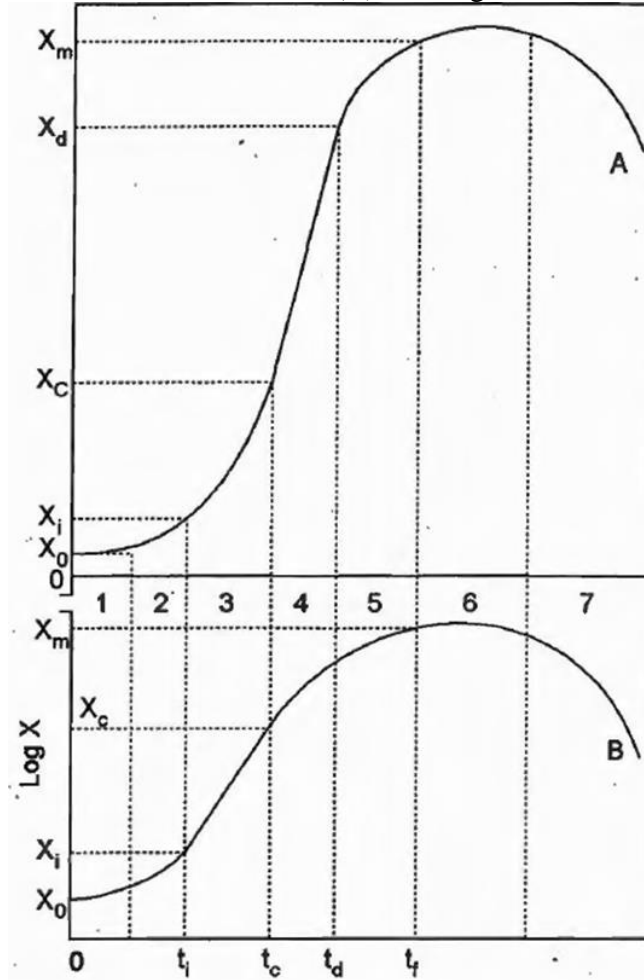
Microalgas de células procarióticas (cianobactérias), não possuem organelas ligadas a membrana (plastídios, mitocôndrias, núcleo, complexo de Golgi e flagelos) e são mais similares a bactérias do que a algas. As de células eucarióticas, que abrangem uma grande quantidade de espécies, possuem organelas que controlam as funções celulares, permitindo a sobrevivência e reprodução. As microalgas eucarióticas são categorizadas em uma variedade de classes basicamente definidas por sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular. As classes mais importantes são: algas verdes (*Chlorophyta*), algas vermelhas (*Rhodophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*) (KHAN et al., 2009).

O metabolismo das microalgas pode ser autotrófico ou heterotrófico, o primeiro requer apenas compostos orgânicos como CO<sub>2</sub>, sais e energia solar para o desenvolvimento; o segundo, não realiza fotossíntese, portanto requer uma fonte de compostos orgânicos externa para utilizar como nutriente e fonte de energia. Algumas espécies fotossintéticas são mixotróficas, possuem habilidade de realizar fotossíntese e utilizar fontes orgânicas exógenas (LEE, 1980). O metabolismo envolvido pode ser distinguido de acordo com as mudanças de pH que dependem da estequiometria do desenvolvimento da microalga. *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*, são exemplos de espécies que crescem sob condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas (CHOJNACKA; MARQUES-ROCHA, 2004).

Não apenas substrato orgânico de carbono, vitaminas, sais e outros nutrientes (nitrogênio e fósforo) são vitais para o crescimento das microalgas, mas também o equilíbrio entre os parâmetros operacionais (pH, temperatura e intensidade luminosa) (WILLIAMS, 2002). É importante definir a influência desses parâmetros, e sua correlação para poder manipulá-los. Desta forma é possível obter controle sob a composição da biomassa microalgal,

até mesmo em cultivos em grande escala. Sob condições ótimas para seu crescimento, as microalgas se desenvolvem abundantemente, normalmente, são capazes de dobrar a biomassa dentro de 24 h, ou até em 3,5 h na fase de crescimento exponencial (CHISTI, 2007).

**Figura 1** – Curva de crescimento de um micro-organismo em cultivo descontínuo onde: (A) ordenadas lineares e (B) semilogarítmica.



Fonte: SCHMIDELL et al. (2001)

Na Figura 1, 7 fases de crescimento estão bem definidas nas curvas A e B: (1) fase lag; (2) fase de transição (3) fase de crescimento exponencial; (4) fase de crescimento linear; (5) fase de desaceleração; (6) fase estacionária e (7) declínio ou morte celular. Na primeira fase (lag ou adaptação), o micro-organismo sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos compostos presentes no meio, e ocorre logo após a inoculação. Essa etapa é seguida pela fase 2, onde inicia a reprodução celular e a velocidade específica de crescimento vai aumentando até atingir a fase exponencial (fase 3), onde esta velocidade é constante e máxima. Na fase 4, a velocidade de reprodução é constante até atingir a fase de desaceleração (fase 5), que ocorre devido ao esgotamento de um ou mais nutrientes no meio. A fase estacionária (6) é onde o

micro-organismo atinge concentração celular máxima e a velocidade de reprodução celular é igual a de morte, até a fase 7, onde a concentração celular diminui a uma velocidade que excede a de reprodução (SCHIMIDELL et al., 2001).

Geralmente, culturas microalgais, na fase de crescimento exponencial contém mais proteína na sua biomassa devido a multiplicação celular e desenvolvimento. A maior produção de lipídios e carboidratos ocorre na fase estacionária como forma de reserva de energia. A biomassa microalgal é rica em lipídios polares na fase exponencial e acumula triacilgliceróis (reserva) na fase estacionária (DUNSTAN et al., 1993).

As microalgas têm sido objeto de numerosas investigações em centros de pesquisa de diversos países. Os cultivos são realizados com várias finalidades, como para a produção de produtos farmacêuticos, alimentícios e fertilizantes e mais recentemente têm sido propostos como fonte de energia (SCAPIN, 2005; SCRAGG et al., 2003). Estudos têm mostrado sua aplicação na produção de biocombustíveis (GAO et al., 2010; HO et al., 2010) e na mitigação de gases que causam o aquecimento global (MORAIS; COSTA, 2007b).

#### **4.1.1 Biofixação de CO<sub>2</sub> por microalgas**

Várias estratégias para mitigação do CO<sub>2</sub> já foram estudadas e podem ser generalizadas em 3 categorias: fixação química (WANG et al., 2008), geofixação (ADAMS; CALDEIRA, 2009) e fixação biológica. A fixação biológica pode ser atribuída a fixação realizada pelos vegetais superiores e microalgas através da fotossíntese. Apesar de serem mecanismos muito parecidos, devido ao seu rápido desenvolvimento, a fixação por microalgas é considerada mais eficiente que a das plantas, podendo biofixar de 10-50 vezes mais CO<sub>2</sub> (DEMIRBAS, 2011; MORAIS; COSTA, 2008).

As microalgas são capazes de fixar CO<sub>2</sub> de diferentes fontes que podem ser divididas em 3 categorias: (1) CO<sub>2</sub> atmosférico; (2) CO<sub>2</sub> de exaustão industrial; (3) CO<sub>2</sub> fixado na forma de carbonatos solúveis (NaHCO<sub>3</sub> e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). As microalgas são cultivadas em sistemas fechados ou abertos, que são aerados ou expostos ao ar para permitir que as cepas capturem CO<sub>2</sub> da atmosfera para crescimento celular. Sabendo-se que atmosfera contém entre 0,03 – 0,06% de CO<sub>2</sub> é esperado que essa transferência de massa seja limitada, podendo reduzir o desenvolvimento celular. Por outro lado, gases de exaustão industrial, como os gases de combustão podem conter acima de 15% de CO<sub>2</sub>, sendo uma fonte rica em CO<sub>2</sub> para o cultivo e potencial rota para biofixação eficiente de CO<sub>2</sub>. A terceira rota é a fixação de CO<sub>2</sub> através de reação química para produção de carbonatos, utilizando-os como fonte de carbono para o cultivo de microalgas (WANG et al., 2008).

O mecanismo de biofixação de CO<sub>2</sub> por microalgas é baseado na capacidade que esses micro-organismos possuem de realizar fotossíntese. Na fotossíntese plantas e micro-organismos fotossintéticos convertem energia solar em energia química através da seguinte equação:  $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{energia solar} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ . Nesta reação a intensidade luminosa e a qualidade de irradiação desempenham papel vital na taxa de crescimento celular (RAVELONANDRO et al., 2008).

A fotossíntese ocorre em duas etapas, fase clara, que acontece apenas quando as células estão iluminadas, e reações de fixação de carbono, também conhecidas como fase escura, que ocorre tanto sob presença quanto ausência de luz. No centro da fotossíntese existem dois complexos fotoativos principais, o fotossistema I (PSI) e o fotossistema II (PSII), que absorvem a luz solar para a cadeia de transporte de elétrons através de um dímero excitado de clorofila (IVERSON, 2006). A fotossíntese se inicia no complexo PSII e então transfere elétrons através da excitação do dímero clorofila P680 até o PSI. Assim, o PSI transfere os elétrons recebidos do PSII via o dímero clorofila P700, que é oxidado pelo complexo da antena reduzindo NADPH (CERVENY et al., 2009) e ferredoxin, que posteriormente é utilizado nas reações de fixação de CO<sub>2</sub> através do ciclo de Calvin (reações escuras) (IVERSON, 2006). No ciclo Ciclo de Calvin, 3 moléculas de ATP e 2 moléculas de NADPH são consumidas para cada molécula de CO<sub>2</sub> convertida em carboidrato de acordo com a reação:  $3\text{CO}_2 + 9\text{ATP} + 6\text{NADPH} + \text{água} \rightarrow \text{gliceraldeído 3-fosfato} + 8\text{Pi} + 6\text{NADP}^+$  (NELSON, COX, 2011).

As enzimas D-ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RuBiscCO) e fosforibuloquinase, são essenciais para o ciclo de Calvin, elas são responsáveis pela fixação do dióxido de carbono e catalisam a regeneração do aceptor de CO<sub>2</sub>. Na reação central de fixação de carbono, um átomo de carbono inorgânico é convertido em carbono orgânico. O CO<sub>2</sub> disponível combina-se com a ribulose 1,5-bifosfato e água para resultar em duas moléculas do composto 3-fosfoglicerato. A reação de fixação é catalisada no estroma cloroplástico pela ribulose bifosfato carboxilase (GIORDANO et al., 2005).

#### **4.1.2 Cultivo de microalgas utilizando glicerol como fonte de carbono**

A substituição de fontes de carbono tradicionais, como a glicose e bicarbonato de sódio, por fontes de baixo custo como resíduos industriais tem um impacto positivo na economia de um bioprocessamento. A redução de custo no meio de cultivo, mesmo que com um mínimo efeito indesejado é crucial para aplicação industrial. Nesse cenário, o glicerol bruto um bioproduto industrial, disponível em grande quantidade, é visto como uma fonte alternativa as fontes tradicionais como a glicose (SILVA et al., 2009).

Os meios de cultivo com glicerol tem aplicação reconhecida para diferentes micro-organismos, dentre os quais, estão as microalgas. Esses micro-organismos são capazes de se desenvolver em meio complementado com glicerol, produzindo diversos bioprodutos como, carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados (YAGUCHI et al., 1997; YOKOCHI et al., 1998; POOKSAWANG et al., 2009).

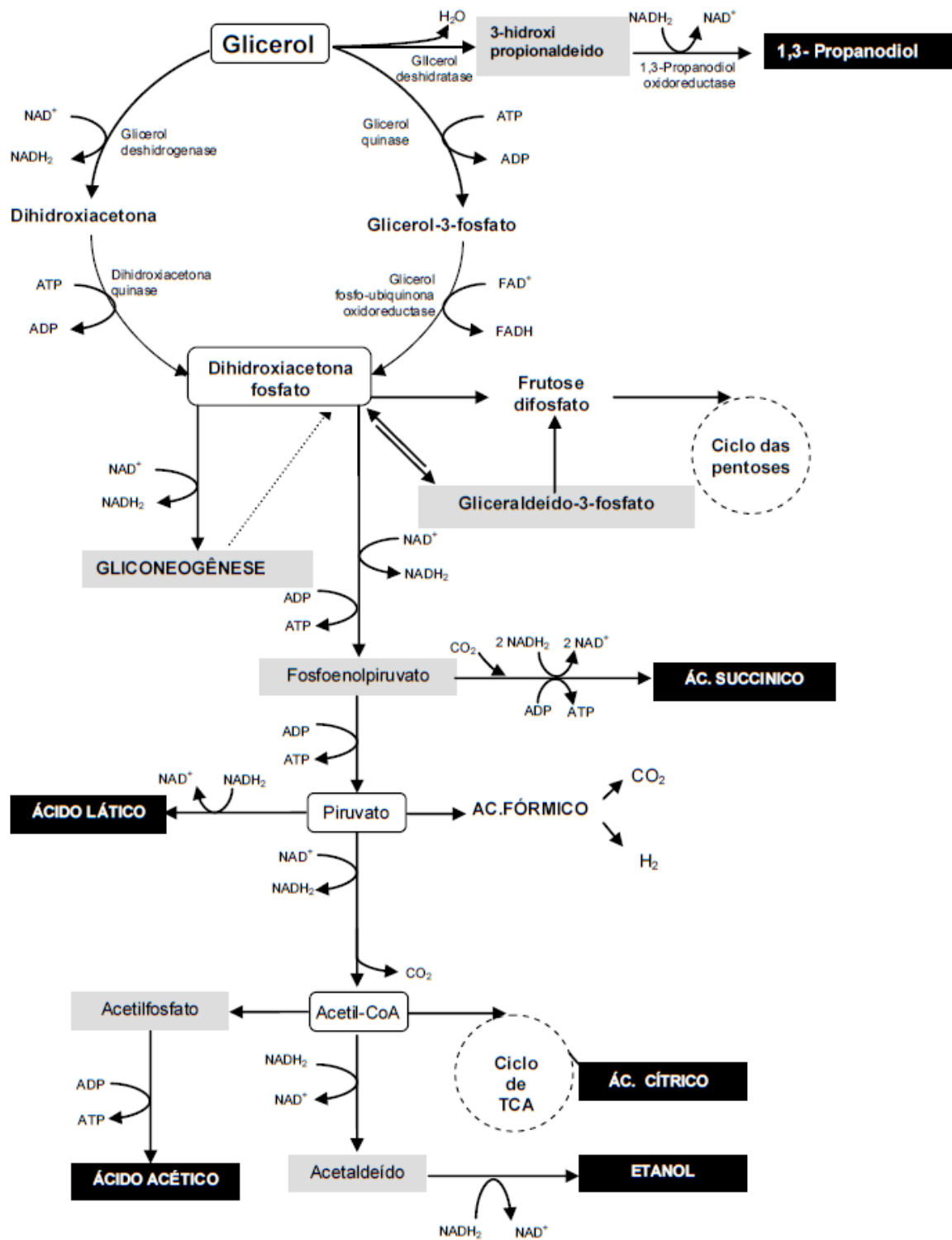
A primeira etapa para o metabolismo do glicerol por micro-organismos é o transporte através da membrana celular por transporte passivo e transporte ativo. O transporte passivo, ocorre devido ao gradiente de pressão entre o interior da célula e o meio de cultivo que possui pressão superior a intracelular. Inclui difusão simples e facilitada através de proteínas localizadas nas camadas mais internas da membrana plasmática (MP) chamadas permeases. Outros autores, acreditam no transporte ativo para a excreção do glicerol por micro-organismos que ocorre contra o gradiente de concentração mediante atuação de proteínas específicas (CHÁVEZ, 2008) (Figura 2).

Após a passagem pela membrana, o glicerol pode ser catabolizado diferentes rotas metabólicas onde a principal consistiria na fosforilação do glicerol pela enzima glicerol-quinase, para formar glicerol-3-fosfato, que é reduzido a dihidroxiacetona fosfato pela enzima fosfo-ubiquinona oxidoreductase (GANCEDO; GANCEDO, 1968) O crescimento de micro-organismos em fontes de carbono como glicerol, requerem a capacidade de sintetizar hexoses através da via das hexoses, que requer elevado gasto energético (WALKER, 1998). Outra via catabólica seria a da oxidação de glicerol e formação de dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase (TANI, YAMADA, 1987). Depois de ser assimilado dentro da célula, numerosos compostos são produzido como resultado do metabolismo do glicerol entre metabólitos que cumprem a função de crescimento e reprodução das células microbianas (CHÁVEZ, 2008).

A presença de etanol no glicerol bruto foi reportado como benéfico e estimulante do desenvolvimento de algumas microalgas para a produção de PUFA (SWAAF et al., 2003). No entanto a presença de metanol afetou negativamente tanto o crescimento celular quanto a produção de ácidos graxos poli-insaturados. Quando o efeito do metanol foi investigado, a máxima concentração celular e produtividade foi inversamente proporcional a quantidade de metanol no meio de cultivo. A composição de ácidos graxos nesses experimentos se manteve constante. Pyle (2008) indicao que o metanol seja eliminado do meio de cultivo para desenvolvimento de microalgas através de evaporação. A presença de sabão apresentou impacto significativo sobre o crescimento celular e composição de ácidos graxos comparando cultivos com presença do interferente e sem o mesmo (PYLE, 2008; YAMANE et al., 1984). O sabão pode ser eliminado através da presença de um ácido forte.



Figura 2 - Metabolismo de assimilação do glicerol e seus possíveis produtos



Fonte: CHÁVES (2008)

#### 4.2 Metabolismo de lipídios em microalgas

Os lipídios são essenciais para manutenção de várias estruturas dos seres vivos e atuam em diversos processos metabólicos exercendo funções biológicas, como componente de



membranas, isolante térmico e reserva de energia. Lipídios de algas são compostos de glicerol, açúcares ou bases esterificadas em ácidos graxos saturados ou insaturados. Ao serem hidrolisados os lipídios liberam ácidos graxos e glicerol. Estes compostos são principalmente estocados nos vacúolos como um material de reserva, sendo que, o conteúdo de lipídios armazenado pelas microalgas pode ser bastante elevado em relação a quantidade total dos demais compostos (LOURENÇO, 2006).

