

---

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA  
MICROALGA *Scenedesmus* sp. PARA A PRODUÇÃO DE  
BIODIESEL**

**Neumara Luci Silva Hakalin**



Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular como requisito parcial à obtenção do título de doutor (*D.Sc.*)

**Orientadora:**

**Lídia Maria Pepe de Moraes, *Ph.D.***

**Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade de Brasília**

**2014**

---

**Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a  
produção de biodiesel**

**Neumara Luci Silva Hakalin**

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Biologia Molecular (*D.Sc.*).

Brasília, DF

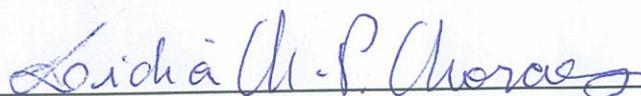
2014

**Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a  
produção de biodiesel**

**Neumara Luci Silva Hakalin**

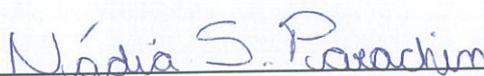
Tese de Doutorado submetida ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.).

Aprovada por:

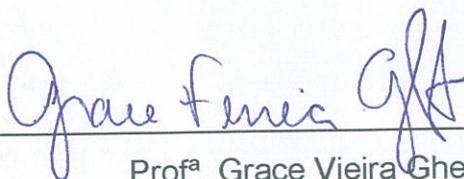


Prof<sup>a</sup>. Lídia Maria Pepe de Moraes, *Ph.D.*

Orientadora



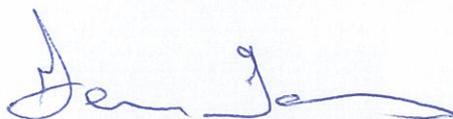
Prof<sup>a</sup>. Nádia Skorupa Parachin, *Ph.D.*



Prof<sup>a</sup>. Grace Vieira Ghesti, *Ph.D.*



Prof<sup>o</sup>. Nelson Roberto Antoniosi Filho, *Ph.D.*



Prof<sup>o</sup>. Fernando Araripe Gonçalves Torres, *Ph.D.*

*Aos meus pais, fontes de minhas forças, à minha irmã, exemplo que sempre procurei seguir,  
ao meu amor Petteri e ao professor Donato, dedico-lhes este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder mais uma benção;

À professora Lídia Maria Pepe Moraes pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, compreensão, conselhos, confiança e orientação por uma dedicada pesquisadora-professora, quem sempre se dispôs a compartilhar seus conhecimentos;

Ao professor Donato Aranda pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, orientação por um excepcional professor-pesquisador-empresário empreendedor, amizade, carinho, incentivo, dedicação, confiança e delegação de responsabilidades que me fizeram crescer como profissional e pessoa.

Aos meus familiares Raumaiana, Antônio, Landijara, Luana Mayana, Ricardo, Daisy e Claudia por acreditarem e apoiarem desde os meus pequenos desejos até os grandes e difíceis sonhos;

Ao amor de minha vida, meu marido Petteri, pelo amor, compreensão, paciência, apoio mesmo à distância e por toda colaboração direta ou indireta durante esta minha importante jornada;

Às minhas amigas do Laboratório de Biologia Molecular e da vida, Theyssa Barbosa e Juliana Amorim, pelo carinhoso acolhimento tanto no ambiente de trabalho quanto em suas residências, pela preocupação, inúmeros momentos de descontração, atenção, conhecimento e paciência;

À doutoranda do Laboratório Greentec Mariana Fortes pela atenção, lealdade, divertimento mesmo nos momentos mais difíceis e valiosa amizade tanto no âmbito profissional quanto no pessoal;

À Amanda Paz, Barbara Leal, Camila Diniz, Mariana Candido, Thaissa Dias e Thaisa Oliveira pela dedicação, carinho, companheirismo, alegria e colaboração nos experimentos realizados;

Aos estudantes e funcionários dos Laboratórios de Biologia Molecular (UnB) e GreenTec (UFRJ), em especial Túlio, Marciano, Carol Brêttas, Osmar, Yordanka, Gisel e Carol Viegas pela ajuda na solução de problemas e pela amizade que tornaram o ambiente de trabalho muito agradável;

Aos amigos Stephanie Beu, Silvia Michiko, Tahysa Macedo, Janaína Sturari e Roberto Maeda pelo carinho, fé, incentivo e alto astral que me impulsionaram em todos momentos;

À Ana, secretária da pós-graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, UnB, pela atenção, carinho e ajuda na solução de problemas burocráticos;

À Capes e PETROBRÁS pelo auxílio financeiro.

## ÍNDICE

### **CAPÍTULO 1**

<b>1. APRESENTAÇÃO DO TEMA</b>	1
--------------------------------	---

### **CAPÍTULO 2**

<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	5
2.1. BODIESEL	5
2.1.1. Matérias-primas para produção de biodiesel	11
2.2. MICROALGAS	14
2.2.1. Condições nutricionais	16
2.2.2. Tipos de cultivo de microalgas	19
2.2.3. Fontes promissoras de carbono orgânico para o cultivo heterotrófico e mixotrófico de microalgas	23
2.3. SISTEMAS DE CULTIVOS DE MICROALGAS	25
2.4. FORMAS DE CONDUÇÃO DE CULTIVOS MICROALGÁCEOS	27
2.5. LIPÍDEOS DE MICROALGAS E SUA EXTRAÇÃO	28
2.6. TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE BODIESEL DE MICROALGAS	30

### **CAPÍTULO 3**

<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	34
3.1. JUSTIFICATIVA	34
3.2. OBJETIVOS	35

### **CAPÍTULO 4**

<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	37
4.1. MICRORGANISMO	37
4.2. MEIOS DE CULTURA	38
4.3. PRESERVAÇÃO DE <i>Scenedesmus</i> sp.	39
4.4. CULTIVO DE ATIVAÇÃO DE <i>Scenedesmus</i> sp.	42
4.5. CULTIVO DO INÓCULO DE <i>Scenedesmus</i> sp.	44
4.6. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA ASM1	45
4.6.1. Validação da otimização do meio ASM1	47
4.7. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NO CULTIVO DE <i>Scenedesmus</i> sp.	47
4.8. OBTENÇÃO DE GLICOSE A PARTIR DA BIOMASSA	48