As respostas aos estímulos ou a mudanças ambientais são inerentes a todos os organismos vivos. Nas microalgas, a resposta das células as condições ambientais definem os fatores como limitante, quando ocorre a redução da taxa de crescimento e/ou alguma reação bioquímica sem a necessidade de aclimação celular, ou estressante, que implica em um desequilíbrio metabólico o qual demanda ajustes bioquímicos antes que as células possam estabelecer um novo estado de crescimento ou biossíntese (RICHMOND, 2008)

A otimização dos fatores determinantes do crescimento tem capacidade de criar um aumento na concentração lipídica. Fatores como conteúdo de nitrogênio, intensidade luminosa, temperatura, salinidade e concentração de CO<sub>2</sub>. No entanto, melhorar o acúmulo de lipídios não resultara no aumento da produtividade lipídica nem de biomassa. O método mais efetivo para melhorar o acúmulo de lipídios na biomassa microalgal é a limitação de nitrogênio no meio de cultivo, não resulta apenas no acúmulo, mas também em uma mudança gradual da composição lipídica de ácidos graxos livres a triacilglicerol (TAG) (BRENNAN; OWENDE, 2010)

O aumento de ácidos graxos pode ocorrer sob diferentes salinidades, temperaturas, luminosidade e deficiência de nutrientes. Certas microalgas tem demonstrado a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídios totais, embora sejam normalmente de crescimento lento. O acúmulo de ácidos graxos está intimamente ligado aos estágios de crescimento da microalga, funcionando como energia ao ser acumulado durante condições desfavoráveis ou divisão celular (ADARME-VEJA, THOMAS-HALL; SCHENK, 2014).

Baseada na sequência homóloga e algumas características bioquímicas semelhantes de alguns genes e/ou enzimas isoladas das microalgas e plantas superiores que estão envolvidos no metabolismo de lipídeos, acredita-se que os caminhos básicos de biossíntese de ácidos graxos e triacilgliceróis (TAG) em microalgas são semelhantes aos das plantas superiores. A síntese de ácidos graxos em microalgas ocorre principalmente na membrana tilacóide e na região do estroma do cloroplasto. A via biosintética dos lipídios em microalgas ocorre através de 4 passos: acúmulo de carboidratos na célula, formação de acetil-CoA seguido por malonil-CoA, síntese de ácido palmítico e síntese de ácidos graxos de cadeia longa (PANDEY et al., 2014).

#### 4.2.1 Acúmulo de carboidratos no interior da célula

O acúmulo de compostos ricos em energia é o primeiro passo para a biossíntese de lipídios por microalgas. Esse acúmulo de carbono varia em condições autotróficas e heterotróficas. Organismos autotróficos sintetizam seus próprios carboidratos através da fotossíntese, enquanto heterotróficos assimilam do meio onde a célula se encontra (MADIGAN et al., 2010).

Em organismos fotoautotróficos, o cloroplasto é o local da fotossíntese onde, a etapa fotoquímica ocorre na tilacóide seguida pela fixação de CO<sub>2</sub> e produção de carboidratos no estroma na etapa química. Estes produtos finais da fotossíntese fornecem uma fonte endógena de acetil-CoA para mais vias biosintética de lipídios. O acúmulo heterotrófico de carboidratos pode ocorrer com presença ou ausência de luz, onde a absorção de carbono será através de um sistema ativo simporte de hexoses de fora da célula. Neste processo a célula investe energia em forma de ATP, no entanto, a assimilação de carbono é mais favorável no caso do processo independente de luz do que no dependente (NELSON; COX, 2011).

Nas microalgas capazes de realizar o caminho heterotrófico com ausência de luz, a luminosidade inibe a formação do sistema simporte hexose/H<sup>+</sup>, que reduz o transporte de glicose dentro da célula. No mecanismo heterotrófico em presença de luz, o carbono entra no citosol e segue a conversão da glicose em piruvato através da glicólise levando a geração de acetil-CoA, processo similar ao do mecanismo fotoautotrófico. Em sistemas mixotróficos, os sistemas autotrófico e heterotrófico ocorrem simultaneamente, e a preferência de captação do substrato depende da sua disponibilidade somado as características ambientais (PANDEY et al., 2014).

#### 4.2.2 Formação de acetil-CoA/Malonil-CoA

A fotossíntese fornece uma fonte endógena de acetil-CoA ativando sua síntese no estroma, a partir de acetato livre, ou a partir da conversão da glicose em piruvato durante a glicólise no citosol. Esse acetil-CoA é preferencialmente transportado do citosol para o plastídio, onde é convertido em ácido graxo e em seguida em TAG, onde novamente é transportado ao citosol formando os lipídios. O acetil-CoA é mantido através do ciclo de Calvin, glicólise e piruvato quinase (PK) mediante síntese do piruvato, que ocorre no cloroplasto. A primeira reação da via biosintética de ácidos graxos é a formação do malonil-CoA a partir do acetil-CoA e CO<sub>2</sub> e é catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase (PANDEY et al., 2014).

A enzima contém um grupo prostético, a biotina, e a reação ocorre em duas etapas. Primeiramente, um grupo carboxil é transferido para a biotina em uma reação dependente de ATP. O grupo biotinila age como um transportador temporário de CO<sub>2</sub>, transferindo-o para o acetil-CoA na segunda etapa, gerando malonil-CoA. Durante o processo, 7 moléculas de acetil-CoA e 7 moléculas de CO<sub>2</sub> formam 7 moléculas de malonil-CoA (NELSON; COX, 2011).

#### **4.2.3 Síntese de ácido palmítico e ácidos graxos de cadeia longa**

Após a formação das moléculas de malonil-CoA, através de uma sequência de reações repetitivas, em 4 etapas catalisadas por um sistema conhecido como ácido graxo-sintase (AGS) são construídas as longas cadeias de carbono dos ácidos graxos. Um grupamento acila saturado, produzido em cada série de reações em 4 etapas, torna-se substrato da condensação subsequente com um grupo malonila ativado. Em cada uma das passagens através do ciclo, a cadeia do grupo acila graxo aumenta em 2 carbonos. Com o sistema AGS, a síntese dos ácidos graxos leva a um único produto, e não são liberados intermediários. Quando o comprimento da cadeia atinge 16 carbonos (ácido palmítico), este produto deixa o ciclo (NELSON; COX, 2011).

O palmitato é o precursor do estearato, dos ácidos graxos saturados de cadeia longa, bem como palmoleico e oleico. O ácido palmítico é modificado e alongado para formar estearato (18:0) e ácidos graxos saturados mais longos por adição de grupo acetil, através da ação de sistemas de alongamento de ácidos graxos presentes no retículo endoplasmático (RE) liso e nas mitocôndrias. O mecanismo de alongamento no RE é idêntico a síntese de palmitato, que envolve doação de 2 carbonos por malonil-CoA, seguido de redução, desidratação, e redução a produto saturado de 18 carbonos, estearoil-CoA (NELSON; COX, 2011).

**Figura 3** - Representação esquemática da síntese de ácido graxo de cadeia longa a partir de ácido palmítico.



Fonte: Adaptado de PANDEY et al. (2014).

Em microalgas, oleato (do estearoil-CoA) é convertido a  $\alpha$  e  $\gamma$ -linoleato. O  $\alpha$ -linoleato ainda é convertido a outro ácido graxo poli-insaturado enquanto  $\gamma$ -linoleato converte-se a eicosatrienoato e até araquidonato (Figura 3) (THELEN; OHLOGGE, 2002). Mamíferos não são capazes de converter oleato a linoleato ou  $\alpha$ -linoleato por causa das enzimas que introduzem as ligações duplas aos átomos de carbono a partir do carbono 9 (C9). Todos os ácidos graxos contem dupla ligação a partir do C9 tem que ser adicionadas a dieta e são chamados ácidos graxos essenciais (NELSON; COX, 2011).

### 4.3 Biodiesel Microalgal

O biodiesel é um combustível renovável, biodegradável, constituído de uma mistura de ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos obtidos por reação de transesterificação de qualquer triacilglicerol com um álcool de cadeia curta. Em relação ao diesel convencional, o biodiesel se destaca devido a capacidade de equilibrar o balanço negativo gerado pela emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera. Comparado ao diesel convencional, o biodiesel, reduz a emissão de compostos sulfurados (SO<sub>x</sub>), monóxido de carbono (CO) e materiais particulados (MP), porém,

aumenta as emissões de óxido de nitrogênio (NO<sub>x</sub>)(VISENTAINER; SANTOS, 2013; HOEKMAN; ROBBINS, 2012), .

A matéria-prima é um dos pontos mais importantes na produção do biodiesel já que faz parte de 70% dos custos de produção deste biocombustível. Para o biodiesel brasileiro, os óleos vegetais e as gorduras animais são as principais matérias-primas. A viabilidade da aplicação das oleaginosas depende de aspectos como teor de óleo, produtividade por unidade de área, adequação a diferentes sistemas produtivos, sazonalidade e ciclo de vida da planta (VISENTAINER; SANTOS, 2013). Sistemas biológicos são comumente caracterizados por transformarem compostos energeticamente pobres em produtos de alto valor agregado. A transformação da energia solar, fonte energética mais abundante do nosso planeta, em compostos orgânicos, ocorre durante o metabolismo fotossintético, sendo as microalgas o grupo mais eficiente (HENRIKSON, 1994).

A utilização de biomassa microalgal para a produção de biodiesel chama atenção devido a elevada produtividade e principalmente a capacidade de cultivos em locais inóspitos (DEMIRBAS, 2008). O cultivo de microalgas pode ser realizado em qualquer estação do ano pois, esses micro-organismos toleram grandes variações de temperatura para seu cultivo. Além disso, podem crescer utilizando o CO<sub>2</sub>, como única fonte de carbono pelo metabolismo autotrófico, ou utilizar fontes de carbono orgânicas, como glicose e glicerol pelo metabolismo heterotrófico (ANDRADE; COSTA, 2007). O cultivo de microalgas apresenta custos relativamente baixos para a colheita e transporte e menor gasto de água (SHEEHAN et al. 1998). As microalgas apresentam maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores e podem ser cultivadas em meio salino simples; além disso, são eficientes fixadoras de CO<sub>2</sub> (BROWN; ZEILER, 1993).

Muitas espécies de microalgas podem ser induzidas a acumular quantidade consideráveis de lipídios, contribuindo assim para obtenção de maior rendimento de óleo. O teor médio de lipídios varia entre 1 e 70% do peso seco, e pode variar de acordo com as alterações no meio de cultivo. As microalgas *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus*, *Tetraselmis* apresentam níveis de óleo entre 20% e 50%. Na seleção de espécies adequadas para produção do biocombustível, devem-se considerar outros fatores como a composição de ácidos graxos existentes nas diferentes espécies de microalgas. A composição de ácidos graxos tem efeito significativo sobre as características qualitativas e quantidade do biodiesel produzido. A biomassa microalgal pode ser composta por ácidos graxos saturados e insaturados com 12 a 22 átomos de carbono, alguns deles das famílias  $\omega$  3 e  $\omega$  6 (WANG et al., 2008; LI et al., 2008; CHISTI, 2007; SPOLAORE et al., 2006).

Nautiyal, Subramanian; Dastidar (2014a), estudaram as características do biodiesel obtidos a partir de *Spirulina platensis*. A viscosidade e a densidade do óleo, tem relação direta com o processo de atomização durante a combustão, quanto menores os valores destes parâmetros, melhor a performance de ignição do óleo (RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLO-JACOB, 2012). A densidade do óleo obtido a partir da microalga se enquadra as normas europeias e se iguala ao óleo de girassol, aproximando-se dos valores obtidos para o Diesel e Palma. O óleo microalgal, possui viscosidade dentro dos padrões americanos e superior ao dos óleos de girassol, palma e diesel (Tabela 1).

**Tabela 1** - Características dos óleos de *Spirulina platensis*, Girassol, Palma, Diesel e Normas americana e européia

Propriedades	Óleos					
	<i>S. platensis</i> <sup>1</sup>	Girassol <sup>2</sup>	Palma <sup>3</sup>	Diesel <sup>4</sup>	D6751 <sup>5</sup>	EN14214 <sup>6</sup>
Densidade (kg.m <sup>-3</sup> )	860	860	876	855	870-900	860-900
Viscosidade a 40°C (mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	5,7	4,72	4,76	3,06	1.9-6.0	3.5-5.0
Acidez (mg <sub>KOH</sub> .g <sup>-1</sup> )	0,4	0,07	-	-	<0,8	<0,5
Poder Calorífico (MJ.kg <sup>-1</sup> )	41,4	-	-	43,8	-	32,9
Ponto de Fulgor (°C)	130	183	170	76	100-170	>101
Ponto de Fluidez (°C)	-18	-5	-17	-16	-31	-

Fonte: <sup>1</sup> NAUTIYAL, SUBRAMANIAN;DASTIDAR (2014a); <sup>2</sup> NAUREEN et al. (2014); <sup>3</sup> SARIN et al. (2007); <sup>4</sup> SINGH; SINGH (2010); <sup>5</sup> AMERICAN STANDARDS (ASTM D6751); <sup>6</sup> EUROPEAN STANDARDS (EN 14214)

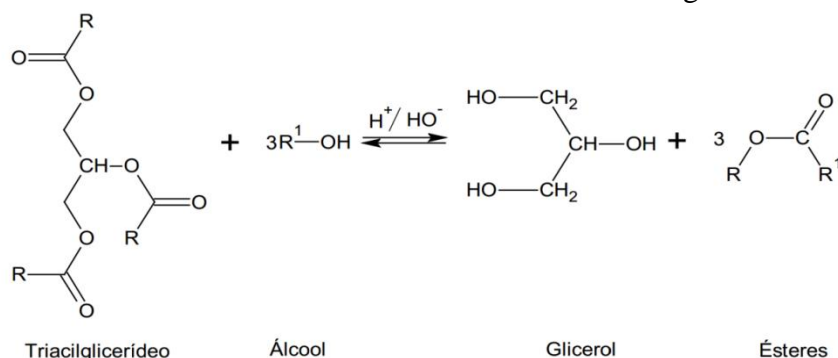
A acidez é a medida de ácidos graxos livres no óleo, que deve ser a mais baixa possível afim de não formar sabões na transesterificação que podem causar problemas no motor, especialmente sobre os bicos injetores (NAUREEN et al., 2014). A acidez do óleo obtido através de *Spirulina platensis* é 0,45 mg KOH.g<sup>-1</sup>, valor adequado segundo os padrões europeu e americano. O óleo microalgal possui menor poder calorífico do que o diesel. Quanto maior o poder calorífico, menos combustível é consumido, pois menor quantidade é necessária para manter a potência de ignição específica. O poder calorífico superior da microalga, deve-se a maior quantidade de oxigênio no biocombustível (NAUTIYAL, SUBRAMANIAN; DASTIDAR, 2014 b).

O ponto de fluidez é a menor temperatura na qual o combustível pode fluir, sem gelificar. O biodiesel microalgal apresenta ponto de fluidez  $-18^{\circ}\text{C}$ , próximo ao do diesel. Quanto ao ponto de fulgor, o óleo obtido a partir da microalga *Spirulina platensis* encontra-se dentro das normas americana e europeia, sendo inferior ao da palma e girassol.

#### 4.4 Transesterificação de lipídios

A transesterificação é a conversão química de triacilglicerídeos em metil ésteres através de álcool e catalisador. A reação converte 3 moles de álcool e um mol de triacilglicerídeos em um mol de glicerol e 3 moles de ésteres metílicos (Figura 4). Os álcoois comumente utilizados na transesterificação são metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico. Metanol é o álcool mais utilizado devido seu baixo custo e vantagens físicas e químicas. No Brasil, etanol tem sido estudado com substrato para as reações de transesterificação (BAHADAR; KHAN, 2013).

**Figura 4** - Equação de transesterificação. R representa a cadeia carbônica dos ácidos graxos e R1 a cadeia carbônica do álcool reagente.



Fonte: SCHUCHARDT, SERCHELI; VARGAS (1997).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos resultantes da transesterificação de lipídios são utilizados como biocombustível. O glicerol, obtido na transesterificação, é um poliálcool, pode ser encontrado em diversas fontes, porém, não em sua forma livre pois em geral se encontra como um triglicerídeo combinado. O glicerol bruto, obtido através da transesterificação do biodiesel, contém cerca de 20% de impurezas dentre elas: catalisador, álcool, ácidos graxos, sais e água. O teor de impurezas vai depender da matéria-prima utilizada e do tipo de catálise empregada para a produção do biodiesel. O glicerol bruto tem poucas aplicações diretas, purificado, tem muitas aplicações na indústria química (fabricação de tintas, celofane e papel), alimentícia (emulsificante) e cosmética (umectante), porém, a demanda é

menor do que a quantidade produzida através da transesterificação (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011). O glicerol, tem sido estudado também como fonte de carbono para cultivo de diversos micro-organismos, como as microalgas (ABAD; TURON, 2012).

Como a composição de ácidos graxos, teores de água e de ácidos graxos livres podem variar nas matérias-primas destinadas a produção de biodiesel, são necessários alguns cuidados na escolha do catalisador para o processo de obtenção do biodiesel, a fim de obter maior rendimento, qualidade e menor quantidade de efluentes gerados. Os catalisadores incluem ácidos, bases e enzimas como as lipases (VISENTAINER; SANTOS, 2013)

#### **4.4.1. Catálises homogêneas ácidas e básicas**

As catálises homogêneas básicas ocorrem mais frequentemente e envolvem a presença de base catalítica. Experimentalmente as reações catalisadas com base mais rápidas do que as catalisadas por ácido. As reações catalisadas por bases podem ser otimizadas a 60°C à pressão atmosférica por 90 min (BAHADAR; KHAN, 2013). Na aplicação de uma catálise homogênea básica na biomassa microalgal, a presença de ácidos graxos livres (AGL) na matéria-prima (mais de 0,5% v/v) dificulta a aplicação de bases para reação de transesterificação. Isto ocorre porque AGL reagirá com o catalisador básico formando sabão. A reação de saponificação diminui a disponibilidade dos triacilgliceróis para formação dos ésteres correspondentes e aumenta a solubilidade dos ésteres formados em meio ao glicerol, aumentando a perda de ésteres na hora de separar o glicerol do biocombustível (VISENTAINER; SANTOS, 2013). Desta forma a catálise ácida pode ser uma alternativa, pois não é sensível a presença de AGL no óleo.

A transesterificação catalisada por ácido envolve ácido catalítico e quando comparada a catálise alcalina, temos um tempo de reação maior. Através da catálise homogênea ácida há uma esterificação do AGL (convertido a éster alquílico) e a transesterificação ocorre simultaneamente. As condições ótimas para que as transesterificações ácidas sejam 100% catalisadas são uma proporção 56:1 metanol:óleo e 30°C (BAHADAR; KHAN, 2013). Ainda outra alternativa seria a combinação da catalise ácida e básica onde os lipídios sofrem pré-tratamento com ácido, a fim de reduzir o teor de AGL, após a base realiza a catálise da reação de transesterificação.

#### **4.4.2. Catálise heterogênea química**

A catálise heterogênea básica ou ácida, vem sendo muito estudada para produção de biodiesel. Diferente das catálises homogêneas, nesta reação o catalisador pode ser reciclado



e recuperado para ser reutilizado em outras reações de transesterificação. Neste processo, o catalisador pode ser facilmente separado através de filtração ao final do processo, minimizando a contaminação do produto final e o número de lavagens para purificação do biodiesel.

Dentre os catalisadores heterogêneos podem ser citados CaO combinado com  $Al_2O_3$  foi testado por Uduman, Danquah e Hoadley (2009) para reação de transesterificação dos lipídios obtidos a partir de biomassa de *Nanochloropsis oculata*. O maior rendimento de biocombustível obtido foi de 97,5% a 50°C utilizando metanol a uma proporção de 30:1 e tempo de reação de 4h.

#### 4.4.3 Catálise heterogênea enzimática

Entre os catalisadores utilizados para formação do biodiesel, o enzimático se destaca, pois pode ser utilizado em qualquer fonte de triacilgliceróis, independente da quantidade de AGL, e com sua aplicação não há necessidade de realizar neutralização e lavagem do biodiesel obtido, já que este é fabricado em meio praticamente neutro. Isto faz com que a quantidade de efluentes gerados seja bem menor do que quando se utilizam catalisadores químicos. Além disso esse tipo de catálise facilita a recuperação da glicerina, já que as enzimas são catalisadores mais específicos que os catalisadores químicos promovendo maior facilidade nas etapas de purificação (VISENTAINER; SANTOS, 2013).

Transesterificação utilizando lipase a baixas temperaturas é capaz de produzir maior quantidade de ésteres do que outros métodos de transesterificação. Utilizando 75 % de lipase imobilizada com 10 % de água obtém-se 98,15 % de conversão em 12 h (BAHADAR; KHAN, 2013). O processo de conversão envolve instrumentos complexos e o alto preço da enzima torna o processo limitado (HELWANI et al., 2009).

#### 4.4.4 Transesterificação *in situ*

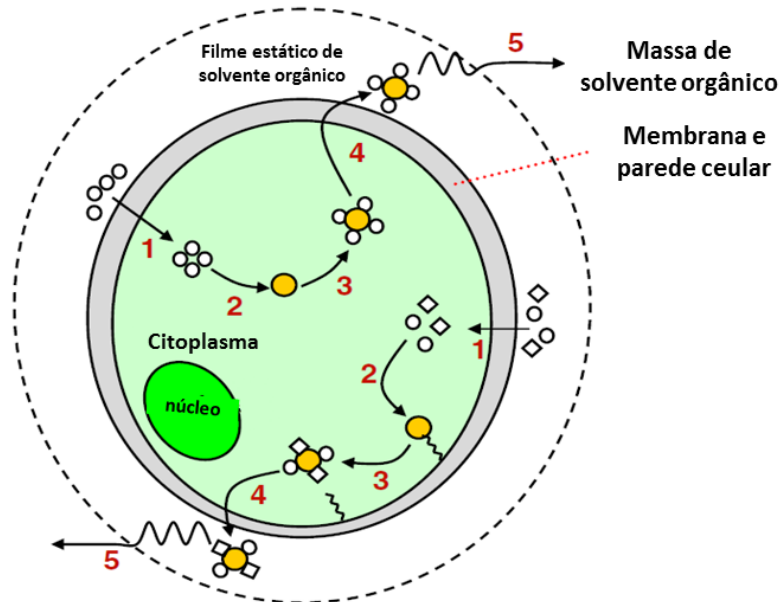
A conversão de um óleo a biodiesel pela transesterificação *in situ* ou transesterificação direta envolve as etapas de extração e esterificação juntas em uma única etapa. O uso deste método na obtenção de biodiesel a partir de biomassa microalgal pode ser uma opção viável pois reduz as despesas de extração além de uma redução do tempo de reação (PANDEY et al., 2014). Johnson e Wen (2009) demonstraram que a aplicação do método direto para obtenção de biodiesel a partir de *Schizochytrium limacinum* produziu maiores quantidades de ésteres metílicos do que os métodos de extração convencionais.

#### 4.5 Extração de lipídios de microalgas por solventes orgânicos

Durante a extração lipídica, a biomassa microalgal é exposta a solventes que extraem os lipídios para fora da matriz celular. Uma vez que os lipídios são separados da célula, o solvente e a água, sua massa pode ser medida gravimetricamente. As tecnologias para extração de lipídios para produção de biodiesel devem possuir alta especificidade a fim de minimizar a extração de material não lipídico como proteínas e carboidratos. Para redução das etapas de down-stream (fracionamento/purificação), a tecnologia de extração deve ser seletiva em relação a acilgliceróis, não extraindo frações lipídicas não conversíveis em biodiesel, como lipídios polares e neutros (ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, esteróis, cetonas, carotenos e clorofilas). Além disso, a técnica selecionada deve ser eficiente em termos energéticos e de tempo, não ser reativa com os lipídios e ser segura (KATES, 1986; MEDINA et al., 1998).

O princípio da extração de lipídios através de solventes orgânicos pode ser resumido através do princípio químico básico de que “semelhante dissolve semelhante”. Devido às interações entre as longas cadeias hidrofóbicas de ácidos graxos, lipídios neutros participam de uma ligação de Van der Waals entre si formando glóbulos no citoplasma (KATES, 1986, MEDINA et al. 1998). O mecanismo para extração com solvente orgânico é mostrado na Figura 4 e pode ser dividida em 5 etapas. Quando a célula microalgal é exposta a solvente orgânico apolar, como hexano ou clorofórmio, o solvente penetra através da membrana celular para o citoplasma (passo 1) e interage com os lipídios neutros através de forças de Van der Waals (passo 2) para formar um complexo de solvente orgânico-lipídios (passo 3). Este complexo de solvente orgânico-lipídios, através de um gradiente de concentração, se difunde pela membrana celular (passo 4) e pelo solvente orgânico que forma uma película ao redor da célula, passo 5 (Figura 5). Como resultado, os lipídios neutros são extraídos das células e permanecem dissolvidos no solvente orgânico apolar. Esta película de solvente orgânico estático é formado devido a interação entre o solvente orgânico e a parede celular. Este filme envolve a célula microalgal e permanece sem ser alterado por qualquer fluxo de solvente ou agitação

**Figura 5** - Diagrama esquemático da extração de lipídios por solvente orgânico apolar e por mistura de solvente polar e apolar onde: (●) lipídios; (○) solvente orgânico apolar; (◇) solvente orgânico polar; (1) solvente orgânico penetra através da membrana celular; (2) interação do solvente orgânico com os lipídios; (3) formação de complexo solvente-lipídios; (4) difusão do complexo solvente-lipídios através da membrana celular; (5) difusão do complexo solvente-lipídios através do filme estático de solvente orgânico formado ao redor da célula



Fonte: Adaptado de HALIN, DANQUAH; WEBLEY (2012)

Alguns lipídios neutros podem ser encontrados no citoplasma como um complexo com lipídios polares. Este complexo é fortemente ligado através de pontes de hidrogênio a proteínas da membrana celular. As interações de Van der Waals que se formam entre solvente apolar e lipídios neutros no complexo lipídio-solvente não são suficientes para quebrar essas associações entre lipídios-proteínas. Por outro lado, solventes polares (como metanol ou isopropanol) são capazes de romper essa associação formando pontes de hidrogênio com os lipídios polares (KATES, 1986, MEDINA et al. 1998). O mecanismo onde solventes orgânicos polares e apolares em mistura extraem os lipídios associados a membrana também está representado pela Figura 4 e pode ser dividido nos mesmos 5 passos descritos anteriormente.

O solvente polar e apolar penetram a membrana através da célula até o citoplasma (passo 1) e interagem com o complexo lipídico (passo 2). Durante esta interação, o solvente apolar orgânico envolve o complexo lipídico e forma associações de Van der Waals com os lipídios neutros do complexo, enquanto o solvente orgânico polar também envolve o complexo lipídico e forma pontes de hidrogênio com os lipídios polares do complexo. As pontes de hidrogênio são fortes o suficiente para deslocar as associações lipídio-proteína ligando o complexo a membrana celular e ocorre difusão do complexo solvente orgânico-lipídio pela

membrana celular (passo 4) e através do filme de solvente orgânico (passo 5). Diversos autores descrevem diferentes métodos de extração de lipídios utilizando solventes orgânicos com pequenas diferenças entre si, os mais aplicados são os de Bligh e Dyer (1959) e Folch, Less e Stanley (1957).

#### **4.6 Considerações finais**

A produção de energia de maneira sustentável através de microalgas ainda é um desafio a ser enfrentado pela pesquisa na área da biotecnologia microalgal. Estudos a respeito do tema são realizados por grupos de pesquisa ao redor do mundo em busca da forma de produzir biocombustíveis de qualidade, com alto rendimento e economicamente acessíveis através desta fonte. Para produção de biodiesel, além do alto teor de lipídios com composição de ácidos graxos semelhante a oleaginosas normalmente utilizadas para esta finalidade, ainda existem diversas outras vantagens do cultivo microalgal comparado ao de vegetais superiores. A capacidade de se desenvolver utilizando como fonte nutricional efluentes industriais deve ser cada vez mais explorada, afim não só da redução dos custos de processo, bem como para aproveitamento destes materiais de forma sustentável sem necessidade de processos de purificação e tratamento. A utilização dos efluentes produzidos pela própria indústria bioenergética, gera uma vantagem adicional aos biocombustíveis de microalgas, fechando um ciclo dentro da produção de biocombustíveis.



## 5. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Este trabalho foi dividido em 2 artigos:

Artigo 1: **“Cultivo microalgal para geração de energia utilizando efluente da produção de biodiesel”**

Artigo 2: **“Avaliação da capacidade de biofixação CO<sub>2</sub> e produção de biodiesel por *Spirulina* sp LEB 18 ”**

Na primeira etapa (Artigo 1) foi realizado o cultivo mixotrófico das microalgas *Spirulina* sp LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus actus* LEB 116 em fotobiorreatores tubulares utilizando como complemento do meio de cultivo de cada microalga 0,01 mol.L<sup>-1</sup> de glicerina. O substrato glicerina foi adicionado ao meio em diferentes formas de cultivo: batelada (adição em t=0 d) e batelada alimentada (adição no tempo 10 d e tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d) em experimentos de 20 dias. Foram avaliados o desenvolvimento da microalga sob as condições as quais foi submetida, teor de lipídios e capacidade de produção de biodiesel. Também foi determinado o perfil de metil ésteres de ácidos graxos (FAMES) a fim de obter características sobre o biodiesel a ser produzido pela microalga. Na segunda etapa (Artigo 2), a microalga *Spirulina* sp LEB 18 foi cultivada em escala piloto em fotobiorreator tubular horizontal equipado com *air lift* utilizando 10% (v/v) CO<sub>2</sub> como fonte de carbono e com redução da fonte de nitrogênio. Foi avaliada a capacidade de biofixação de CO<sub>2</sub> pela microalga, além do desenvolvimento celular nas condições estudadas. Neste estudo foram quantificados os macronutrientes carboidratos, lipídios e proteínas. A partir dos lipídios, foi realizada a transesterificação *in situ* da biomassa microalgal produzida e o resultado obtido foi comparado com resultados teóricos *in situ* e convencional. Os cultivos microalgais foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG/ Brasil) e as análises para determinação da qualidade e rendimento de biodiesel no Laboratório de Grasas y Aceites da Universidad de la República (UDELAR/Uruguai), durante período mestrado sanduíche, convênio FURG-CNPq-CAPES-UDELAR.



## 5.1. Artigo 1 - CULTIVO MICROALGAL PARA GERAÇÃO DE ENERGIA UTILIZANDO EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

### Resumo

A biotecnologia microalgal possui potencial para mudar o cenário energético mundial através da produção de biocombustíveis. O biodiesel de microalgas é um combustível alternativo ao diesel de origem fóssil capaz de aliar sustentabilidade a alta produtividade. As microalgas são micro-organismos capazes de produzir biomassa com alto teor de lipídios de composição semelhante a de vegetais superiores através do cultivo utilizando fontes nutricionais de baixo custo. O objetivo do trabalho foi cultivar diferentes espécies de microalgas utilizando glicerol como substrato do meio de cultura para produção de biodiesel. As microalgas *Spirulina* sp LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus actus* LEB 116, ainda que submetidas a diferentes modos de cultivo, mantiveram suas produtividades próximas. Dentre as cepas estudadas, *Spirulina* sp LEB 18 obteve máximo rendimento em biodiesel (51,5%) no experimento em batelada, com teor lipídico na biomassa de 24,1%. A utilização do efluente (glicerol) para produção de biomassa rica em lipídios, aliada a potencialidade de geração de outros biocompostos de alto valor agregado em paralelo ao do biodiesel, reduzem os custos do processo em geral, aumentando a viabilidade econômica de obtenção do biocombustível.

Palavras-chave: batelada alimentada, batelada, biocombustíveis, glicerol

### MICROALGAL CULTIVATION TO ENERGY GENERATION USING EFFLUENT FROM BIODIESEL PRODUCTION

#### Abstract

Microalgal biotechnology has the potential to change the world energy scene by producing biofuels. The microalgal biodiesel is an alternative fuel to fossil diesel able to combine sustainability with a high productivity. Microalgae are microorganisms capable of producing biomass with a high fat content composition similar to higher plants by cultivation using alternative nutrition sources. The objective was to cultivate different species of microalgae mixotrophically using glycerol as substrate of the culture medium for biodiesel production. Microalgae *Spirulina* sp LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 and *Scenedesmus actus* 116 LEB did not have their productivity affected by cultivation modes. Among the strains studied, *Spirulina* sp LEB -18 obtained the highest biodiesel yield (51.5%) in the batch experimental, with lipid percentage of 24.1%. The use of waste to produce biomass rich in lipids, combined with the capacity of generate other high value-added biocompounds parallel to biodiesel, reduce the costs of the proceedings in general, increasing the economic feasibility of biofuel obtaining.

Keywords: batch, biofuels, fed-batch, glycerol



### 5.1.1 Introdução

O estudo a cerca de fontes eficientes para produção de combustíveis alternativos em substituição ou para redução dos combustíveis fósseis é um tópico mundial. A preocupação está não somente no fato do esgotamento das fontes fósseis, bem como relacionada a fatores ambientais envolvidos na exploração e aplicação destes hidrocarbonetos. O biodiesel é um biocombustível renovável e biodegradável, não-tóxico e livre de enxofre, geralmente produzido utilizando fontes alimentícias como soja e palma (TRAN, CHEN; CHANG, 2013). As microalgas vem sendo investigadas para obtenção de lipídios por possuir composição em ácidos graxos semelhante aos da soja e outras oleaginosas, sendo uma promissora fonte de biodiesel (CHEIRSILP et al., 2011, SURENDRHIRAN, VIJAY; SIRAJUNNISA, 2014). Estes microorganismos são capazes de produzir grandes quantidades do composto, se desenvolvem rapidamente, biofixam CO<sub>2</sub> com eficiência e podem ser cultivadas utilizando resíduos industriais, como o glicerol e melão, agregando valor a esses materiais (EUGENIA, 2012).

A produção de biodiesel através da transesterificação convencional é um método que produz cerca de 10% de glicerol que raramente é reciclado (ABAD, TURON, 2012). O glicerol gerado a partir da produção de biodiesel pode ser aplicado na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. No entanto, sua aplicação nessas áreas requerem métodos de purificação do material que tornam seus custos de utilização muito altos (JOHNSON; TACONI, 2007). Desta forma, o estudo do tratamento e aplicação do glicerol passou a receber atenção por interesses econômicos e ambientais. Bioprodutos podem ser obtidos através de bioprocessos com base a aplicação do glicerol como os pigmentos e ácidos graxos. A maioria dos estudos nesta área é baseada no cultivo de microalgas utilizando o glicerol como fonte de carbono (ABAD; TURON, 2012).

O glicerol não purificado, com presença de etanol, utilizado para o cultivo de microalgas demonstrou ser capaz de aumentar a densidade celular (SWAAF et al., 2003). Estudos acerca do cultivo de microalgas com a fonte de carbono junto a outros compostos presentes no efluente gerado na produção do biodiesel, como sabões e metanol, também foram realizados (PYLE, 2008). Para produção de biodiesel de qualidade a composição em ácidos graxos é fator importante. O conteúdo e a produtividade de lipídios por microalgas podem ser alterados através da modificação de condições ambientais bem como nutricionais. A aplicação do glicerol no cultivo microalgal, bem como a forma de condução da fermentação, podem influenciar positiva ou negativamente a composição de ácidos graxos para obtenção de combustível em termos de qualidade e quantidade. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi

cultivar diferentes espécies de microalgas utilizando glicerol como substrato do meio de cultura para produção de biodiesel.

## 5.1.2 Materiais e Métodos

### 5.1.2.1 Micro-organismos e preparação de inóculos

Foram cultivadas as microalgas *Spirulina* sp LEB 18 (MORAIS et al., 2008), *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus actus* LEB 116 da coleção de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande. Os inóculos das chlorophytas *Chlorella* e *Scenedesmus* foram mantidas em meio BG-11 modificado (meio com fonte de carbono adicional bicarbonato de sódio) e o inóculo de *Spirulina* em meio Zarrouk (Tabela 1). O cultivo foi realizado em estufa termostaticada a 30°C, iluminância de 40,5  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo 12h claro/escuro. A microalgas foram mantidas nestas condições até atingir a fase log de crescimento celular para início do experimento (Apêndice A – Figura A1).