LIGNOCELULÓSICA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE CELULOSE VISANDO SUA APLICAÇÃO NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE <i>Scenedesmus</i> sp.	
4.9. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE CULTIVOS SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp.	51
4.10. ESCALONAMENTO DO CULTIVO DE <i>Scenedesmus</i> sp.	52
4.11. CULTIVO DE <i>Scenedesmus</i> sp. EM GARRAFÃO E SUA PROPAGAÇÃO	53
4.12. ESTRUTURA DOS FOTOBIOREATORES DE 1.100 L	55
4.13. PRODUÇÃO DE <i>Scenedesmus</i> sp. EM FOTOBIOREATORES DE 1.100 L	58
4.13.1. Produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada simples	58
4.13.2. Produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada alimentada	59
4.13.3. Produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada semicontínua	59
4.14. CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA <i>Scenedesmus</i> sp. PRODUZIDA EM FOTOBIOREATORES DE 1.100 L	60
4.15. PRODUÇÃO DE BODIESEL A PARTIR DE <i>Scenedesmus</i> sp. CULTIVADA EM FOTOBIOREATORES	62
4.16. MÉTODOS ANALÍTICOS	65
4.16.1. Densidade celular	65
4.16.2. Determinação de biomassa seca e teor de umidade	65
4.16.3. Determinação de turbidez	66
4.16.4. Cálculo de produtividade em biomassa e em lipídeos, velocidade específica de crescimento e tempo de duplicação	67
4.16.5. Determinação de teor de lipídeos totais	67
4.16.6. Determinação de teor de óleo	69
4.16.7. Determinação do perfil de ésteres metílicos	69
4.16.8. Quantificação de açúcares	70
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	71
5.1. CULTIVO DE ATIVAÇÃO DE <i>Scenedesmus</i> sp.	71
5.2. CULTIVO DO INÓCULO DE <i>Scenedesmus</i> sp.	74
5.3. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA ASM1	76
5.3.1. Validação da otimização do meio ASM1	92
5.4. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NO CULTIVO	97

FOTOTRÓFICO DE <i>Scenedesmus</i> sp.	
5.5. OBTENÇÃO DE GLICOSE A PARTIR DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE CELULOSE VISANDO SUA APLICAÇÃO NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE <i>Scenedesmus</i> sp.	103
5.6. AVALIAÇÃO DO CULTIVO FOTOTRÓFICO, MIXOTRÓFICO E HETEROTRÓFICO DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp. VISANDO MAXIMIZAR SUA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS	109
5.7. CULTIVO DE <i>Scenedesmus</i> sp. EM GARRAFÃO E SUA PROPAGAÇÃO PARA INOCULAÇÃO EM FOTOBIOREACTORES	115
5.8. PRODUÇÃO DE <i>Scenedesmus</i> sp. EM FOTOBIOREACTORES DE 1.100 L	119
5.8.1. Produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada simples	119
5.8.2. Produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada alimentada	121
5.8.3. Produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada semicontínua	124
5.9. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DA MICROALGA CULTIVADA EM FOTOBIOREACTORES DE 1.100 L	129
5.10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
<b>CAPÍTULO 6</b>	
<b>6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b>	140
<b>CAPÍTULO 7</b>	
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	144

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Filtros com materiais particulados de biodiesel e de diesel fóssil.	8
<b>Figura 2.2.</b> Evolução da mistura obrigatória de biodiesel no diesel no PNPB.	9
<b>Figura 2.3.</b> Produção de biodiesel no Brasil e percentagem de ociosidade das indústrias em 2013 mediante a capacidade total de produção.	10
<b>Figura 2.4.</b> Participação do Brasil na produção mundial de biodiesel em 2013.	11
<b>Figura 2.5.</b> Matérias-primas utilizadas na produção brasileira de biodiesel em 2013.	12
<b>Figura 2.6.</b> Morfologia microscópica de <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em meio ASM1, 400 $\mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 $\text{ar min}^{-1}$ e 23 °C.	16
<b>Figura 2.7.</b> Sistemas de cultivo aberto e fechado.	25
<b>Figura 4.1.</b> Aspecto microscópico de <i>Scenedesmus</i> sp. a um aumento de 400x (A) e 1000x (B) após 4 dias de cultivo em meio ASM1, sob 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1,0 $\text{L min}^{-1}$ e 23 °C.	38
<b>Figura 4.2.</b> Estante de cultivo.	39
<b>Figura 4.3.</b> Inóculos de <i>Scenedesmus</i> sp. preservados (A) e incubadora (B).	40
<b>Figura 4.4.</b> Sistema de cultivo de 250 mL e os seus componentes.	42
<b>Figura 4.5.</b> Sistema de cultivo de 1 L conectado à saída de ar da estante de cultivo.	44
<b>Figura 4.6.</b> Biomassa lignocelulósica residual proveniente do sistema de decantação da indústria de celulose.	49
<b>Figura 4.7.</b> Fluxograma da produção de celulose e da origem da biomassa lignocelulósica residual do sistema de decantação.	49
<b>Figura 4.8.</b> Fluxograma do escalonamento do cultivo da microalga <i>Scenedesmus</i> sp.	52
<b>Figura 4.9.</b> Sistema de cultivo de 20 L (A) e seus componentes conectados à rede de aeração (B).	53
<b>Figura 4.10.</b> Fotobiorreatores verticais do tipo janela da unidade piloto do NBPD/EQ/UFRJ.	56
<b>Figura 4.11.</b> Esquema de recirculação do cultivo ao longo dos dez fotobiorreatores de cada série.	57
<b>Figura 4.12.</b> Trajetória do cultivo dentro de um fotobiorreator durante sua recirculação	57
<b>Figura 4.13.</b> Sistema de microfiltração de água com carvão ativado pressurizado.	58
<b>Figura 4.14.</b> Sistema de concentração de biomassa por microfiltração.	61
<b>Figura 4.15.</b> Sistema reacional para produção de biodiesel por transesterificação.	62
<b>Figura 4.16.</b> Reator Parr utilizado na hidroesterificação de <i>Scenedesmus</i> sp.	63
<b>Figura 4.17.</b> Reator Parr utilizado na saponificação e acidulação de <i>Scenedesmus</i> sp.	64
<b>Figura 5.1.</b> Cultivo de ativação de <i>Scenedesmus</i> sp. com S:L 1:50 conduzido em sistema de 250 mL sob 400 $\mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 $\text{L ar min}^{-1}$ e 23 °C.	72
<b>Figura 5.2.</b> Cultivo de ativação de <i>Scenedesmus</i> sp. com S:L 1:4 conduzido em sistema de 250 mL sob 400 $\mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 $\text{L ar min}^{-1}$ e 23 °C.	73
<b>Figura 5.3.</b> Cultivo do inóculo de <i>Scenedesmus</i> sp. com S:L 1:4 conduzido em sistema de 1 L sob 400 $\mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 $\text{L ar min}^{-1}$ e 23 °C.	75
<b>Figura 5.4.</b> Imagens do inóculo de <i>Scenedesmus</i> sp. nos dias 0 e 10.	76
<b>Figura 5.5.</b> Perfis cinéticos dos cultivos de <i>Scenedesmus</i> sp. do DCCR conduzidos em sistema de 1 L sob 400 $\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 $\text{L ar min}^{-1}$ e 23 °C.	77

<b>Figura 5.6.</b> Biomassa e teor de lipídeos totais de <i>Scenedesmus</i> sp. alcançados em cada cultivo do DCCR.	80
<b>Figura 5.7.</b> Imagens dos cultivos de <i>Scenedesmus</i> sp. no DCCR para otimizar o meio ASM1.	84
<b>Figura 5.8.</b> Gráfico de Pareto para a densidade de células como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp.	86
<b>Figura 5.9.</b> Gráfico de Pareto para o teor de lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp.	86
<b>Figura 5.10.</b> Gráfico de Pareto para o produtividade em lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp.	87
<b>Figura 5.11.</b> Superfície de resposta em função de nitrato e fosfato para a densidade celular como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp..	88
<b>Figura 5.12.</b> Superfície de resposta em função de nitrato e vitamina para a densidade celular como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp..	88
<b>Figura 5.13.</b> Superfície de resposta em função de fosfato e vitamina para a densidade celular como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp..	89
<b>Figura 5.14.</b> Superfície de resposta em função de nitrato e fosfato para o teor de lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp..	89
<b>Figura 5.15.</b> Superfície de resposta em função de nitrato e vitamina para o teor de lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp..	90
<b>Figura 5.16.</b> Superfície de resposta em função de fosfato e vitamina para o teor de lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp..	90
<b>Figura 5.17.</b> Superfície de resposta em função de nitrato e fosfato para a produtividade em lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp..	91
<b>Figura 5.18.</b> Superfície de resposta em função de nitrato e fosfato para a produtividade em lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp..	91
<b>Figura 5.19.</b> Superfície de resposta em função de nitrato e fosfato para a produtividade em lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de <i>Scenedesmus</i> sp..	92
<b>Figura 5.20.</b> Superfície de resposta da função <i>Desirability</i> para otimização simultânea das concentrações de nitrato e fosfato para produção de lipídeos e células de <i>Scenedesmus</i> sp..	93
<b>Figura 5.21.</b> Superfície de resposta da função <i>Desirability</i> para otimização simultânea das concentrações de nitrato e vitamina para a produção de lipídeos e células de <i>Scenedesmus</i> sp..	93
<b>Figura 5.22.</b> Superfície de resposta da função <i>Desirability</i> para otimização simultânea das concentrações de fosfato e vitamina para produção de lipídeos e células de <i>Scenedesmus</i> sp..	94
<b>Figura 5.23.</b> Perfis cinéticos <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em meio ASM1, ASM1-O, BG11-N, BG11-U e BBM, sistema de 1 L sob 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 L ar $\text{min}^{-1}$ e 23 °C.	98

<b>Figura 5.24.</b> Produção de biomassa de <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em meio ASM1, ASM1-O, BG11-N, BG11-U e BBM, sistema de 1 L sob 400 $\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 L ar $\text{min}^{-1}$ e 23 °C.	99
<b>Figura 5.25.</b> Teor de lipídeos totais e produtividade em lipídeos totais obtidos com <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada por 10 dias em meio ASM1, ASM1-O, BG11-N, BG11-U e BBM, sistema de 1 L sob 400 $\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 L ar $\text{min}^{-1}$ e 23 °C.	100
<b>Figura 5.26.</b> Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual da indústria de celulose, realizada em frascos de 0,5 L sob 47 °C e a 200 rpm.	105
<b>Figura 5.27.</b> Gráfico de Pareto para a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) como variável de resposta do DCCR para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual da indústria de celulose.	107
<b>Figura 5.28.</b> Superfície de resposta para a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) como variável de resposta do DCCR para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual da indústria de celulose.	107
<b>Figura 5.29.</b> Validação da melhor condição (S:L 1:4 e carga enzimática 17,5 FPU $\text{g}^{-1}$ ) da hidrólise enzimática da biomassa residual da indústria de celulose, realizada em frascos de 0,5 L sob 47 °C e a 200 rpm.	108
<b>Figura 5.30.</b> Perfis cinéticos de <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em fototrofia, mixotrofia e heterotrofia com meio BG11-N.	110
<b>Figura 5.31.</b> Produção de biomassa de <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em fototrofia, mixotrofia e heterotrofia com meio BG11-N.	111
<b>Figura 5.32.</b> Teor de lipídeos totais e produtividade em lipídeos totais obtidos com <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em fototrofia, mixotrofia e heterotrofia com meio BG11-N.	112
<b>Figura 5.33.</b> Teor de lipídeos totais e produtividade em lipídeos totais obtidos com <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em fototrofia, mixotrofia e heterotrofia com meio BG11-N.	114
<b>Figura 5.34.</b> Cultivo de garrafão de <i>Scenedesmus</i> sp. conduzido em sistema de 20 L sob 400 $\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 8 L ar $\text{min}^{-1}$ e 23 °C.	116
<b>Figura 5.35.</b> Cultivo de garrafão de <i>Scenedesmus</i> sp. com 0 e 8 dias de crescimento sob 400 $\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 8 L ar $\text{min}^{-1}$ e 23 °C.	117
<b>Figura 5.36.</b> Cultivo de propagação de <i>Scenedesmus</i> sp. conduzido em sistema de 20 L sob 400 $\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 9 L ar $\text{min}^{-1}$ e 23 °C.	118
<b>Figura 5.37.</b> Imagens do cultivo de propagação de <i>Scenedesmus</i> sp..	118
<b>Figura 5.38.</b> Produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada simples em fotobiorreatores de 1.100 L sob radiação solar, 10 L ar $\text{min}^{-1}$ , temperatura máxima de 30 °C e pH 8,0.	120
<b>Figura 5.39.</b> Imagens da produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada simples.	121
<b>Figura 5.40.</b> Produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada alimentada em fotobiorreatores de 1.100 L sob radiação solar, 10 L ar $\text{min}^{-1}$ , temperatura máxima de 30 °C e pH 8,0.	122
<b>Figura 5.41.</b> Imagens da produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada alimentada.	123
<b>Figura 5.42.</b> Produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada semicontínua em fotobiorreatores de 1.100 L sob radiação solar, 10 L ar $\text{min}^{-1}$ , temperatura máxima de 30 °C e pH 8,0.	124
<b>Figura 5.43.</b> Imagens da produção de <i>Scenedesmus</i> sp. em batelada semicontínua.	125
<b>Figura 5.44.</b> Perfil cinético da produção de <i>Scenedesmus</i> sp. na validação da batelada semicontínua em fotobiorreatores de 1.100 L sob radiação solar, 10 L ar $\text{min}^{-1}$ , temperatura máxima de 30 °C e pH 8,0.	127
<b>Figura 5.45.</b> Imagens do processo de extração de óleo de <i>Scenedesmus</i> sp.	129
<b>Figura 5.46.</b> Produção de biodiesel de <i>Scenedesmus</i> sp. por saponificação/ esterificação.	132