**Tabela 1** - Composição meio Zarrouk e BG-11 modificado

Componente	Zarrouk <sup>1</sup>	BG-11 modificado <sup>2</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	16,80 g.L <sup>-1</sup>	0,40 g.L <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub>	2,50 g.L <sup>-1</sup>	1,50 g.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	0,02 g.L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00 g.L <sup>-1</sup>	0,04 g.L <sup>-1</sup>
NaCl	1,00 g.L <sup>-1</sup>	-
Mg.SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20 g.L <sup>-1</sup>	0,07 g.L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,04 g.L <sup>-1</sup>	0,04 g.L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g.L <sup>-1</sup>	-
EDTA	0,08 g.L <sup>-1</sup>	0,001 g.L <sup>-1</sup>
Citrato férrico	-	0,01 g.L <sup>-1</sup>
Ácido Cítrico	-	0,01 g.L <sup>-1</sup>
Solução de Micronutrientes	2 ml	1 mL

Fonte:<sup>1</sup> ZARROUK (1986); <sup>2</sup> RIPPKA et al. (1979)

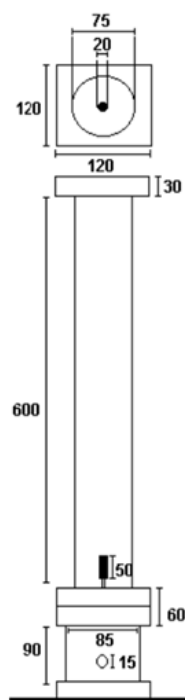
### 5.1.2.2 Condições de cultivo

As microalgas foram cultivadas nos mesmos meios em que os inóculos foram mantidos, nos quais foram adicionados glicerina P.A. 0,01 mol.L<sup>-1</sup> em diferentes modos de condução de cultivo. Foi realizado cultivo em batelada, onde glicerina foi adicionada apenas no

tempo inicial do experiment (0d) e batelada alimentada de duas formas: adição de glicerina apenas no tempo 10 d e ao longo do experimento nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d.

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRT verticais, Figura 1), com volume útil de 1,8 L. O experimento transcorreu em estufa termostatzada a 30°C, fotoperíodo de 12 h claro/escuro e 40,5  $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$  de iluminância fornecidos por lâmpadas fluorescentes de 40 W. A concentração inicial do cultivo foi 0,3  $\text{g.L}^{-1}$ . Os experimentos tiveram duração de 20 d. Ao final dos experimentos, a biomassa obtida foi centrifugada a 9000 rpm por 15 min e liofilizada (Apêndice A – Figura A2)..

**Figura 1** Fotobiorreator tubular vertical



### 5.1.2.3 Crescimento celular e parâmetros cinéticos

Diariamente foi realizado o monitoramento do crescimento da microalga, através da medida da concentração celular, determinada pela densidade ótica da cultura em espectrofotômetro a 670 nm (QUIMIS Q798DRM, Brasil). A concentração celular máxima foi obtida através de curva padrão, relacionando massa seca e densidade ótica ( $X_{\text{máx}}$ ) (COSTA et al., 2002). A cada 24 h o pH dos cultivos foi medido em pHmetro digital (QUIMIS Q.400H, Brasil). A partir destes dados de crescimento determinou-se a produtividade máxima ( $P_{\text{máx}}$ ), segundo a Equação 1, sendo  $X$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) a concentração celular final,  $X_0$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) a concentração de biomassa inicial do cultivo,  $t$  (d) o tempo final e  $t_0$  o tempo inicial do cultivo (BAILEY, 1986).

$$P_{\max} = \frac{(X - X_0)}{(t - t_0)} \quad (1)$$

#### 5.1.2.4 Quantificação de lipídios

Os lipídios foram quantificados a partir da biomassa liofilizada utilizando método de Folch; Less; Stanley (1957).

#### 5.1.2.5 Lipídios conversíveis a ésteres metílicos e perfil de ácidos graxos

A determinação de ésteres metílicos foi realizada através da esterificação direta dos lipídios da biomassa microalgal. Aproximadamente 30 mg da amostra foi tratada com metóxido de sódio (MeONa) 0,05M em metanol (MeOH) durante 10 min a 100°C e, logo, com cloreto de metila (MeCl) em MeOH durante 10 min a mesma temperatura (NORMA FRANCESA, 1977). Em seguida os ácidos graxos esterificados passaram por purificação em coluna de sílica de 100 mg (Supelco, EUA) para retirada de impurezas que podem prejudicar a análise cromatográfica. Para acompanhamento da reação foi utilizada cromatografia em camada delgada (CCD).

Após a purificação, 1µL de amostra foi analisada por cromatógrafo gasoso GC-2014 (Shimadzu, Japão) em presença de padrão interno, heptadecanoato de metilo, para quantificação dos ésteres metílicos. As condições para análise em GC foram: detector de chama ionizante (FID) 340°C; coluna Supelco SP 2330 (Supelco, USA), 30m x 0,25mm x 0,2µm e gás carreador N<sub>2</sub>. Os picos de ácidos graxos foram identificados através de cromatograma de mistura de ácidos graxos metilados padrão (FAME Mix RMS; Supelco, EUA).

#### Rendimento de biodiesel

O rendimento de biodiesel foi determinado em relação a quantidade de lipídios totais da biomassa de acordo com o teor de ésteres metílicos obtidos a partir da esterificação direta através da Equação 2, onde  $R_{\text{Tbiodiesel}}$  é o rendimento teórico do biodiesel e os lipídios totais foram aqueles quantificados através de Folch;Less; Stanley (1957):

$$R_{\text{biodiesel}} = \frac{\text{ésteres metílicos (g)/g biomassa seca}}{\text{lipídios totais (g)/g biomassa seca}} \cdot 100 \quad (2)$$

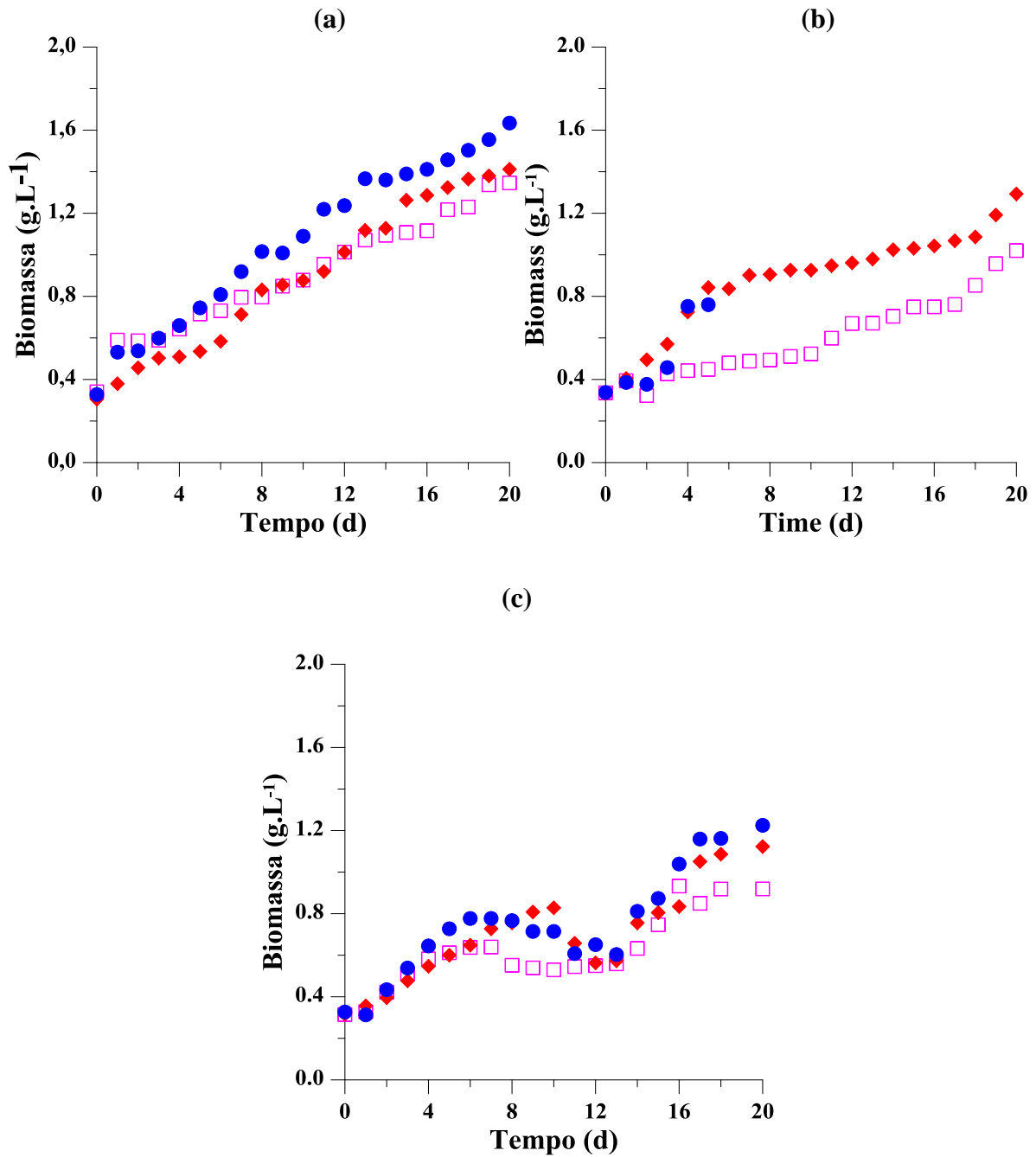
### 5.1.3 Resultados e Discussão

Dentre as microalgas cultivadas em meio complementado com glicerina, apenas *Spirulina* sp LEB 18 não apresentou etapa de adaptação a fonte de carbono empregada em nenhuma das condições as quais foi submetida. As cepas *Scenedesmus actus* LEB 116 e *Chlorella fusca* LEB 111 apresentaram fase lag de curta duração (de 2 a 3 d), exceto nos cultivos onde a fonte de carbono foi adicionada apenas no 10º dia (Figura 2). Em geral, a fase lag ocorre quando o micro-organismo não é cultivado sob as condições que o cultivo foi mantido, não se adaptando as fontes nutricionais. Para que esta etapa não ocorra ou seja mais curta, é necessário que haja uma produção ou ativação de enzimas capazes de metabolizar as fontes nutricionais aplicadas (SCHIMIDELL et al, 2001). As microalgas estudadas não foram adaptadas a fonte de carbono glicerina no meio de cultivo e, ainda assim, tiveram comportamento semelhante a um micro-organismo que tenha sido adaptado. Desta forma, os cultivos podem alcançar maiores concentrações celulares já que a multiplicação celular vai ocorrer desde o princípio.

Nos cultivos onde a adição de glicerina foi realizada a partir do tempo 0 d, observa-se para *Spirulina* sp LEB 18 que a curva apresentou fase de crescimento exponencial entre os tempos 6 a 13 d onde iniciou uma etapa de desaceração do crescimento. Já os cultivos onde a fonte foi adicionada no 0 d com as espécies *Scenedesmus* e *Chlorella* as microalgas tiveram fase de aceleração do crescimento mais longa (4 a 16 d e 3 a 20 d, respectivamente). Para *Scenedesmus actus* LEB 116, observou-se um início de fase de crescimento exponencial após o 16º até o 20º dia. Na etapa de crescimento exponencial a velocidade de crescimento celular é constante e a velocidade máxima é atingida ao final da desaceleração. A desaceleração ocorre devido a redução de nutrientes que foram consumidos ao longo do experimento, até que se esgotam totalmente entrando na fase estacionária (SCHIMIDELL et al., 2001).

Para as demais condições de cultivo, *Spirulina* sp LEB 18 apresentou comportamento semelhante a adição no tempo 0 d, indicando que as diferentes formas de condução do experimento (batelada e batelada alimentada), não alteraram as etapas de crescimento observadas até o 20 d no cultivo da microalga. Para os experimentos com adição da glicerina 0,01 mol.L<sup>-1</sup> no tempo de 10 d para as microalgas *Scenedesmus* e *Chlorella* observa-se desaceleração do crescimento a partir da adição deste substrato. *Scenedesmus actus* LEB 118 apresentou crescimento celular e etapa exponencial de crescimento, após adição da fonte de carbono, entre 10 e 20 dias. A microalga *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou decréscimo na concentração celular, representando uma etapa de adaptação a fonte de carbono adicionada, recuperando a concentração celular a partir do 16º dia de cultivo.

**Figura 2** – Curvas de crescimento (a) *Spirulina* sp LEB 18, (b) *Scenedesmus actus* LEB 116 e (c) *Chlorella fusca* LEB 111 onde: adição de glicerol  $0,01\text{mol.L}^{-1}$  nos tempos (●) 0 d, 5 d, 10 d e 15 d, (◆) 10 d e (□) 0 d.



O estudo das etapas de crescimento celular é importante principalmente quando se tem em vista a produção de um composto específico através do cultivo microalgal. Cada etapa do crescimento tem ligação a produção em maior ou menor concentração de um macronutriente específico. Na fase de crescimento exponencial as culturas algais produzem mais proteínas, isso devido a multiplicação celular, replicação do DNA e desenvolvimento. Ao longo da fase de

desaceleração do crescimento, o micro-organismo começa a produzir lipídios e carboidratos como forma de reserva de energia atingindo a maior quantidade destes nutrientes no início da fase estacionária onde passa a consumir estes macronutrientes para produção do ATP. A biomassa microalgal é rica em lipídios polares na fase exponencial e acumula triacilgliceróis (reserva) na fase estacionária (DUNSTAN et al., 1993). Desta forma, é provável que as microalgas que atingiram a fase de desaceleração do crescimento e principalmente fase estacionária podem ter vindo a produzir maior quantidade de lipídios. A maneira como o micro-organismo vai metabolizar o glicerol e as demais fontes nutricionais do meio de cultura vão direcionar o metabolismo celular para lipídios ou carboidratos.

Para as *Chlorophytas* estudadas, os cultivos com adição de glicerina apresentaram decantação celular em todas as condições estudadas (Apêndice A – Figuras A3 e A4). No cultivo de *Scenedesmus actus* LEB 116 onde a adição de glicerina foi realizada nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d o cultivo apresentou decantação celular com formação de aglomerados que impediram a leitura da concentração celular a partir do 5º dia de experimento. No ensaios com *Chlorella fusca* LEB 111 não houve formação de aglomerados que impedissem a leitura da concentração celular. A decantação celular gerada pela adição do substrato glicerol sem influência sobre o desenvolvimento celular pode ser ponto positivo para cultivos microalgais em escala industrial, já que a separação do meio de cultura das células é uma das etapas de alto custo e tempo no processo.

As formas de condução do experimento influenciaram as concentrações celulares máximas das microalgas estudadas sendo possível determinar qual foi a melhor condição de cultivo utilizando como fonte de carbono a glicerina para obtenção de biomassa e lipídios conversíveis a biodiesel. *Spirulina* sp LEB 18, apresentou máximo crescimento celular nos cultivos em batelada alimentada (SP2 e SP3), sendo que a condição SP3 (adição do glicerol nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d) foi a de maior densidade celular ( $1,66 \text{ g.L}^{-1}$ ) (Tabela 2).

Para a cianofícea, a adição do substrato glicerina ao longo de todo o experimento em intervalos de 5 dias, foi favorável ao desenvolvimento celular. A forma de condução do processo em batelada alimentada em SP3 gerou o desenvolvimento gradual de compostos e enzimas que garantiram que os metabólitos fossem produzidos intermitentemente pela microalga *Spirulina* sp LEB 18. Para as microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus actus* LEB 116, os cultivos com adição da fonte de carbono em 10 d apresentaram as máximas concentrações celulares ( $1,23 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,30 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente). O desenvolvimento celular leva a geração de uma série de enzimas e compostos que podem proteger as células, evitando ou reduzindo a inibição e estresse celular pela adição de um substrato. A adição após

determinado tempo de cultivo pode gerar melhores resultados que em um tempo inicial pois as células passam a assimilar melhor o composto adicionado (SCHIMIDELL et al., 2001).

**Tabela 2** – Concentração celular ( $X_{\max}$ , g.L<sup>-1</sup>), produtividade máxima ( $P_{\max}$ , g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), teor de lipídios na biomassa ( $t_{\text{lipídios}}$ , %, p/p), rendimento de biodiesel teórico ( $R_{\text{Tbiodiesel}}$ , % p/p) para, concentração de lipídios ( $C_{\text{lipídios}}$ , g/L) e de biodiesel ( $C_{\text{biodiesel}}$ , g/L) para as microalgas *Spirulina* sp LEB 18 (SP), *Chlorella fusca* LEB 111 (CF) e *Scenedesmus actus* LEB 116 (SA) nas condições: adição de glicerina 0,01 M (1) no tempo 0 d, (2) no tempo 10 d e (3) nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d.

Condição de cultivo	$X_{\max}$	$P_{\max}$	$t_{\text{lipídios}}$	$R_{\text{Tbiodiesel}}$	$C_{\text{lipídios}}$	$C_{\text{biodiesel}}$
<i>Spirulina</i> sp LEB 18						
SP1	1,35±0,02	0,08±<0,01	24,15±1,34	51,50±1,28	0,33±0,01	0,17±<0,01
SP2	1,41±0,28	0,08±0,01	19,62±1,12	42,63±0,27	0,28±0,01	0,12±<0,01
SP3	1,66±0,10	0,09±0,01	23,06±1,33	41,64±2,28	0,38±0,02	0,16±0,01
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111						
CF1	0,93±0,12	0,17±0,02	37,91±1,20	21,65±3,04	0,35±0,01	0,08±0,01
CF2	1,23±0,11	0,15±0,01	39,36±0,90	31,74±0,82	0,48±0,01	0,16±<0,01
CF3	1,22±0,10	0,16±0,01	31,42±0,67	25,16±3,23	0,38±0,01	0,06±0,01
<i>Scenedesmus actus</i> LEB 116						
SA1	1,02±0,26	0,06±0,01	20,34±1,28	37,74±2,92	0,20±0,01	0,07±0,01
SA2	1,30±0,07	0,10±0,01	17,06±1,66	29,48±2,63	0,22±0,02	0,06±0,01
SA3	0,76±0,01	0,10±0,01	18,42±1,65	25,70±0,36	0,14±0,01	0,06±<0,01

Os cultivos utilizando glicerol podem apresentar baixas produtividades comparado a experimentos com base em fontes de carbono mais usuais, como glicose e bicarbonato de sódio. No entanto, a produção de metabólitos de interesse para produção de biodiesel pode se intensificar e a produtividade ainda será maior do que as fontes alimentícias tradicionalmente utilizadas para essa finalidade (ABAD TURON, 2012). As produtividades celulares foram próximas entre os cultivos de todas as microalgas estudadas, indicando que o modo de adição do substrato glicerina no meio de cultivo não alterou a produtividade das culturas. *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou produtividades celulares superiores, com valores entre 0,17 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e 0,15 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (CF 1 e CF 2, respectivamente). Esta clorofícea também apresentou teores de lipídios mais elevados que as demais microalgas cultivadas (entre 31,42% e 39,42%, SA 2 e SA 3, respectivamente), no entanto, não foi a espécie com maior rendimento em biodiesel.