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Emissões de poluentes (%) da queima do biodiesel comparadas com as emissões da queima do óleo diesel de petróleo.	7
<b>Tabela 2.2.</b> Comparação das características de diferentes tipos de cultivos de microalgas.	21
<b>Tabela 2.3.</b> Comparação das propriedades do biodiesel de microalga e diesel convencional com o padrão do método ASTM para biodiesel.	32
<b>Tabela 4.1.</b> Níveis do DCCR para os nutrientes do ASM1 avaliados no cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.	45
<b>Tabela 4.2.</b> Matriz do DCCR para os nutrientes do ASM1 avaliados no cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.	46
<b>Tabela 4.3.</b> Intervalo utilizado para construir o DCCR para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual.	50
<b>Tabela 5.1.</b> Produtividades em células ( $P_X$ ), velocidade de crescimento ( $\mu$ ) e tempos de duplicação ( $T_d$ ) dos cultivos do DCCR após dez dias.	78
<b>Tabela 5.2.</b> Produtividades em biomassa seca ( $P_X$ ) e em lipídeos totais ( $P_{LT}$ ) dos cultivos do DCCR após dez dias.	83
<b>Tabela 5.3.</b> Valores preditos de densidade celular ( $X_f$ ), teor de lipídeos totais (TLT) e produtividade em lipídeos ( $P_{LT}$ ) conforme a função <i>Desirability</i> .	95
<b>Tabela 5.4.</b> Concentrações de açúcares obtidas na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual da indústria de celulose.	106
<b>Tabela 5.5.</b> Rendimentos médios em volume de cultura, número de células, biomassa seca e lipídeos totais e produtividades médias em biomassa seca ( $P_X$ ) e lipídeos totais ( $P_{LT}$ ) alcançados nas bateladas simples, alimentada e semicontínua conduzidas em fotobiorreatores de 1.100 L.	126
<b>Tabela 5.6.</b> Composição de FAME (%) de <i>Scenedesmus</i> sp. produzido por transesterificação, hidroesterificação e saponificação seguida de esterificação.	130
<b>Tabela 5.7.</b> Características do biodiesel de <i>Scenedesmus</i> sp. produzido por saponificação/esterificação.	133
<b>Tabela 5.8.</b> Resultados obtidos em cada etapa de cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp. no presente trabalho.	135
<b>Tabela 5.9.</b> Comparação dos melhores resultados do presente trabalho obtidos nos cultivos fototrófico, heterotrófico e mixotrófico de <i>Scenedesmus</i> sp. com aqueles reportados por outros trabalhos que realizaram cultivos de microalga visando a produção de biodiesel.	137

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

MP – material particulado;  
ha – hectare;  
g – grama;  
mg – miligrama;  
 $\mu\text{g}$  – micrograma;  
L – litro;  
mL – mililitro;  
 $\mu\text{L}$  – microlitro;  
 $^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius;  
rpm – revoluções por minuto;  
h – hora;  
min – minuto;  
s – segundo;  
m – metro;  
cél(s) – célula(s);  
 $\mu$  – velocidade específica de crescimento;  
Td – tempo de duplicação;  
 $X_{(i/f)}$  – biomassa (inicial/final);  
 $P_X$  – produtividade em biomassa;  
 $P_{LT}$  – produtividade em lipídeos totais;  
TLT – teor de lipídeos totais;  
FAME – éster metílico de ácido graxo;  
SAFA – ácido graxo saturado;  
MUFA – ácido graxo monoinsaturado;  
PUFA – ácido graxo poliinsaturado;  
B2-20 – mistura de 2-20 % de biodiesel no diesel mineral;  
B100 – biodiesel puro;  
PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel;  
ASTM – American Society of Testing and Materials;  
EN – Norma de União Europeia;

## Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – Brasil.

**Neumara Luci Silva Hakalin**

Orientadora: Lídia Maria Pepe de Moraes

A grande dependência de fontes de energia não renováveis e altamente poluentes, como o petróleo e seus derivados, tem levado a sociedade a buscar alternativas para a utilização de combustíveis renováveis. As pesquisas atuais sinalizam como tecnologia emergente a produção de biodiesel combustível a partir de microalgas. Neste contexto, o presente trabalho objetivou otimizar as condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a utilização de seu óleo na produção de biodiesel. Como resultados, foram determinadas as melhores concentrações de nitrato ( $159 \text{ mg L}^{-1}$ ), fosfato ( $49 \text{ mg L}^{-1}$ ) e vitaminas ( $0,31 \text{ mg L}^{-1}$ ) do meio ASM1 no cultivo fototrófico, as quais maximizaram simultaneamente a densidade celular ( $1,3\text{E}+07 \text{ céls mL}^{-1}$ ), teor de lipídeos (20 %) e produtividade em lipídeos ( $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Dentre os meios de cultura avaliados, com o BG11-N foram alcançadas as máximas produtividades em biomassa e lipídeos, 210 e 61  $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Na avaliação do cultivo fototrófico, heterotrófico e mixotrófico, alcançou-se a máxima produtividade em lipídeos ( $138 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) em mixotrofia. Com o escalonamento do cultivo em fotobiorreatores de 1.100 L foram obtidos 1,5 kg de biomassa seca e 250 g de lipídeos através da batelada semicontínua, selecionada como a melhor forma de condução do cultivo de *Scenedesmus* sp.. As produções de biodiesel por transesterificação, hidroesterificação e saponificação/esterificação resultaram altas percentagens de ésteres, 99,3, 92,5 e 94,3 %, respectivamente, com predominância de C16 e C18. Os resultados mostraram que *Scenedesmus* sp. SCIB-01 constituiu uma matéria-prima oleaginosa bastante promissora para a produção de biodiesel.