Através dos resultados observa-se que as formas de condução do cultivo influenciaram de maneiras diferentes os cultivos microalgais. O acompanhamento do crescimento celular, desenvolvimento e formação de metabólitos de interesse são fatores que necessitam ser acompanhados antes da implantação de qualquer processo a partir de microalgas. Cada espécie microalgal possui características genéticas distintas que ainda podem variar dentro da própria espécie de acordo com a origem e idade da cepa. Assim, não é possível esperar que as microalgas estudadas apresentassem um comportamento padrão frente a um determinado substrato e forma de condução do experimento, principalmente por serem de diferentes espécies, ainda que tenham estruturas celulares semelhantes como no caso das chlorophytas.

O rendimento de biodiesel está relacionado com a capacidade de conversão dos lipídios a ésteres metílicos e a qualidade depende da composição dos metil ésteres de ácidos graxos (FAMES) formados a partir da transesterificação (RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLO-JACOB, 2012). A microalga *Spirulina* sp LEB 18 apresentou rendimento em biodiesel mais elevado (51,50%) na condição SP1, apesar do menor teor de lipídios comparado com o máximo obtido por *Chlorella fusca* LEB 111, o que geraria para essa microalga massa de 0,17 g.L<sup>-1</sup> de biodiesel. Para *Chlorella fusca* LEB 111 a condição CF2 obteve máximo rendimento em biodiesel (39,36%) e *Scenedesmus actus* LEB 116 a condição SA1 (37,74%).

Com exceção da microalga *Chlorella* (1,23 g.L<sup>-1</sup>), as condições onde foram atingidas os máximos rendimentos em biodiesel e lipídios para as demais cepas estudadas não foram necessariamente os de concentração celular máxima. *Spirulina* sp LEB 18 e *Scenedesmus actus* LEB 116 atingiram as máximas concentrações celulares nos experimentos SP3 (1,66 g.L<sup>-1</sup>) e SA2 (1,30 g.L<sup>-1</sup>), respectivamente. O estresse celular provocado que gerou o desenvolvimento de maior quantidade de metabólitos de interesse pode ter reduzido o crescimento celular. Este comportamento é comum em cultivos com redução da fonte nitrogenada, nestes casos, observa-se ainda que além do maior acúmulo de lipídios há alteração gradual da composição lipídica, ácidos graxos livres e triacilgliceróis (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Através da composição do óleo obtido pelas microalgas pode-se obter informações a cerca da qualidade do biodiesel a ser produzido por transesterificação, como grau de instauração e tamanho das cadeias dos metil ésteres de ácidos graxos (RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLO-JACOB, 2012). Para as microalgas estudadas foram identificados 88,1% (SP1) a 80,0% (SA2) (Tabela 3) dos FAMES convertidos através de esterificação direta. O FAME encontrado em concentração mais elevada

em todas as condições de cultivo para as espécies estudadas foi o ácido palmítico (16:0), com teor máximo em SP1 (55,6%) e foi também o principal ácido graxo saturado detectado. O alto teor de saturação é ponto positivo para produção de biodiesel já que estes compostos apresentam menor índice de oxidação, gerando maior estabilidade ao biodiesel formado e o número de cetano é mais elevado. Os óleos obtidos através do cultivo de *Spirulina* sp LEB 18 em todas as condições estudadas (SP1 (58,4%), SP2 (52,7%) e SP3 (54,2%)) e *Scenedesmus actus* LEB 116 na condição SA2 (46,3%) apresentaram percentual de saturados superior ao de insaturados, podendo ser considerados mais estáveis que as demais (KONDAMUDI et al., 2009).

A oxidação do biocombustível ocorre um aumento da viscosidade através de uma reação de polimerização envolvendo as duplas ligações. Esta reação gera a formação de materiais insolúveis capazes de obstruir filtros de combustível, além de elevação da acidez e presença de hidroperóxido que pode ocasionar corrosão de componentes do sistema de injeção (MONEYEM, CANAKCI; VAN GERPEN, 2001). Dentre os ensaios realizados o óleo mais instável seria o produzido através de *Chlorella fusca* LEB 111 onde a fonte de carbono foi adicionada nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d (57,1% de FAMES insaturados).

O tamanho da cadeia hidrocarbonada é diretamente proporcional ao número de cetano, ponto de névoa e de entupimento do biocombustível produzido, quanto mais elevados estes parâmetros maior será a temperatura e o tempo necessário para a combustão. Desta forma, moléculas muito grandes podem dificultar a utilização do combustível a baixas temperaturas. Moléculas mais curtas com números cetano baixos, produziriam um biodiesel que queimaria muito rapidamente, gerando uma combustão inadequada, causando ruídos no motor e aumento da pressão (POLEDNA, 2005). Os principais ácidos graxos identificados em todos os óleos microalgais obtidos foram os que continham 16 e 18 carbonos. Segundo HO (2010), o biodiesel ideal deve conter principalmente FAMES C16 e C18. Essa composição é semelhante a de óleos de origem vegetal que são usualmente aplicados para produção de biodiesel (MIAO; WU, 2006; KHNODE, 2009).

**Tabela 3** - Composição de ácidos graxos (% p/p) para os cultivos das microalgas *Spirulina* sp LEB 18.(SP), *Chlorella fusca* LEB 111 (CF) e *Scenedesmus actus* LEB 111 cultivadas nas condições: adição de glicerina 0,01 M (1) no tempo 0 d, (2) no tempo 10 d e (3) nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d.

Nome	Ácido graxo	<i>Spirulina</i> sp LEB 18			<i>Chlorella fusca</i> LEB 111			<i>Scenedesmus actus</i> LEB 116		
		SP1	SP2	SP3	CF1	CF2	CF3	SA1	SA2	SA3
<b>Palmítico</b>	<b>16:0</b>	55,6±4,36	49,8±0,44	51,7±0,32	31,0±7,07	27,3±4,33	23,4±0,79	29,1±3,19	41,1±6,76	36,0±1,83
<b>Palmitoleico</b>	<b>16:1 cis n-7</b>	1,7±0,11	1,8±0,01	1,7±0,08	1,5±0,02	1,4±0,17	0,9±0,06	1,6±0,54	3,2±1,24	2,3±0,08
	<b>16:3 n-4</b>	0,1±0,05	0,1±0,05	-	3,37±1,01	3,4±0,06	3,10±0,05	2,1±0,37	0,8±0,47	1,3±0,07
<b>Oleico</b>	<b>18:1 cis n-9</b>	5,5±0,06	6,1±0,10	4,7±0,14	12,7±1,93	9,2±1,43	16,1±0,97	17,5±0,32	11,6±3,54	15,6±0,59
<b>Vacênico</b>	<b>18:1 cis n-7</b>	0,9±0,46	1,3±0,02	1,4±0,65	4,3±1,20	4,9±0,29	4,4±0,25	1,5±1,37	3,0±0,15	3,0±0,13
<b>γ-Linolênico</b>	<b>18:2 cis n-6</b>	7,4±1,07	8,6±0,11	7,9±0,23	11,8±1,63	14,0±1,01	14,5±0,32	11,2±4,64	3,6±1,91	6,0±0,34
<b>Linoleico</b>	<b>18:3 n-6</b>	10,8±2,55	9,2±0,05	12,8±0,63	0,3±0,17	0,9±0,06	0,9±0,05	0,7±0,22	0,5±0,08	0,5±0,08
<b>α-Linolênico</b>	<b>18:3 n-3</b>	-	-	-	10,5±3,09	13,3±0,85	12,6±0,22	8,1±1,15	5,0±1,45	5,8±1,27
<b>Outros*</b>		6,0±0,02	5,6±0,63	6,3±0,75	8,0±0,70	8,8±0,41	7,4±0,33	8,5±0,84	11,1±1,11	11,7±0,43
<b>Saturados</b>		58,4±2,25	52,7±0,47	54,2±0,02	34,2±7,69	30,2±4,26	26,2±0,73	32,8±3,83	46,3±7,32	40,9±2,71
<b>Insaturados</b>		29,6±1,75	29,8±0,33	32,3±1,48	49,2±6,12	53,0±3,05	57,1±0,13	47,4±3,95	33,5±5,66	41,3±2,54
<b>Total identificados</b>		88,1±0,99	82,7±0,81	86,6±1,51	83,4±1,56	83,2±1,21	83,3±0,61	80,2±0,12	80,0±1,66	82,3±0,18

\*12:0/13:0/14:0/14:1/15:0/15:1/16:1 cis n-7/17:0/16:2 n-4/17:1/18:0/18:1 trans/20:0/20:1 n-9/20:2/20:3 n-6/20:3 n-3/22:0.

O ácido oleico (C18:1), é considerado indicador de qualidade do biodiesel e foi detectado em todas as microalgas estudadas. *Scenedesmus actus* LEB 11 apresentou teor mais elevado de ácido oleico, dentre as microalgas cultivadas, no ensaio SA1 onde a adição da glicerina foi realizada no tempo 0 d (17,5%). A adição do oleato de metilo é sugerida para melhorar as propriedades de biodiesel, como estabilidade oxidativa e temperatura de fusão (KHNODE, 2008).

#### 5.1.4 Conclusão

Os resultados indicam que as cepas *Spirulina* sp LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus actus* LEB 116 foram capazes de se desenvolver em meio complementado com efluente da indústria bioenergética (glicerol) produzindo lipídios com potencial aplicação como biodiesel devido suas características quantitativas e qualitativas. As formas de condução dos experimentos, batelada e batelada alimentada, não alteraram a produtividade celular das microalgas. O conteúdo de lipídios das cepas variou de acordo com a condição de estresse as quais foram submetidas. Quanto a produção de biodiesel, a microalga *Spirulina* sp LEB 18 obteve rendimento superior as demais microalgas (51,5%) no experimento em batelada (SP1), que possuía teor lipídico de 24,1%. De acordo com a composição de ácidos graxos, o óleo produzido também nesta condição, seria o mais estável com 58,3% de ésteres saturados e 29,9% insaturados. Os cultivos microalgais são uma das alternativas mais sustentáveis de produção do biodiesel. Ao mesmo tempo que o combustível é produzido pode ser realizado o tratamento dos efluentes gerados pela própria produção. Esta potencialidade aliada a capacidade de obtenção de biocompostos de alto valor agregado em paralelo a produção de triacilgliceróis, reduzem os custos do processo em geral, aumentando a viabilidade de geração deste biocombustível.

#### 5.1.5. Referencias Bibliográficas

ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 733–741, 2012.

BAILEY, J. E. AND OLLIS, D. F., **Biochemical Engineering Fundamentals**. Ed. McGraw-Hill, 2<sup>th</sup> Ed., Singapore, 1986.

BRENNAN, L., OWENDE, P., Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 201

CHEIRSILP, B., KITCHA, S., TORPEE, S. Co-culture of an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and a microalga *Chlorella vulgaris* for biomass and lipid production using pure and crude glycerol as a sole carbon source. *Ann. Microbiol.*, v. 62, n. 3, p. 987–993, 2012.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

EUGENIA, J.O., Dual purpose microalgae-bacterial-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. **Biotechnolgy Advance**, v. 30, p. 1031–1046, 2012.

FOLCH, J., LEES, M.; STANLEY, G. H. S.; A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry.** , v. 226, n.497, 1957.

JOHNSON, D.T.; TACONI, K.A. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress** v. 26, n. 4:, p. 338–48, 2007.

KNOTHE, G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Enviromental Science.*, v. 2, p. 759- 766, 2009.

KONDAMUDI, N.; STRULL, J.; MISRA, M.; MOHAPATRA, S. A green process foe producing biodiesel from feater meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 57, p. 6163–6166, 2009

MIAO, X., WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology.** v. 97, p. 841–846, 2006.

MONYEM, A.; CANAKCI, M.; Van GERPEN, J. H. Investigation of biodiesel thermal stability under simulated in-use conditions. *Appl. Eng. Agriculture.* v. 16; n. 4, p. 373-378, 2000.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por micro-algas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova.** v.31, p.1038-1042, 2008.

NORMA FRANCESA, **Association Française de Normalization**, NF T60-233, 1977

POLEDNA, R. C. R. Como fazer biodiesel de óleo de girassol e de sebo de animal. 5 p. 2005. Disponível em: <http://sbtrv1.ibict.br/upload/sbtr1257.pdf?>. Acesso em: dez. 2014.

PYLE, D.J. **Use of biodiesel-derived crude glycerol for the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids by the microalga *Schizochytrium limacinum***, PhD Thesis, 2008.

RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.; JARAMILLO-JACOB, A. R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel.** v. 91, p. 102–111, 2012.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, v. 111, p.1-61, 1979.

SURENDHIRAN, D.; VIJAY, M.; SIRAJUNNISA, A. R. Biodiesel production from marine microalga *Chlorella salina* using whole cell yeast immobilized on sugarcane bagasse. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 1294–1300, 2014.

SWAAF, M.E.; SIJTSMA, L., PRONK, J.T. High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptothecodinium cohnii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 666–72, 2003.

TRAN, D.T.; CHEN, C.L.; CHANG, J.S. Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst, **Bioresource Technology**, v. 135, p. 213–21, 2013.

ZARROUK, C.; **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima***, Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

## **5.2 Artigo 2 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOFIXAÇÃO CO<sub>2</sub> E PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR *Spirulina* sp LEB 18**

### **Resumo**

A *Spirulina* é um gênero microalgal que possui capacidade de produção de diversos bioprodutos, com aplicação em várias áreas do conhecimento, incluindo a área energética. O estudo da obtenção de energia associado a produção de outros biocompostos de alto valor agregado a partir da biomassa microalgal é de relevada importância, já que desta forma é possível aumentar a viabilidade da produção de biocombustíveis por esse micro-organismo. O trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de biofixação de CO<sub>2</sub>, produção de biodiesel e de outros biocompostos pela microalga *Spirulina* sp LEB 18. A microalga apresentou composição rica em macronutrientes, proteínas (47,3%), carboidratos (13,4%) e lipídios (32,7%). Além disso, biofixou 160 mg.L.d<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> gerando biomassa com produtividade máxima de 0,02 g.L.d<sup>-1</sup>. Os lipídios avaliados quanto à produção de biodiesel apresentaram rendimento teórico de 19,8% para transesterificação *in situ* e 47,9% para transesterificação convencional. A biomassa microalgal possui potencial para produção de biodiesel que pode ser aplicado em substituição ou em mistura com diesel tradicional.

Palavras-chave: biocombustíveis, dióxido de carbono, microalga.

## **EVALUATION OF CO<sub>2</sub> BIOFIXATION AND BIODIESEL PRODUCTION BY *Spirulina* sp LEB 18**

### **Abstract**

*Spirulina* is a microalgal specie that has capacity to produce bioproducts, with application in several knowledge areas, including energy area. The study of energy associated with the production of other high value-added biocompounds from microalgal biomass is na importante topic, thus is possible to increase the viability of biofuel production by this microorganism. The study aimed to evaluate the ability of CO<sub>2</sub> biofixation, biodiesel production and other biocompounds by *Spirulina* sp LEB 18. The microalgae showed composition rich in macronutrients, proteins (47.3%), carbohydrates (13.4%) and lipids (32.7%). Furthermore, 160 mg.L.d<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> was biofixed, generating a maximum biomass yield 0.02 g.L.d<sup>-1</sup>. Lipids evaluated for biodiesel production presented theoretical yield of 19.8% for transesterification *in situ* and 47.9% for conventional transesterification. The microalgal biomass has potential for biodiesel production that can be applied in place of or in combination with traditional diesel fuel.

Keywords: biofuels, carbon dioxide, microalgae

### 5.2.1.Introdução

As necessidades energéticas do planeta são supridas principalmente pelo uso de combustíveis fósseis como carvão mineral, petróleo e gás natural. As reservas destas fontes são finitas e a aplicação, bem como exploração causam problemas ambientais, como aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico gerado a partir da queima destes materiais. A procura por fontes alternativas renováveis tem se intensificado para satisfazer o constante aumento da demanda energética e de matéria-prima global (YEN et al., 2013). Uma das fontes em potencial para atender a este desafio é a biomassa microalgal que alia a produção de energia sustentável a biofixação de CO<sub>2</sub>, principal gás do efeito estufa.

Dentre as vantagens da aplicação das microalgas para produção de biocombustíveis, como o biodiesel, estão o fato de não competirem com as culturas alimentícias e não necessitarem de terras agriculturáveis (DAMIANI et al., 2010). Os cultivos microalgais não demandam grandes quantidades de água, possuem alta produtividade e possibilidade de colheita diária, tornando esta matéria-prima atrativa para geração de energia. As microalgas são capazes de alterar sua composição intracelular através de alterações no meio de cultivo e fatores ambientais. Em cultivos com redução da fonte nitrogenada, por exemplo, pode ocorrer um maior acúmulo de lipídico além de alteração gradual da composição de ácidos graxos livres e triacilgliceróis (BRENNAN; OWENDE, 2010). Estudos recentes tem demonstrado que a aplicação destes micro-organismos para fim energético, apresenta maior viabilidade se aliada a um sistema de biorrefinaria (ZHU, 2015).

O conceito de fotobiorrefinaria microalgal integra a produção de biocombustíveis a bioprodutos, a partir do cultivo de microalgas tornando o processo de obtenção de energia economicamente viável (GOUVEIA, 2011). A microalga *Spirulina* é uma cianobactéria que possui capacidade de produção de uma série de biocompostos e com isso vem sendo estudada para aplicação como base das fotobiorrefinarias microalgais. A partir de sua biomassa podem ser obtidos macronutrientes como proteínas, carboidratos e lipídios, com aplicabilidade na produção de biocombustíveis e compostos como pigmentos e ácidos graxos (MORAIS et al., 2008).