## **Optimization of microalgae *Scenedesmus* sp. cultivation conditions for biodiesel production**

Abstract of Thesis presented to the Post graduation program on Molecular Biology of the Biological Sciences Institute of University of Brasília – Brazil.

**Neumara Luci Silva Hakalin**

Supervisor: Lídia Maria Pepe de Moraes

The large reliance on non-renewable sources and highly polluting fuels such as petroleum and its derivatives, has led the society to seek alternatives of renewable energy. Current research indicates as emerging technology the production of fuel biodiesel from microalgae. The objective of this study was to optimize the cultivation conditions of the microalgae *Scenedesmus* sp. and use the oil to produce biodiesel. As results, the best concentrations of nitrate ( $159 \text{ mg L}^{-1}$ ), phosphate ( $49 \text{ mg L}^{-1}$ ) and vitamins ( $0.31 \text{ mg L}^{-1}$ ) of ASM1 medium were determined in phototrophic cultivation, which maximized the cell density ( $1.3\text{E}+07 \text{ cell mL}^{-1}$ ), lipid content (20 %) and lipid productivity ( $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) simultaneously. Among the culture media evaluated, the maximum biomass and lipid productivity were reached using BG11-N, 210 and 61  $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectively. Analysing the phototrophic, heterotrophic and mixotrophic cultivations, the maximum lipid productivity ( $138 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) was achieved with mixotrophic. In the process of scaling-up the cultivation in photobioreactor of 1.100 L, 1.5 kg of dry biomass and 250 g of lipid were obtained through the semicontinuous batch, selected as the best form to conduce the *Scenedesmus* sp. cultivation. Biodiesel productions by transesterification, hidroesterification, and saponification/esterification resulted high methyl esters content, 99.3, 92.5 and 94.3 %, respectively, with predominance of C16 and C18. The results showed *Scenedesmus* sp. SCIB-01 as a promising feedstock for the biodiesel production.

# ***CAPÍTULO 1***

## **1. APRESENTAÇÃO DO TEMA**

O crescente aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera, associado principalmente à queima dos combustíveis de origem fóssil, e a redução das reservas de petróleo tem aumentado o interesse comercial em desenvolver tecnologias para a produção de combustíveis a partir de fontes renováveis (HALIM *et al.*, 2012).

Uma das alternativas colocadas em questão é o biodiesel, que apresenta vantagens técnicas, ambientais, sociais e econômicas quando comparado com o diesel fóssil. Diante disto, o biodiesel foi incluído na matriz energética brasileira em 2005 e hoje emprega-se uma ampla diversidade de óleos e gorduras em sua produção, destacando-se o óleo de soja, óleo de algodão e gordura bovina (ANP, 2014).

Os óleos encontrados nas microalgas possuem características físicoquímicas similares aos dos óleos vegetais e esta vantagem, dentre inúmeras outras, corroboram o apontamento para as microalgas como sendo matérias-primas promissoras para a produção de biodiesel (HALIM *et al.*, 2012).

Para aplicação das microalgas na produção de biodiesel, fazem-se necessários ainda muitos estudos a fim de se otimizar as condições de cultivos, destacando-se o fototrófico, mixotrófico e heterotrófico como os melhores tipos; os sistemas de cultivos, aberto ou fechado; as formas de condução dos cultivos, como batelada simples, semicontínua e alimentada; o método de concentração da biomassa e de extração de seu óleo, bem como a tecnologia de produção de biodiesel.

No presente trabalho objetivou-se desenvolver diferentes concepções de cultivos da microalga *Scenedesmus* sp. para o aproveitamento do seu óleo na produção de biodiesel combustível.

Composta de sete capítulos, a presente tese procurou cobrir de forma abrangente esta complexa temática. No primeiro capítulo, é apresentado de forma sumarizada, o paradigma defectivo dos combustíveis de origem fóssil, apontando o biodiesel como excelente alternativa de combustível veicular. Destaca-se ainda o óleo de microalgas como excelente matéria-prima para este fim mas com a necessidade de otimizar as condições do seu cultivo.

O segundo capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre os temas que tangem a temática abordada na presente tese: o biodiesel, relatando sua inserção e evolução no mercado e as matérias-primas utilizadas; a microalga, destacando seu metabolismo de lipídeos; os sistemas de cultivo de microalgas e as principais estratégias de condução para este fim; bem como a extração de óleo microalgáceo e a produção de biodiesel a partir deste.

As justificativas e os objetivos que nortearam a construção deste presente trabalho são relatados no terceiro capítulo. Os materiais utilizados e as metodologias que foram empregadas são descritas no quarto capítulo, enquanto os resultados obtidos, assim como a análise estatística e fenomenológica dos mesmos, são apresentados no quinto capítulo. No sexto capítulo, encontram-se as conclusões obtidas a partir dos experimentos realizados. As referências bibliográficas utilizadas para dar embasamento textual ao trabalho são listadas no sétimo capítulo.

A seguir, estão listados os artigos publicados em revistas indexadas e anais de congressos nacionais e internacionais, durante o desenvolvimento do presente trabalho.

**HAKALIN, N.L.S.**; PAZ, A.P.; ARANDA, D.A.G.; MORAES, L.M.P. (2014). Enhancement of cell growth and lipid content of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. by optimizing nitrogen, phosphorus and vitamin concentrations for biodiesel production. Artigo publicado no *Natural Science*, v. 6, p. 1044-1054.

**HAKALIN, N.L.S.**; OLIVEIRA, T.C.S.; MORAES, L.M.P.; ARANDA, D.A.G. (2014). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of microalga *Scenedesmus* sp. Artigo submetido ao *Bioresource Technology*.

**HAKALIN, N.L.S.**; DÍAZ, G.; CRUZ, Y.; ARANDA, D.A.G. (2014). Biodiesel production by use of microalgae cultivated in photobioreactor (PBR) in pilot scale. Artigo submetido ao *Biomass and Bioenergy*.

**HAKALIN, N.L.S.**; MAEDA, R.N.; PEREIRA Jr., N. (2014). Second generation ethanol production from residual biomass of cellulose industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (no prelo).

**HAKALIN, N.L.S.**; BETANCUR, G.J.V.; VASQUEZ, M.P.; BARROS, E.; PEREIRA Jr., N. (2011). Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: Acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation and remaining solid fraction fermentation by SSF process. Artigo publicado no *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 163, p. 928-936.

**HAKALIN, N.L.S.**; PAZ, A.P.; FORTES, M.M.; CRUZ, Y.; DÍAZ, G.; MORAES, L.M.P.; ARANDA, D.A.G. (2013). Biodiesel production by use of microalga cultivated in photobioreactor (PBR) in pilot scale. Trabalho publicado nos anais do *ABO Algae Biomass Summit*, Orlando, FL, EUA.

FORTES, M.M.F.; CRUZ, Y.; DÍAZ, G.; GOMES, M.; CARVALHO, L.; VIÊGAS, C.; **HAKALIN, N.L.S.**; ARANDA, D.A.G. (2013). Microalgae: from PBR cultivation to biodiesel. Trabalho publicado nos anais do *ABO Algae Biomass Summit*, Orlando, FL, EUA.

PAZ, A.P.; **HAKALIN, N.L.S.**; ARANDA, D.A.G. (2013). Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para maximizar a síntese de óleo visando a produção de biodiesel. Trabalho publicado nos anais da XXXV Jornada Giulio

Masarani de Iniciação Científica Tecnológica, Artística e Cultural, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

**HAKALIN, N.L.S;** PAZ, A.P.; ARANDA, D.A.G.; MORAES, L.M.P. (2013). Otimização das concentrações de nitrato, fosfato e vitaminas do cultivo de *Scenedesmus* sp. para maximizar o teor de lipídeos totais. Trabalho publicado nos anais do *IV Congresso Latino Americano de Biotecnologia de Algas & Workshop Rede Nacional de Biotecnologia de Algas Marinhas*, Florianópolis, SC, Brasil.

**HAKALIN, N.L.S;** FORTES, M.M.; CRUZ, Y.; DÍAZ, G.; MORAES, L.M.P.; ARANDA, D.A.G. (2013). Cultivo de *Scenedesmus* sp. em batelada simples, batelada semicontínua e batelada alimentada conduzidas em fotobiorreatores para produção de biodiesel. Trabalho publicado nos anais do *IV Congresso Latino Americano de Biotecnologia de Algas & Workshop Rede Nacional de Biotecnologia de Algas Marinhas*, Florianópolis, SC, Brasil.

**HAKALIN, N.L.S.;** PAZ, A.P.; FORTES, M.M.; GOMES, M.M.R; VIEGAS, C.V.; ARANDA, D.A.G.; MORAES, L.M.P. (2012). Cultivo de *Nannochloropsis oculata* para a produção de biodiesel. Trabalho publicado nos anais do *II Simpósio Brasileiro do Potencial Energético das Microalgas*, Natal, RN, Brasil.

FORTES, M.M.; CRUZ, Y.R.; DÍAZ, G.; GOMES, M.M.R.; CARVALHO, L.; CASSIMIRO, I.M.; **HAKALIN, N.L.S.;** ARANDA, D.A.G. (2012). Desenvolvimento de fotobiorreatores do tipo janela para cultivo de microalgas. Trabalho publicado nos anais do *II Simpósio Brasileiro do Potencial Energético das Microalgas*, Natal, RN, Brasil.

VIÊGAS, C.V.; ARANDA, D.A.G.; FREITAS, S.P.; CRUZ, Y.R.; FORTES, M.M.; GOMES, M.; CARVALHO, L.; DIAZ, G.C.; **HAKALIN, N.L.S.** (2012). Produção de FAMES *in situ* a partir de microalgas. Trabalho publicado nos anais do *II Simpósio Brasileiro do Potencial Energético das Microalgas*, Natal, RN, Brasil.

## **CAPÍTULO 2**

### **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Neste capítulo são apresentados os diferentes aspectos teóricos que tangem a temática abordada na presente tese: o biodiesel, relatando sua inserção e evolução no cenário dos biocombustíveis e as matérias-primas utilizadas com este propósito; a microalga, destacando seu metabolismo de lipídeos; os sistemas de cultivo de microalgas e as principais estratégias de condução para este fim; bem como a extração de óleo microalgáceo e a produção de biodiesel a partir deste.

#### **2.1. BIODIESEL**

O suprimento de energia está na base da estruturação e da dinâmica operacional da sociedade humana nos seus mais diversos aspectos, desde o bem-estar individual até o desempenho industrial e de prestação de serviços. Neste contexto, o petróleo tem tido uma importância ímpar, sendo responsável pelo fornecimento de um terço da energia primária consumida no planeta (SILVA *et al.*, 2011). Alterações no suprimento ou uso desta fonte de energia não renovável teriam desdobramentos econômicos, políticos e sociais importantes para a maior parte das nações.

A sociedade humana depara-se com a escassez e o aumento do preço do petróleo, cuja média de preço do barril foi cotado em R\$ 221,46 em 2013, mais que o dobro da média cotada em 2004 (R\$ 89,21) (ANP, 2014); além disso, as avaliações mais pessimistas afirmam que em cinco décadas chegar-se-ia à sua total depleção. Paralelamente, a combustão crescente de combustíveis fósseis tem gerado, juntamente com o desmatamento, o acúmulo de gases poluentes na atmosfera, particularmente de CO<sub>2</sub>, responsáveis pelo efeito estufa e consequentes alterações climáticas. Esse atual quadro exige mudanças dos padrões de industrialização e de consumo da sociedade humana, de forma a reduzir a emissão de gases de efeito estufa (SILVA *et al.*, 2011).

Embora as “crises de petróleo” anteriores, como a dos anos 1970, responsáveis pelo aumento do preço do petróleo tenham sido episódicas, a conjunção e sinergia dos fatores acima mencionados, indicam uma tendência crescente e irreversível no aumento do preço e na diminuição do seu uso (PEREIRA *et al.*, 2008).

Neste contexto, o interesse na diversificação da matriz energética com fontes de energia renováveis, como os biocombustíveis, está mobilizando internacionalmente e de forma ímpar setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos sobre o tripé de sustentabilidade ambiental, social e econômica.