A *Spirulina* possui certificado GRAS (Generally Recognized as Safe), que permite que tanto a biomassa quanto os compostos obtidos a partir dela, possam ser comercializados e consumidos como alimento e aplicados na indústria cosmética desde que a produção se enquadre dentro de boas práticas de fabricação (ANDRADE; COSTA, 2008). O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de biofixação de CO<sub>2</sub>, produção de biodiesel e outros biocompostos pela microalga *Spirulina* sp LEB 18.



## 5.2.2. Materiais e Métodos

### 5.2.2.1 Microalga e preparação do inóculo

A microalga *Spirulina* sp LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira na região sul do Rio Grande do Sul (MORAIS et al., 2008) foi mantida em meio Zarrouk (Tabela 1) sem fonte de carbono ( $\text{NaHCO}_3$ ) e com redução de 50% da fonte de nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ) em estufa termostaticada a  $30^\circ\text{C}$  e iluminância de  $40,5 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo 12h claro/escuro. A microalga foi mantida nestas condições até atingir a fase log de crescimento celular para início do experimento (Apêndice A – Figura A5).

**Tabela 1** - Composição do meio Zarrouk

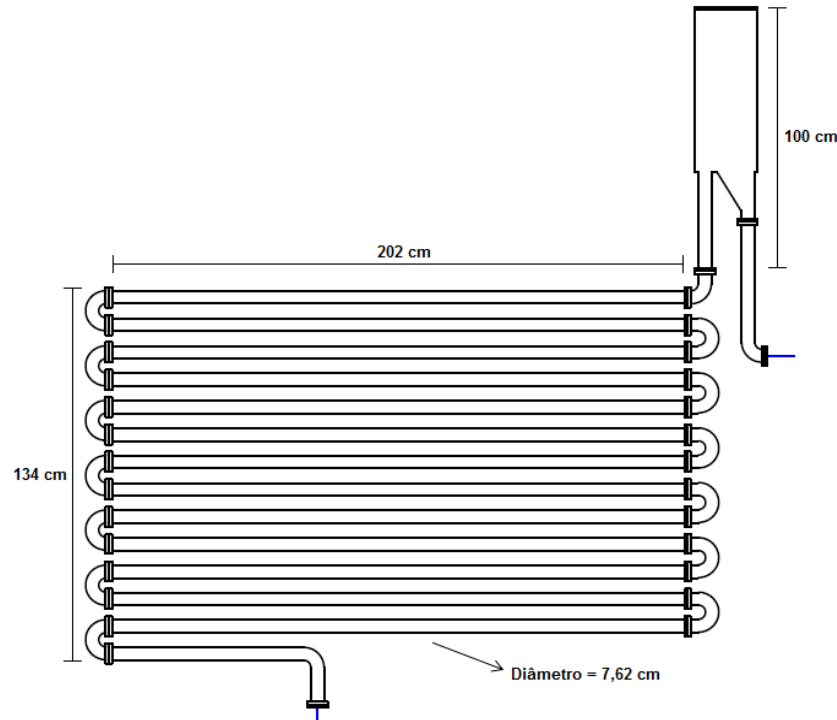
Componente	Conteúdo
$\text{NaHCO}_3$	16,80 g.L <sup>-1</sup>
$\text{NaNO}_3$	2,50 g.L <sup>-1</sup>
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,00 g.L <sup>-1</sup>
$\text{NaCl}$	1,00 g.L <sup>-1</sup>
$\text{Mg.SO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g.L <sup>-1</sup>
$\text{CaCl}_2$	0,04 g.L <sup>-1</sup>
$\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g.L <sup>-1</sup>
EDTA	0,08 g.L <sup>-1</sup>
Solução de Micronutrientes	1 mL

Fonte: ZARROUK (1986)

### 5.2.2.2 Condições de cultivo

O meio de cultivo utilizado neste estudo foi o mesmo em que o inóculo de *Spirulina* sp LEB 18 foi mantido (Zarrouk, Tabela 1), no qual a fonte de carbono ( $\text{NaHCO}_3$ ) foi substituída por 10%  $\text{CO}_2$  (v/v) injetado a vazão de  $6,5 \text{L}_{\text{ar}}.\text{min}^{-1}$  a cada 40 min por 5 min durante a fase fotoquímica. A fonte de nitrogênio do meio ( $\text{NaNO}_3$ ) foi reduzida em 50%. A microalga foi cultivada em fotobiorreator tubular horizontal equipado com *air lift* (FBRT horizontal) (Figura 1), com volume útil de 130 L. O experimento transcorreu em estufa termostaticada a  $30^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h claro/escuro e  $40,5 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$  de iluminância fornecidos por lâmpadas fluorescentes de 40 W. A concentração inicial do cultivo foi  $0,2 \text{g.L}^{-1}$  (Apêndice A – Figura A5). O experimento foi conduzido até que a fase de crescimento estacionária fosse atingida.

**Figura 1** - Esquema do biorreator tubular horizontal equipado com *air-lift*.



### 5.2.2.3 Crescimento celular e parâmetros cinéticos

O monitoramento do crescimento da microalga foi realizado diariamente, através da medida da concentração celular, em triplicata, determinada pela densidade ótica da cultura em espectrofotômetro a 670 nm (QUIMIS Q798DRM). A concentração celular foi obtida através de curva padrão, relacionando massa seca e densidade ótica ( $X_{máx}$ ) (COSTA et al., 2002). A partir destes dados foram calculados produtividade máxima ( $P_{máx}$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{máx}$ ) e tempo de geração ( $t_g$ ).

A produtividade ( $P$ ,  $g.L.d^{-1}$ ) foi calculada segundo a Equação 1, sendo  $X$  ( $g.L^{-1}$ ) a concentração celular final,  $X_0$  ( $g.L^{-1}$ ) a concentração de biomassa inicial do cultivo,  $t$  (d) o tempo final e  $t_0$  o tempo inicial do cultivo.

$$P = \frac{(X - X_0)}{(t - t_0)} \quad (1)$$

A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{máx}$ ) foi obtida por regressão exponencial na fase logarítmica de multiplicação celular e o tempo de geração ( $t_g$ ) foi obtido a partir da Equação 2 (BAILEY, 1986).

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (2)$$

A cada 24 h foi realizada a medida do pH dos cultivos em pHmetro digital (QUIMIS Q.400H).

#### 5.2.2.4 Caracterização da biomassa

A biomassa obtida nos experimentos foi centrifugada a 9000 rpm por 15 min e liofilizada para realização das análises de caracterização. A fim de realizar a comparação dos resultados, as mesmas quantificações foram realizadas em *Spirulina* sp LEB 18 produzida comercialmente pela empresa Olson microalgas (Camaquã, RS –Brasil), através de cultivo *outdoor* em fotobiorreatores raceway em estufa de filme transparente.

#### Composição de carboidratos, proteínas e lipídios

A biomassa liofilizada foi reidratada e submetida a sonda ultrassônica (COLE PARMER CPX 130 – Illinois – USA) por 10 min em pulsos de 10s, obtendo o extrato microalgal. A partir deste extrato foram realizadas análises de carboidratos segundo Dubois et al. (1956) (curva padrão de glicose) e teor de proteínas pelo método proposto por Lowry et al. (1951) (curva padrão de albumina). Os lipídios foram quantificados a partir da biomassa liofilizada utilizando método de Folch; Less; Stanley (1957). O teor de umidade foi realizado de acordo com a metodologia da AOAC (2000). As análises foram realizadas em triplicata.

#### Determinação de ésteres metílicos e composição de ácidos graxos

A determinação de ésteres metílicos foi realizada em triplicata, de duas formas. Na primeira, o método de esterificação de lipídios foi aplicado diretamente na biomassa microalgal (*in situ*). Na segunda o mesmo método de esterificação foi aplicado no extrato lipídico obtido através de Folch; Less; Stanley (1957) (convencional). Para esterificação, aproximadamente 30 mg da amostra (biomassa seca ou de extrato lipídico) foram tratadas com metóxido de sódio (MeONa) 0,05M em metanol (MeOH) durante 10 min a 100°C e logo, com cloreto de metila (MeCl) em MeOH durante 10 min a mesma temperatura (NORMA FRANCESA, 1977). Em seguida os ácidos graxos esterificados passaram por purificação em coluna de sílica de 100 mg (Supelco, USA) para retirada de impurezas que podem prejudicar a análise cromatográfica. Para acompanhamento da reação foi utilizada cromatografia em camada delgada (CCD).

Após a purificação, 1µL de amostra foi analisada por cromatógrafo gasoso (GC-2014 – Shimadzu - Japão) em presença de padrão interno, heptadecanoato de metilo, para

quantificação dos ésteres metílicos. As condições para análise em GC foram: detector de chama ionizante (FID) 340°C; coluna Supelco SP 2330 (Supelco, USA), 30m x 0,25mm x 0,2µm e gás carreador N<sub>2</sub>. Os picos de ácidos graxos foram identificados através de cromatograma de mistura de ácidos graxos metilados padrão (FAME Mix RMS; Supelco, USA).

### Rendimento de biodiesel

Foi calculado o rendimento de biodiesel referente a quantidade de lipídios totais da biomassa de acordo com o teor de ésteres metílicos obtidos a partir da extração direta (realizada a partir da biomassa seca) e extração indireta (realizada a partir do extrato lipídico) através da Equação 3, onde  $R_{Tbiodiesel}$  é o rendimento teórico do biodiesel:

$$R_{Tbiodiesel} = \frac{\text{ésteres metílicos (g)/g biomassa seca}}{\text{lipídios totais (g)/ g biomassa seca}} \cdot 100 \quad (3)$$

### Transesterificação *in situ*

Para realizar a transesterificação *in situ* utilizou-se 5g de biomassa e metanol, como substrato na proporção 2:1 (p/v), hexano 2:1 (v/v), como co-solvente, e como catalisador hidróxido de potássio (KOH 10% p/v). A reação foi realizada em shaker (300 rpm) durante 2 h a 55 °C. Após a reação de transesterificação, a massa reacional final constituída de duas fases foi separada por centrifugação e lavada com água morna para retirada do glicerol resultante da reação e catalisador. Para acompanhamento da reação foi utilizada cromatografia em camada delgada (CCD).

Após a lavagem os solventes foram evaporados utilizando rotaevaporador. Para quantificação do biodiesel obtido, os solventes residuais foram evaporados com nitrogênio até peso constante. O cálculo do rendimento de biodiesel ( $R_{Rbiodiesel}$ ) foi realizado através da Equação 4:

$$R_{Rbiodiesel} = \frac{m_{lipídios/5gbiomassa}}{m_{biodiesel}} \cdot 100 \quad (4)$$

### Biofixação de CO<sub>2</sub>

Através de analisador elementar CHNS/O (Perkin Elmer 2400 – Série II) calibrado com material de referência certificado acetanilida, foi obtida a quantidade de carbono da biomassa microalgal. A partir desses dados pode-se calcular o acúmulo de CO<sub>2</sub> fixado, fixação

diária de CO<sub>2</sub> e a biofixação de CO<sub>2</sub> em mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> relacionando o valor de fixação diária ao volume do biorreator.

O acúmulo do CO<sub>2</sub> fixado (FA, g CO<sub>2</sub>) foi calculado de acordo com a Equação 5 onde X<sub>t</sub> (g.L<sup>-1</sup>) é a concentração celular no tempo t (d), X<sub>0</sub> (g.L<sup>-1</sup>) é a concentração no tempo t<sub>0</sub>, m<sub>cbm</sub> (g<sub>C</sub>.g<sub>amostra</sub><sup>-1</sup>) é a fração mássica de carbono determinada na biomassa microalgal, V<sub>biorreator</sub> (L) é o volume de meio no biorreator, M<sub>CO2</sub> (g. mol<sup>-1</sup>) e M<sub>C</sub> são as massas moleculares de CO<sub>2</sub> e carbono, respectivamente.

$$FA = (X_t - X_0) m_{cbm} V_{biorreator} \left( \frac{M_{CO_2}}{M_C} \right) \quad (5)$$

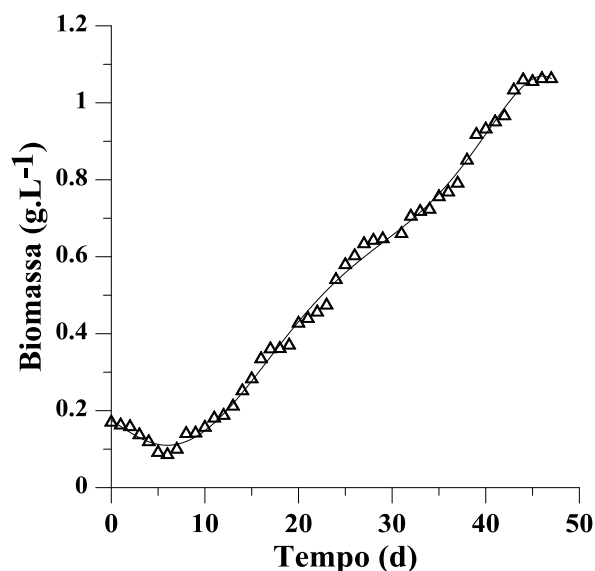
Foi calculado também a fixação diária de CO<sub>2</sub> (FD, gCO<sub>2</sub> fixado. gCO<sub>2</sub> injetado<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) a partir da Equação 6, onde FA<sub>(t+1)</sub> é o acúmulo do CO<sub>2</sub> fixado no tempo t+1 (d), FA<sub>t</sub> é o acúmulo de CO<sub>2</sub> no tempo t (d), m<sub>id</sub> (gCO<sub>2</sub>) é a massa de CO<sub>2</sub> injetada diariamente. A fixação máxima diária (FD<sub>max</sub>) é a máxima fixação diária alcançada (MORAIS; COSTA, 2008).

$$FD = \frac{(FA_{(t+1)} - FA_t)}{m_{id}} \quad (6)$$

### 5.2.3. Resultados e Discussão

O experimento com *Spirulina* sp LEB 18 utilizando meio Zarrouk com redução na fonte de nitrogênio e substituição da fonte de carbono por CO<sub>2</sub>, apresentou fase de adaptação de aproximadamente 7 d, conforme Figura 2. Após este período, a velocidade de crescimento celular aumentou gradualmente, até o ponto onde manteve-se constante, na etapa de crescimento exponencial entre 12 d e 40 d, até atingir a concentração celular máxima. Neste ponto houve desaceleração até o início na fase estacionária, identificada pelo ponto onde a concentração celular se estabilizou. A entrada na fase estacionária para os cultivos microalgais ocorre devido ao limitação de nutrientes ou sombreamento celular (SCHIMIDELL, 2001). Ao longo dos experimentos, houve pequena variação do pH devido as injeções de CO<sub>2</sub>, se mantendo entre 7,75 a 8,83.

**Figura 2-** Curva de crescimento da microalga *Spirulina* sp LEB-18



A microalga *Spirulina* sp LEB 18 utilizou a fonte carbono ( $\text{CO}_2$ ) para desenvolvimento e reprodução celular, produzindo biomassa, mesmo com a redução da fonte nitrogenada. O cultivo realizado em biorreator tubular horizontal apresentou biofixação de  $160 \text{ mg.L.d}^{-1}$  (Tabela 7). O mecanismo de biofixação de  $\text{CO}_2$  por microalgas é baseado na capacidade que esses micro-organismos possuem de realizar fotossíntese. Mudanças nas fontes nutricionais geralmente não afetam a taxa fotossintética, no entanto, a alteração na concentração de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, podem causar a redução na absorção de  $\text{CO}_2$  nos cultivos microalgais (OHSE et al., 2007). Outros fatores como, iluminância, taxa de injeção de  $\text{CO}_2$  nos cultivos, pH, densidade celular e temperatura também podem determinar aumento ou redução na biofixação (JARENKOW, 2011).

No experimento com a microalga *Spirulina* sp LEB 18 os parâmetros cinéticos obtidos ao final dos 47 d de experimento foram esperados devido as alterações no meio de cultivo. A redução na fonte de nitrogênio é uma forma efetiva de incrementar o acúmulo de lipídeos e/ou carboidratos na biomassa microalgal, no entanto o aumento destes componentes nem sempre é proporcional a produtividade, concentração celular, velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração (RICHMOND, 2008). Radmann et al. (2011) ao cultivarem *Spirulina* sp LEB 18 em meio Zarrouk utilizando 10% de  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono, durante 15 d em reator tubular vertical obtiveram concentração celular máxima de  $1,53 \text{ g.L}^{-1}$  e velocidade específica máxima de crescimento de  $0,22 \text{ d}^{-1}$  resultados superiores aos

obtidos no presente estudo. A redução da fonte nitrogênio pode ter influenciado negativamente o desenvolvimento deste micro-organismo, reduzindo a produtividade ( $0,02 \pm <0,01 \text{ g.L.d}^{-1}$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $0,12 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ ), concentração celular máxima ( $1,07 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ ) e aumento do tempo de geração ( $5,85 \pm 0,28 \text{ d}$ ). O nitrogênio é um elemento utilizado pelas células principalmente para formação de proteínas e ácidos nucleicos, sendo essencial ao desenvolvimento celular (BEZERRA et al., 2012).

A biomassa de *Spirulina* sp LEB 18 é rica em macronutrientes carboidratos, proteínas e lipídios, que podem gerar bioprodutos de alto valor agregado. Na composição dessa microalga, tanto cultivada em escala laboratorial quanto comercialmente, o macronutriente presente em maior quantidade foram as proteínas ( $47,3 \pm 1,1\%$  e  $44,7 \pm 0,2\%$ , respectivamente). Dentre os compostos proteicos presentes na *Spirulina* destaca-se a ficocianina, biocorante azul aplicado na indústria alimentícia e cosmética que possui reconhecida capacidade antioxidante (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004).