No cenário dos biocombustíveis, o Brasil tem papel de destaque, pois já vem utilizando por muitas décadas álcool como combustível ou sob a forma de uma mistura contendo de 22 a 25 % de álcool na gasolina. Atualmente, o Brasil produz 28 bilhões de litros de etanol por ano a partir da fermentação do açúcar da cana-de-açúcar, colocando o país em uma posição extremamente favorável internacionalmente em termos de emissão de CO<sub>2</sub> (MAPA, 2014).

A partir dessa experiência com o etanol, o Brasil teve sua segunda e mais ambiciosa iniciativa na área dos biocombustíveis: a produção de biodiesel. O biodiesel apresenta a vantagem de ter quase o mesmo rendimento energético que o óleo diesel de petróleo, enquanto o etanol tem aproximadamente 70 % da densidade energética da gasolina (FERRÉS, 2012).

Na Resolução ANP n° 14 de 11/05/2012, encontra-se delineada a definição de biodiesel como sendo um combustível composto de álquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, produzido a partir de uma reação química entre óleos ou gorduras animais ou vegetais e um álcool, que pode ser o metanol ou o etanol (ANP, 2014).

O biodiesel pode ser utilizado em motores a combustão interna com ignição por compressão, é totalmente miscível em óleo diesel mineral, aumenta a lubricidade do combustível melhorando o desempenho do motor, contribui para a redução da temperatura do planeta, é biodegradável, não é tóxico e ainda proporciona emprego e renda (AHMAD *et al.*, 2011).

Por serem originados dos ácidos graxos lineares, o biodiesel não contém aromáticos, produtos amplamente conhecidos como cancerígenos e presentes nas emissões da queima de óleo diesel mineral, cuja combustão é incompleta. Pela combustão do biodiesel ser mais completa, reduzem-se os teores de monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (CH) não queimados e material particulado (MP). Além disso, o biodiesel é isento de contaminantes como o enxofre (FERRÉS, 2012).

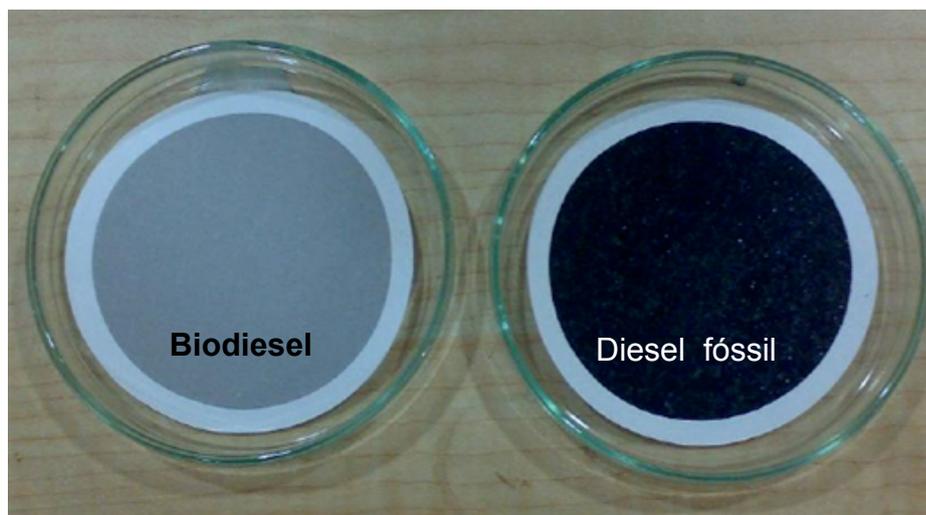
A Tabela 2.1 apresenta o quanto menos (valor negativo) ou o quanto mais (valor positivo) de poluentes são emitidos a partir da queima do biodiesel puro (B100) e de suas diferentes misturas (B5 e B20) em comparação com as emissões provenientes da queima do óleo diesel de petróleo.

**Tabela 2.1.** Emissões de poluentes (%) a partir da queima do biodiesel comparadas com as emissões da queima do óleo diesel de petróleo.

Poluente	B5	B20	B100
CO	-7	-15	-48
CO <sub>2</sub>	-7	-9,5	-78
HC	-5	-20	-67
MP	-8	-15	-47
SO <sub>x</sub>	-5	-20	-100
NO <sub>x</sub>	<1	2 a 4	10 a 20

Elaborado com base em FERRÉS (2012).

Na Figura 2.1, pode se verificar a comparação do estado de filtros de material particulado quando submetidos à passagem de emissões de escapamento com biodiesel e com diesel fóssil. Estes dados mostram claramente os grandes benefícios ambientais consequentes do uso de biodiesel.



**Figura 2.1.** Filtros com materiais particulados de biodiesel e de diesel fóssil.

Fonte: Laboratório GreenTec/UFRJ.

Diante de tantas vantagens, optou-se por incluir o biodiesel na matriz energética brasileira no ano de 2005 através do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel – PNPB – (Lei 11.097/2005), que autorizou a mistura de 2 % de biodiesel B100 no diesel mineral comercializado, nomeado de B2 (ANP, 2014).

No período de 2007 a 2010, este biocombustível se constituiu o produto industrial brasileiro com maior crescimento, quando a mistura obrigatória de 2 % (B2) passou para 5 % (B5). De 2010 até 2013, não ocorreu um crescimento relativo das metas do PNPB, já que grande parte destas foram antecipadas logo nos primeiros anos, como pode ser visualizado na Figura 2.2. Desta forma, o B5 que foi previsto originalmente somente para 2013, foi antecipado em 2010 (FERRÉS, 2012).

Todavia, em maio deste ano (2014), a presidente Dilma Rousseff assinou a medida provisória (MP 647/2014) que aumentou em julho o percentual obrigatório do biodiesel misturado ao diesel, de 5 % (B5) para 6 % (B6), e vai para 7 % (B7) a partir de 1° de novembro deste ano (ANP, 2014).