A *Spirulina* sp LEB 18 cultivada com redução da fonte de N e substituindo a fonte de C do meio Zarrouk ( $\text{NaHCO}_3$ ) por  $\text{CO}_2$  10% (v/v) apresentou um aumento de quase 6 vezes no teor de lipídios ( $32,7 \pm 1,50\%$ ) quando comparado com o cultivo da mesma espécie em escala comercial ( $5,7 \pm 0,50\%$ ). O tempo de cultivo, até a fase estacionária, e a redução do componente nitrogenado podem ter contribuído para o aumento da concentração lipídica. Na fase de crescimento exponencial geralmente o teor proteico é mais elevado devido à multiplicação celular e a formação dos ácidos nucleicos. A maior produção de lipídios e carboidratos, no entanto, ocorre na fase estacionária como forma de reserva de energia (DUNSTAN, 1993). Já redução da fonte de nitrogênio em cultivos microalgais é capaz de desviar o metabolismo das células para a produção de lipídios ou carboidratos (LOURENÇO, 2006). No caso do cultivo em biorreator tubular de *Spirulina* sp LEB 18 este desvio foi favorável a produção de lipídios e houve redução de aproximadamente 2 vezes no teor de carboidratos ( $13,4 \pm 0,50\%$  e  $21,7 \pm 0,10\%$ , cultivo em tubular e em escala comercial, respectivamente). Os carboidratos e lipídios de microalgas tem sido estudados para produção de energia e aplicação em alimentos. Sendo assim, os carboidratos obtidos podem ser aplicados na produção de bioetanol e os lipídios na produção de biodiesel e na obtenção de ácidos graxos essenciais e corantes como a astaxantina.

O biodiesel consiste de metil ésteres de ácidos graxos (FAMES) produzidos por transesterificação de lipídios que influenciam diretamente na qualidade do que é produzido. De acordo com os FAME no biodiesel, podem haver alterações nas características de viscosidade, densidade e número de cetano (RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ;

JARAMILLO-JACOB, 2012). Através da análise cromatográfica, foram identificados 82,7% e 87,6% FAMEs na biomassa da microalga *Spirulina* sp LEB 18 cultivada em escala laboratorial em biorreator tubular e comercialmente em biorreatores *raceway*, respectivamente (Tabela 2).

Os principais ácidos graxos encontrados em ambas amostras foram palmítico, palmitoleico (C16), oleico, linoleico e linolênico (C18). Estes resultados estão de acordo com a literatura que relata que a composição de ácidos graxos das microalgas é formada principalmente por ácidos graxos C16 e C18, se aproximando dos óleos vegetais normalmente utilizados para produção do biodiesel, sendo adequados para a produção deste biocombustível (MIAO; WU, 2006; KNOTHE, 2009).

**Tabela 2** - Composição de ácidos graxos (% p/p) para os cultivos da microalga *Spirulina* sp LEB 18. cultivada em FTBR horizontal (Tubular) e comercialmente em *raceway* (Comercial).

Ácidos graxos (%)	Tubular	Comercial
Palmítico(16:0)	44,9	47,2
Palmitoleico (16:1)	2,4	4,2
Oleico (18:1)	3,4	3,0
Linoleico (18:2)	11,1	12,2
$\gamma$ -Linolenico (18:3)	12,7	13,1
Outros*	6,5	6,6
Total ácidos graxos saturados	47,6	49,6
Total ácidos graxos insaturados	35,1	38,0
Total FAMEs identificados	82,7	87,6

\*13:0/14:0/14:1/15:0/15:1/17:0/16:2 n-4/16:3 n-4/17:1/18:0/16:3 n-4/18:1 trans/18:1 cis n-9/18:1 cis n-7/18:2 trans/18:2 cis n-6/18:3 n-6/ 18:3 n-3/18:4 n-3/20:0/20:1 n-9/20:2/20:3 n-6/20:3 n-6/22:0.

O ácido oleico (18:1), considerado indicador da qualidade do biodiesel foi identificado em ambas as condições de cultivo de *Spirulina* sp LEB 18, com quantidade entre 3,4% e 3,0%, escala comercial e laboratorial, respectivamente (Tabela 8). A adição do oleato de metilo é sugerida para melhorar as propriedades de biodiesel, como estabilidade oxidativa e temperatura de fusão (KHNODE, 2008). O ácido palmítico foi o FAME dominante entre o total de identificados (44,9%, cultivo em biorreator tubular e 47,2, cultivo comercial). O teor foi semelhante ao do óleo de palma, que apresenta entre 39,2% e 45,8% de 16:0 (DEPARTMENT OF STANDARTS MALASYA, 2007). Ao comparar a composição da microalga cultivada em



escala laboratorial com a comercial, pode-se afirmar que a redução na fonte de nitrogênio e a injeção de CO<sub>2</sub> praticamente não alteraram a composição de FAME na biomassa.

Nos cultivos realizados FBRT horizontal, utilizando CO<sub>2</sub> 10% (v/v) e com redução da fonte de nitrogênio em escala laboratorial, a esterificação direta dos lipídios microalgais formaram FAMEs saturados (47,6%) e insaturados (35,1%). O maior percentual de FAMEs saturados é um ponto positivo, já que quanto mais elevada a concentração destes compostos no biodiesel, maior resistência a oxidação (KONDAMUDI et al., 2009). A presença de grande quantidade de insaturados reduz a estabilidade do biodiesel, fazendo com que se oxide rapidamente (SARIN et al., 2007) (Tabela 2). Segundo Sarin et al. (2007), o óleo de palma apresenta 43,4% de saturados e 41% de ácidos graxos insaturados, desta forma, o biodiesel de *Spirulina* sp LEB 18 seria mais estável que de palma.

A transesterificação *in situ* da biomassa de *Spirulina* sp LEB 18 cultivada em FBRT horizontal obteve rendimento de 12,5±0,02%, valor inferior ao obtido teoricamente através do percentual em ésteres metílicos da biomassa (19,8±1,70%). Esse rendimento pode ser justificado pelas perdas nas etapas de lavagem e separação no processo de transesterificação *in situ* aplicado. O óleo obtido através da transesterificação *in situ* apresentou coloração amarelada devido a composição de carotenoides dentre as espécies apolares presentes na microalga *Spirulina* sp LEB 18 (Apêndice A – Figura A6 e A7).

O rendimento teórico obtido para esterificação do extrato lipídico da biomassa (47,4±1,40%), foi aproximadamente 4 vezes superior que o rendimento *in situ* real e 2 vezes maior que o rendimento *in situ* teórico. Este resultado destaca a importância do estudo da extração dos lipídios microalgais principalmente para a redução dos custos e dos tempos de reação e aumento do rendimento das metodologias aplicadas, viabilizando ainda mais a transesterificação convencional. A transesterificação convencional é a conversão química de triacilglicerídeos (óleo) em FAMEs através de um solvente e um catalisador que compreende duas etapas: extração do óleo da matéria-prima e esterificação do óleo obtido. Quando o processo ocorre *in situ* as etapas de extração e esterificação ocorrem juntas em uma única etapa. O uso deste método na obtenção de biodiesel a partir da biomassa microalgal reduz os custos de extração além do tempo de reação (PANDEY et al., 2014).

#### 5.2.4. Conclusão

A microalga *Spirulina* sp LEB 18 cultivada com redução de nitrogênio no meio de cultivo e CO<sub>2</sub> como fonte de carbono apresentou composição rica nos macronutrientes, proteínas (47,3%) carboidratos (13,4%) e lipídios (32,7%). Os lipídios avaliados quanto à

produção de biodiesel apresentaram rendimento teórico de 19,8% para transesterificação *in situ* e 47,9% para transesterificação convencional destacando a importância da avaliação das condições de extração do óleo microalgal. A microalga teve capacidade de biofixar 160 mg.L.d<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> gerando biomassa a uma produtividade máxima de 0,02 g.L.d<sup>-1</sup>. Os biocompostos produzidos possuem aplicabilidade nas indústrias alimentícia farmacêutica e energética. A biomassa microalgal possui potencial para produção de biodiesel que pode ser aplicado em substituição ou em mistura com diesel tradicional. Os resultados obtidos reforçam o uso do conceito de fotobiorrefinaria para o aproveitamento de todos os compostos da microalga viabilizando a produção de bioprodutos. O consumo de CO<sub>2</sub> pela microalga aumenta a viabilidade do processo, fechando um ciclo dentro do conceito de biorrefinaria microalgal, podendo consumir o CO<sub>2</sub> produzido através da queima dos biocombustíveis gerados pela própria microalga.

### 5.2.5. Referencias Bibliográficas

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V., Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. *Ciência agrotecnologia*, Lavras, v. 32, n. 5, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17. ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2000. v. 2. cap 30, met. 968.11, p. 4.

BAILEY, J. E. AND OLLIS, D. F., **Biochemical Engineering Fundamentals**. Ed. McGraw-Hill , 2<sup>th</sup> Ed., Singapore, 1986.

BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M.; Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. bioenergetic aspects. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 309-317, 2012.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

DAMIANI, M. C., POPOVICH, C. A., CONSTENLA, D., LEONARDI, P. I., Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10163–10172, 2010.

DEPARTAMENT OF STANDARTS MALASYA, **Palm oil – specification (second revision)** MS 814, 2007.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350–356, 1956.

DUNSTAN, G. A.; Changes in lipid compositions and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. **Journal of Applied Phycology**, v.5, p.71-83, 1993.

FOLCH, J., LEES, M.; STANLEY, G. H. S.; A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n.497, 1957.

GOUVEIA, L. **Microalgae as a Feedstock for Biofuels**, Ed. Springer, Briefs in Microbiology, Germany, 2011.

JARENKOW, A.; **Influencia da vazão de entrada de ar no crescimento de microalgas em reator tipo *air-lift***. 2008. Trabalho de Diplomação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KNOTHE, G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. **Energy Environmental Science**, v. 2, p. 759- 766, 2009.

KNOTHE, G. “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 1358–1364, 2008.

KONDAMUDI, N.; STRULL, J.; MISRA, M.; MOHAPATRA, S. A green process for producing biodiesel from feather meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 6163–6166, 2009

LOURENÇO, S.O.; **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, p.606 , 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, 1951.

MIAO, X., WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 841–846, 2006.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por micro-algas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova**. v.31, p.1038-1042, 2008.

NORMA FRANCESA, **Association Française de Normalization**, NF T60-233, 1977

OHSE, S.; DERNER, R.B.; OZERIO, R.A.; CUNHA, P.C.R.; LAMARCA, C.P.; SANTOS, M.E.; MENDES, L.B.B.; Revision on carbon sequestration by microalgae and forests and the production of lipids for the microalgae; **Insula**, n. 36, p. 39-74, 2007.

PANDEY, A., LEE, D. J., CHISTI, Y., SOCCOL, C. R., **Biofuels from algae**, Ed. Elsevier, Estados Unidos, 2014.

RADMANN, E. M., CAMERINI, F.V., SANTOS, T. D., COSTA, J. A. V.; Isolation and application of SO<sub>x</sub> and NO<sub>x</sub> resistant microalgae in biofixation of CO<sub>2</sub> from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v.52, p. 3132–3136, 2011.

RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.; JARAMILLO-JACOB, A. R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**. v. 91, p. 102–111, 2012.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, v.15, p.312-351. 2008.

SANTIAGO-SANTOS, M.C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMIREZ, R. ; ORTEGA-LOPEZ, J.; CANIZARES-VILLANUEVA, R.O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp, **Process Biochemistry**, v. 39, p.2047-2052, 2004.

SARIN, R.; SHARMA, M.; SINHARA, Y. S.; MALHOTRA, R. K. Jatropha-palm biodiesel blends: na optimum mix for Asia. **Fuel**, v 86, p. 1365-1371, 2007

SCHIMIDELL, W.; LIMA, A. U., AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 2, Edgard Blücher LTDA, São Paulo, 2001.

YEN H., HU I., CHEN C., HO S.; LEE D.; CHANG J., Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 166–174, 2013.

ZARROUK, C.; **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima***, Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

ZHU, L., Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1376–1384, 2015.



## 6. CONCLUSÃO GERAL

As microalgas cultivadas em todas as condições de cultivo foram capazes de produzir biomassa rica em lipídios com composição de ácidos graxos semelhantes a de óleos produzidos a partir de vegetais superiores (C16 e C18) e presença do ácido oleico (18:1), indicador de qualidade do biodiesel. O máximo rendimento em biodiesel foi obtido no experimento com a microalga *Spirulina* sp LEB 18 (51,5%) no experimento mixotrófico em batelada contendo 0,01 mol.L<sup>-1</sup> de glicerina em fotobiorreator tubular vertical, com percentual lipídico de 24,1%. De acordo com a composição de ácidos graxos, o óleo produzido também nesta condição, seria o mais estável com 58,3% de ésteres saturados e 29,9% insaturados. A comparação entre as reações de transesterificação *in situ* e convencional indicaram rendimento superior do modo convencional indicando a importância do estudo da extração dos lipídios microalgais. A biomassa microalgal possui potencial para produção de biodiesel que pode ser aplicado em substituição ou em mistura com diesel tradicional, a maior preocupação relacionada a esse processo biotecnológico envolvem questões de viabilidade. Os resultados obtidos reforçam a idéia da aplicação do conceito de fotobiorrefinaria para o aproveitamento de todos os compostos da microalga viabilizando a produção de bioprodutos. Ao mesmo tempo que biodiesel é produzido pode ser realizado o tratamento dos efluentes gerados pela sua produção e aplicação tornando o processo ainda mais sustentável fechando um ciclo dentro do conceito de biorrefinaria. Esta potencialidade aliada a capacidade de obtenção de biocompostos de alto valor agregado em paralelo a produção de triacilgliceróis, reduzem os custos do processo aumentando a viabilidade da produção do biocombustível.



## **8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Estudar o efeito de diferentes concentrações de glicerol no desenvolvimento celular e composição da biomassa microalgal;
- Avaliar o cultivo de microalgas utilizando glicerol e diferentes concentrações de álcool, solventes, catalisador e sabões;
- Avaliar o cultivo de microalgas com glicerol bruto e glicerol bruto após diferentes tratamentos para retirada de álcoois, catalisadores, solventes e sabões ;
- Cultivar microalga com gás de combustão de origem industrial e avaliar produção de biodiesel;
- Estudar a produção de biodiesel microalgal junto a produção de outros bioprodutos e biocombustíveis dentro de um conceito de fotobiorrefinaria.





## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, S., TURON, X., Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 733–741, 2012.
- ADAMS, E.E.; CALDEIRA, K. Carbon Sequestration via Direct Injection into the Ocean, In: **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences Encyclopedia of Ocean Sciences**, 2 ed , Academic Press, p. 495–501, 2009.
- ADARME-VEJA, T.C., THOMAS-HALL, S.R. E SCHENK, P. M., Towards sustainable sources for ômega-3 fatty acids production, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 14-18, 2014
- AMERICAN STANDARDS, **American Society for Testing and Materials**, ATSM D6751, ICS Number Code 75.160.20.
- ANDRADE M. R, COSTA J.A.V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, p.130–4, 2007.
- ANDRADE, M. R., **Biosistema para produção de Biomassa Microalgal e Biometano**. 2009. Tese (Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- ANDRADE. M. R.; COSTA, J.A .V.; Cultivo da microalga *Spirulina Platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.
- BAHADAR, A., KHAN, M. B., Progress in energy from microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 128-148, 2013.
- BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.
- BLIGH, E.G., DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Can.J.Biochem.Physiol.** v. 37, p. 911-917, 1959.
- BRACHER, E. H.. **Utilização de resíduo da indústria de laticínios para cultivo de microalgas visando à produção de biocombustível**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- BRENNAN, L., OWENDE, P., Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010
- BROWN, L.M., ZEILER, B.G., Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Convers Manage**, v. 34, p. 1005-1013, 1993.
- CERVENY J. SETLINK I., TRTILEK M., NEDBAL L. Photobioreactor for cultivation and real-time in-situ measurement of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> exchange rates, growth dynamics, and of

chlorophyll fluorescence emission of photoautotrophic microorganisms. **Eng Life Sci.** 2009, 9: 247 – 253.

CHÁVES, J. D. R. **Aproveitamento biotecnológico do glycerol derivado da produção de biodiesel para obtenção de biomassa e ribonucleotídeos.** Dissertação (Mestrado em biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2008

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, p. 294-306., 2007.

CHOJNACKA, K., MARQUES-ROCHA, F.J., KINETC. Stoichiometric relationships of the energy and carbono metabolismo in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, p. 21-34, 2004.

COLLA, L.M. Fatty acids of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.59c, p.55-59, 2004.

COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G., The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2-9 2011.

DAMIANI, M. C., POPOVICH, C. A., CONSTENLA, D., LEONARDI, P. I., Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10163–10172, 2010.

DEMIRBAS, A, Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems **Applied Energy**, v. 88, p, 3541–3547, 2011.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics. **Energy Conversion and Management**, v. 47, p. 2271–2282, 2006.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production via rapid transesterification. **Energy Sources Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**. v. 30, p. 1830–1034, 2008.

DOUCHA, J.; STRAKA, F., LIVANSKY, L. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin- layer photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, p. 403-412, 2005.

DUNSTAN, G. A. Changes in lipid compositions and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. **Journal of Applied Phycology**, n. 5, p. 71-83, 1993.

EUROPEAN STANDARDS, European Norms, EM 14214:2003.

FENG, X.; WALKER, T. H.; BRIDGES, W. C.; THORNTON, C.; GOPALAKRISHNAN, K. Biomass and lipid production of *Chlorella protothecoides* under heterotrophic cultivation on a mixed waste substrate of brewer fermentation and crude glycerol. **Bioresource Technology**, v.166, p.17–23, 2014.

FOLCH, J., LEES, M.; STANLEY, G. H. S.; A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemical**, v. 226, n.497, 1957.

FRANCK, D. **Produção de biogás a partir de algas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

FREITAS, B. C. B. **Cultivo de microalgas utilizando pentose como fonte de carbono**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

GANCEDO, C.; GANCEDO, J.M.; SOLS, A. Glycerol Metabolism in Yeasts. **European Journal of Biochemistry**, v. 6, n. 2, p. 165-172, 1968.

GAO, C.; ZHAI, Y.; DING, Y.; WU, Q., Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Energy**, v. 87, p.756-761, 2010.

GIORDANO, M.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental, modulation, and evolution. **Annual Revisions Plant Biology**, v. 56, p. 99-131, 2005.

GOULARTE, P. G. **Produção de biogás a partir da co-digestão de resíduos da geração de energia**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

GOUVEIA, L. **Microalgae as a Feedstock for Biofuels**, Ed. Springer, Briefs in Microbiology, Germany, 2011.

HALIM, H., DANQUAH, M.K., WEBLEY P.A., Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p.709–732, 2012.

HELWANI, Z., OTHMAN, M.R., AZIZ, N., FERNANDO, W.J.N., KIM, J., Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. **Fuel Processing Technology** v. 90, p. 1502–1514. 2009.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

HO, S.-H., CHEN, C.-Y., LEE, D.-J., CHANG, J.-S., Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems - a review. **Biotechnol. Adv.**v. 29, n. 2, p. 189–198, 2010.

HOEKMAN, S. K.; ROBBINS, C. Review of the effects of biodiesel on NO<sub>x</sub> emissions. **Fuel Processing Technology**, v. 96, p. 237–249, 2012.

IVERSON T.M. Evolution and unique bioenergetics mechanisms in oxygenic photosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 91 – 100, 2006.

JOHNSON, M.B., WEN, Z.Y.. Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. **Energy Fuels**, v. 23, p. 5179 -5183, 2009.

KATES, M. **Lipid extraction procedures. Techniques of lipidology isolation, analysis, and identification of lipids**. Ed. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1986.

KHAN, S.A., RASHMI, HUSSAIN, M.Z., PRASAD, S., BANERJEE, U. C., Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p.2361-2372, 2009

LEE, RE, **Phycology**. Nova Iorque: Cambridge University Press: 1980.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C.Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 4, p. 815–20, 2008.

LOURENÇO, S.O., **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Editora RiMa. São Paulo, 2006.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P., **Microbiologia de Brock**, 12ª Edição, Artmed, 2010

MARGARITES A. C. **Síntese de carboidratos por microalgas e produção de bioetanol**. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MARGARITES, A.C.F., **Seleção e cultivo de microalgas para a produção de bioetanol**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, 2008.

MEDINA, A.R., GRIMA E.M., GIMENEZ A.G., IBANEZ M.J. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 16, p. 517–580, 1998.

MEHER, L.C., VIDYA SAGAR, D., NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.10, pp. 248–268, 2006.

MORAES, L **Aumento da eficiência de biofixação de CO<sub>2</sub> por microalgas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MORAIS, E. G.; DUARTE, J. H. **Isolamento de microalgas para biofixação de CO<sub>2</sub> proveniente de geração termelétrica**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 32, p. 1245-1251, 2008.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V., Biofixation of carbono dioxide by *Spirulina* sp. and *Senedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor, **Journal of Biotechnology**, v 129, p. 439-445, 2007a.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V., Isolation and selection of microalgae from coal fired termoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion & Management**, v. 48, p. 2169-2173, 2007 b.

MORAIS, M.G.; VAZ, B.S. MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V.; Biological Effects of Spirulina (Arthrospira) Biopolymers and Biomass in the Development of Nanostructured Scaffolds. **BioMed Research International**, vol. 2014 p. 1-9, 2014.

MOREIRA, J. B. **Engenharia de microalgas para a concepção de uma biorrefinaria utilizando CO<sub>2</sub> como fonte de carbono**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MORENO-GARRIDO, I., Microalgae immobilization: Current techniques and uses, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3949-3964, 2008.

NAUREEN, R.; TARIQ, M.; YUSOFF, I. .Synthesis, spectroscopic and chromatographic studies of sunflower oil biodiesel using optimized base catalyzed methanolysis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. xxx, p. xxx–xxx, 2014.

NAUTIYAL, P. SUBRAMANIAN, K.A.; DATISDAR, M.G. Kinetic and thermodynamic studies on biodiesel production from *Spirulina platensis* algae biomass using single stage extraction-transesterification process. **Fuel**. v. 135, p. 228-234, 2014b.

NAUTIYAL, P. SUBRAMANIAN, K.A.; DATISDAR, M.G. Production and characterization of biodiesel from algae. **Fuel Process Tchenology**.v. 120, p. 79-88, 2014 a.

NELSON, D. L., COX, M. M., **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, Ed. Sarvier, 5<sup>o</sup> Edição, 2011.

OLIVEIRA, R.; LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Fps1p channel is a mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Scharomyces cerevisiae* Artefacts and re-definitions, **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1613, p. 57-71, 2003.

PANDEY, A., LEE, D. J., CHISTI, Y., SOCCOL, C. R., **Biofuels from algae**, Ed. Elsevier, Estados Unidos, 2014.

POOKSAWANG. N.; NANGTHARAT, S.; YUNCHALARD, S. Batch fermentation of marine microalgae using glycerol obtained from biodiesel plant for docosahexaenoic acid ( DHA ) production. **3rd International Conference on Fermentation Technology for Value-Added Agriculture Production**, v. 26, p. 1–7, 2009.

PYLE, D.J. **Use of biodiesel-derived crude glycerol for the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids by the microalga *Schizochytrium limacinum***, PhD Thesis, 2008.

RADMANN, E.M., **Cultivo de microalgas com gases de combustão formados da geração termelétrica**. Dissertação de mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2007

RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.,JARAMILLO-JACOB, A. R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**. v. 91, p. 102–111, 2012.

RAVELONANDRO P.H., RATIANARIVO D.H. JOANNIS-CASSAN C, ISAMBERT A., RAHERIMANDIMBY M. Influence of light quality and intensity in the cultivation of Spirulina

platensis from Toliara (Madagascar) in a closed system. **J Chem Technol Biotechnol.** v. 83, p. 842 – 848, 2008.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture.** Boston CRC Press. ISBN 0-8493-3240-0, 1990.

RICHMOND, A., **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology.** United, Kingdom: Blackwell Science, 2008.

SARIN, R.; SHARMA, M.; SINHARA, Y. S.; MALHOTRA, R. K. Jatropha-palm biodiesel blends: na optimum mix for Asia. **Fuel**, v **86**, p. 1365-1371, 2007

SCAPIN, A. R., **Cultivo da microalga Spirulina platensis para obtenção de biomassa de alto valor nutricional**, Editora Argos, Chapecó, 2005.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, A. U., AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial.** v. 2, Edgard Blücher LTDA, São Paulo, 2001.

SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R. M., Transesterification of vegetable Oils: a Review. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1997.

SCRAGG, A. H.; MORRISON, J.; SHALES, S. W.; The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. **Enzyme Microb Tech.** v. 33, p. 884-889, 2003.

SHEEHAN J, DUNAHAY T, BENEMANN J, ROESSLER P., **A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae.** Em: National Renewable Energy Laboratory: US Department of Energy, 1998.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advance**, v. 27, p. 30–9, 2009.

SINGH, S.P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 200–216, 2010.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A, Commercial Applications of Microalgae, **The Society for Biotechnology**, v. 101, p. 87-96, 2006

SWAAF, M.E.; SIJTSMA, L.; PRONK, J.T. High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 666–672, 2003.

TANI, Y.; YAMADA, K. Glycerol Metabolism in Methylotrophic Yeasts. **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1927-1933, 1987.

THELEN, J.J., OHLROGGE, J.B., Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis, **Plants Metabolic Engineering** v. 4, p. 12-21, 2002.

THOMPSON, W., MEYER, S., Second generation biofuels and food crops: Co-products or competitors?, **Global Food Security**, v. 2, p. 89-96, 2013.

TRAN, D.T.; CHEN, C.L.; CHANG, J.S. Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst, **Bioresource Technology**, v. 135, p. 213–21, 2013.

UDUMAN N., QI Y., DANQUAH M.K., HOADLEY A.F.A. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 935–940, 2010.

VISENTAINER, J. V., SANTOS O.O., **Aspectos reacionais e da química analítica na produção e controle de qualidade do biodiesel de óleos e gorduras**. ISBN: 978-857-628-521-2, 2013.

WALKER, G. M. Yeast Metabolism. In **Yeast Physiology and Biotechnology**. Ed. John Wiley & Sons, London, 1998.

WANG, B., LI, Y., WU, N., LAN, C., CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 707-18, 2008.

WILLIAMS, J. A., Keys to biorreactor selection, **CEP magazine** p. 34-41, 2002.

YAGUCHI, T.; TANAKA, S.; YOKOCHI, T.; NAKAHARA, T.; HIGASHIHARA, T. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. **Journal American Oil Chemical Society**, v. 74, p. 1431–4, 1977.

YAMANE, A.N.; OKADA, M.; SUDO, R. The growth inhibition of planktonic algae due to surfactants used in washing agents. **Water Reserch**, v. 18, n. 9, p. 1101–1105, 1984.

YOKOCHI, T.; HONDA, D.; HIGASHIHARA, T.; NAKAHARA, T. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 72–6, 1998.





## 10. APÊNDICE

### Apêndice A -Figuras

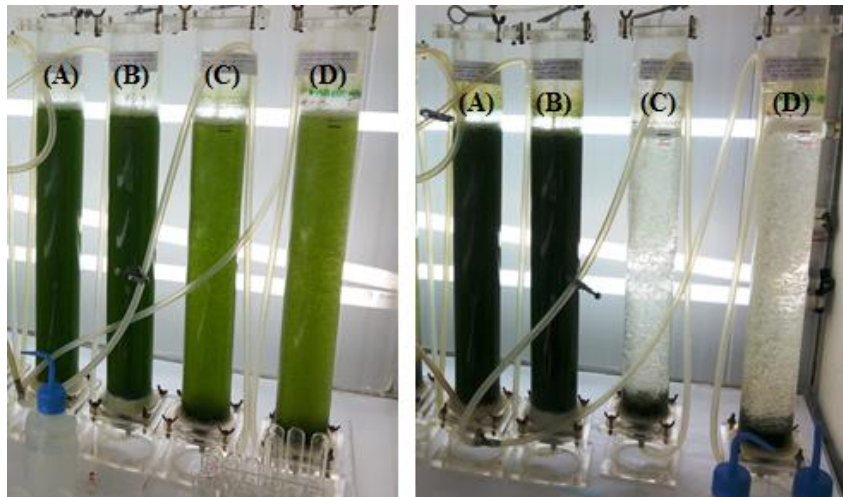
**Figura 1A** – Inóculos das microalgas *Spirulina* sp LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus actus* LEB 116 em fotobiorreatores erlenmeyers.



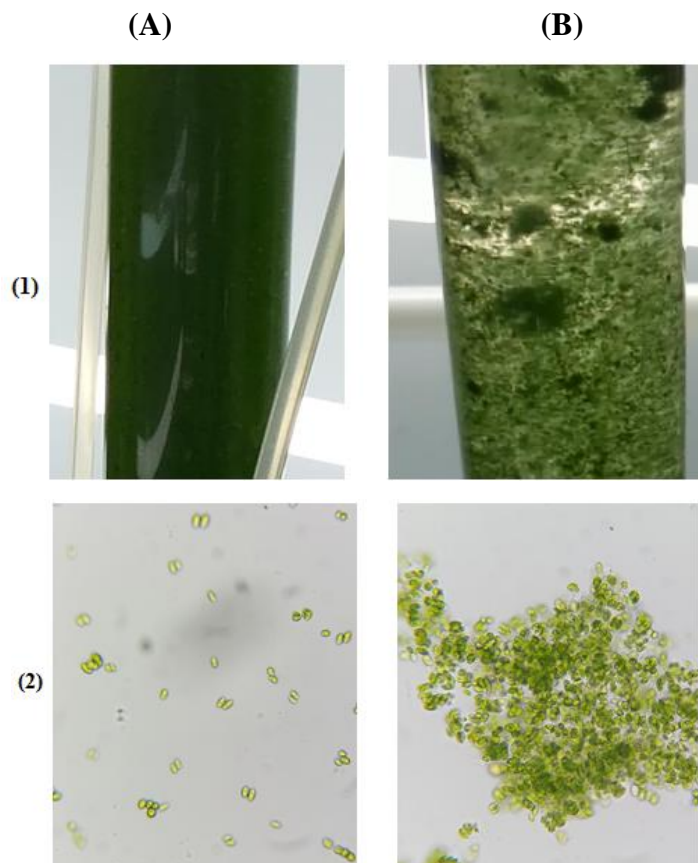
**Figura 2A** – Experimento em fotobiorreator tubular vertical com as microalgas *Spirulina* sp LEB 18, *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus actus* LEB 116 com adição de glicerina  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  sob difentes formas de condução do cultivo.



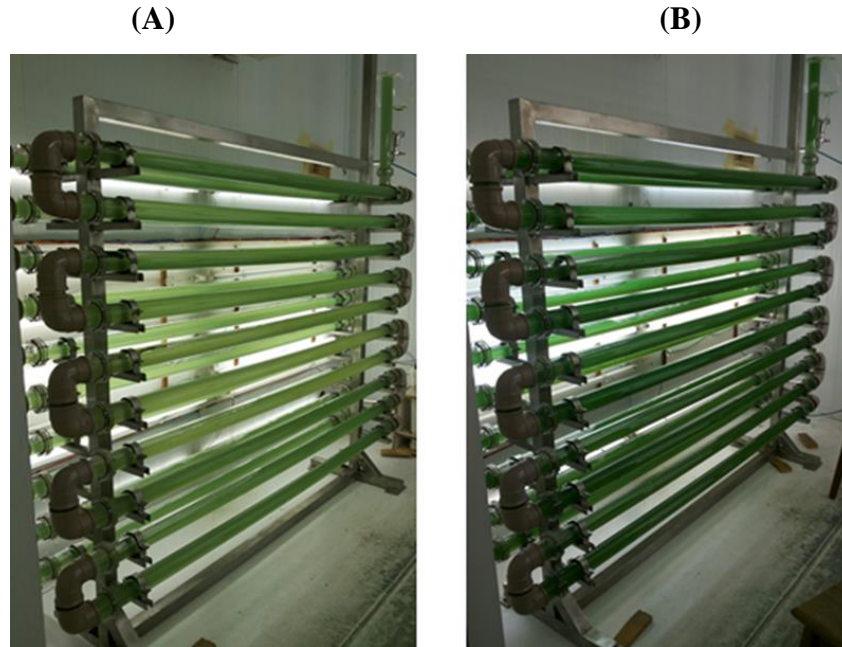
**Figura 3A** – Experimento microalga *Scenedesmus actus* LEB 116 experimentos: A e B - duplicata cultivo sem adição de glicerina, C e D – Cultivo com adição de glicerina, 0,01 mol.L<sup>-1</sup> batelada alimentada com adição nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d onde (1) 3 dias de experiment e (2) 5 dias de experimento



**Figura 4A** – Experimento microalga *Scenedesmus actus* LEB 116 após 5 dias de experimento. (A) cultivo sem adição de glicerina e (B) cultivo com adição de glicerina, 0,01 mol.L<sup>-1</sup> batelada alimentada com adição nos tempos 0 d, 5 d, 10 d e 15 d. (1) Visualização dos aglomerados celulares a partir da aproximação do reator. (2) Visualização dos aglomerados celulares em microscópio 40x.



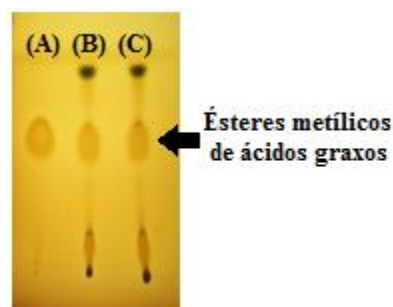
**Figura 5A** – Cultivo em fotobiorreator tubular horizontal equipado com *air-lift* da microalga *Spirulina* sp LEB-18 em meio Zarrowk utilizando CO<sub>2</sub> (10% v/v) como fonte de carbono e redução da fonte nitrogenada (KNO<sub>3</sub>) em 50%. (A) Inóculo e (B) Início do experimento.



**Figura 6A** – Biodiesel extraído do experimento com microalga *Spirulina* sp LEB 18 cultivada em fotobiorreator tubular horizontal equipado com *air-lift*, meio Zarrowk utilizando CO<sub>2</sub> (10% v/v) como fonte de carbono e redução da fonte nitrogenada (KNO<sub>3</sub>) em 50%.



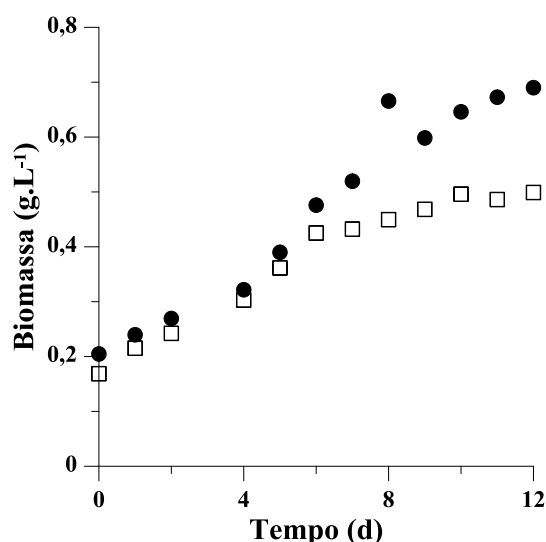
**Figura 7A** – Cromatografia em camada delgada amostras: (A) biodiesel de óleo de soja e (B)(C) duplicata biodiesel microalgal.



## Apendice B – Resultados preliminares

Foi realizado uma adaptação de inóculos com as microalgas *Chlorella fusca* e *Scenedesmus actus* em meio de cultivo BG-11 complementado com glicerina P.A. a 0,01 M durante 3 d. Com estas microalgas experimentos foram conduzidos em estufa termostatizada a 30°C, iluminância de 40,5  $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo 12h claro/escuro. Estes experimentos foram interrompidos a partir do 12º dia de experimento devido a alta decantação do meio de cultivo que impossibilitava a leitura correta da concentração celular. Os cultivos atingiram concentrações celulares máximas de 0,69  $\text{g.L}^{-1}$  e 0,50  $\text{g.L}^{-1}$  para *Scenedesmus actus* LEB 116 e *Chlorella fusca* LEB 111. A Figura 1B apresenta as curvas de crescimento.

**Figura 1 B** Curva de crescimento *Scenedesmus actus* LEB 116 (●) e *Chlorella fusca* LEB 111 (□) cultivadas em meio complementado com glicerina P.A. 0,05 $\text{mol.L}^{-1}$ .



Com a intenção de reduzir a decantação celular foi implantado um sistema de circulação de meio de cultivo através da ligação de uma bomba de circulação na saída do reator conforme a Figura 2B. No entanto, a partir do 3º dia de experimento foi observada a redução na velocidade de crescimento celular, até a morte no 5º dia. A morte celular se deu devido ao rompimento celular causado pela abrasão das células ao passar pelo mecanismo da bomba.

**Figura 2 B** Esquema fotobiorreator tubular vertical adaptado com bomba de circulação de meio de cultivo (a) Esquema em funcionamento inóculo de *Chlorella fusca* LEB 111 em meio complementado com glicerina P.A.  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  (1d) e (b) Montagem do sistema