**Figura 2.2.** Evolução da mistura obrigatória de biodiesel no diesel no PNPB.

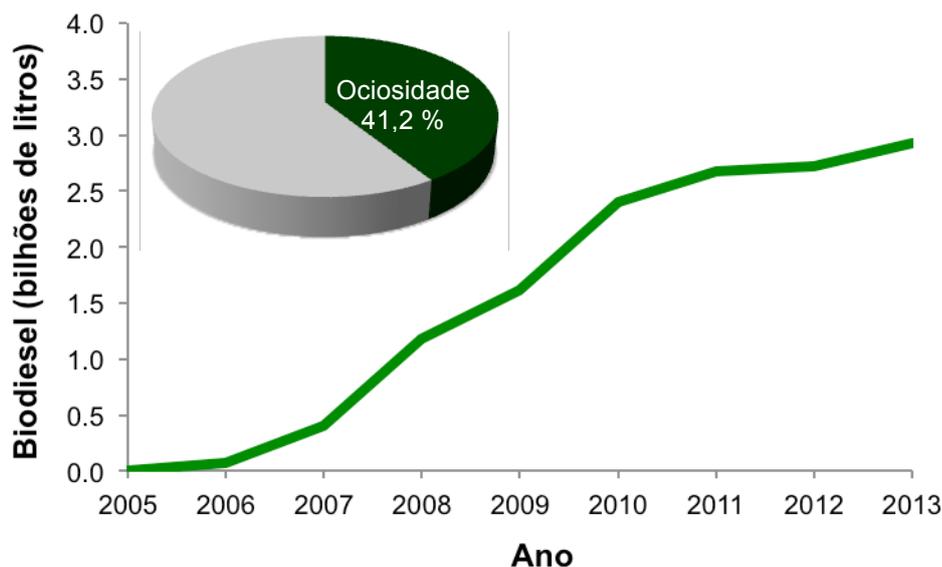
Elaborado com base em FERRÉS (2012).

Os marcos do PNPB foram acompanhados pelo rápido aumento da produção de biodiesel, como pode ser visualizada na Figura 2.3. A produção de biodiesel começou com 736,3 mil litros em 2005, aumentando quase 100 vezes em 2006, passando para 402,18 milhões de litros em 2007 e para 1,17 bilhão de litros em 2008. Como pode ser visualizado, os primeiros anos do programa foram marcados por um grande crescimento. Entretanto, devido à elevada ociosidade (40 - 60 %), o número de unidades produtoras de biodiesel parou de crescer a partir de 2008. Com isso, reduziu-se a taxa de incremento do volume de biodiesel produzido nos anos seguintes, atingindo um valor de 2,92 bilhões de litros em 2013, o que aponta uma curva crescente (ANP, 2014).

Segundo ANP (2014), a produção de biodiesel já alcançou a marca de 2,7 bilhões de litros em julho deste ano e deve chegar a 4,2 bilhões até final do ano.

Após a concepção do PNPB, foram gerados no período de 2005 a 2010 R\$ 4 bilhões de investimentos e 1,3 milhão de empregos nos diversos segmentos do setor, desde a lavoura, passando pelo transporte, unidades produtoras e distribuição, inclusive postos de combustíveis (FERRÉS, 2012).

A inclusão social de agricultores familiares no fornecimento de matérias-primas para a produção de biodiesel é um dos pilares da sustentabilidade social do PNPB e está sendo um modelo inédito no mundo (NOGUEIRA, 2010).



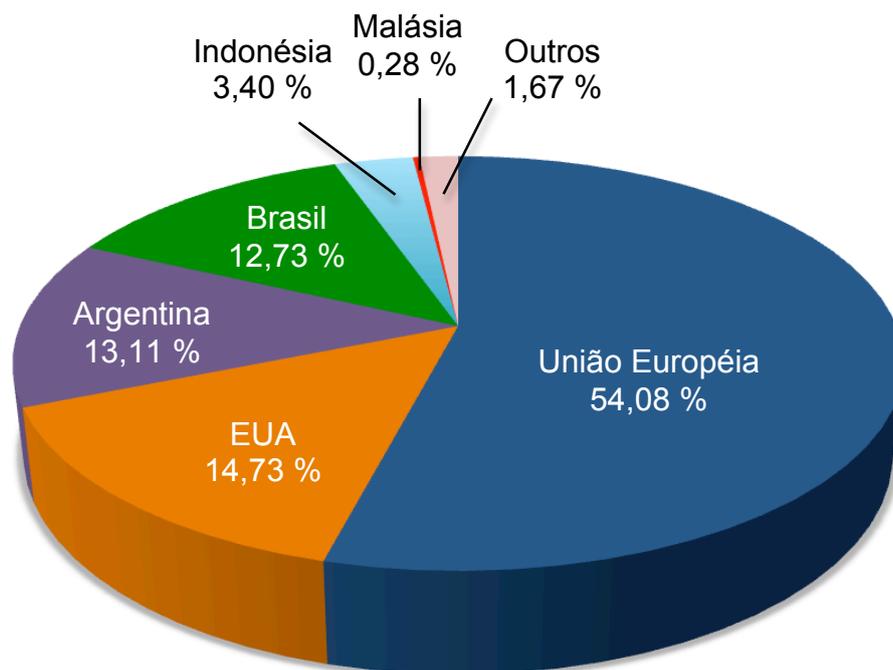
**Figura 2.3.** Produção de biodiesel no Brasil e percentagem de ociosidade das indústrias em 2013 mediante a capacidade total de produção.

Elaborado com base em ANP (2014).

O diesel é o combustível mais utilizado no Brasil, constituindo 57,7 % dos combustíveis líquidos. E sua produção em 2010 foi de 45 bilhões de litros, acrescidos de 9 % importados para suprir a demanda interna. O maior uso do diesel se dá no transporte rodoviário, que representa 75 % do total, seguido do uso agropecuário, com 14 %, e 5 % para geração de energia elétrica nos sistemas isolados. Em termos regionais, o consumo de óleo diesel e biodiesel no Brasil é de 37 % na região Sudeste, 16 % no Sul, 30 % no Nordeste, 9 % no Centro-Oeste e 8 % no Norte (ANP, 2014).

A adição de biodiesel no diesel evitou importações, entre 2007 e 2012, de 11,1 bilhões de litros de diesel, uma economia praticamente de US\$ 8 bilhões em divisas, que contribuiu diretamente nos resultados da balança comercial brasileira do período (FERRÉS, 2012).

Ao analisar a situação brasileira no ranking mundial de produção de biodiesel de 2013, foi detectado que o país teve 12,73 % de participação e ficou atrás da União Européia (54,37 %), dos EUA (14,73 %) e Argentina (13,11 %) (Figura 2.4) (FAPRI, 2014). Estima-se que o Brasil passe para a segunda posição no ranking de 2014, após implementar a mistura de 7 % de biodiesel no diesel (B7) (ANP, 2014).



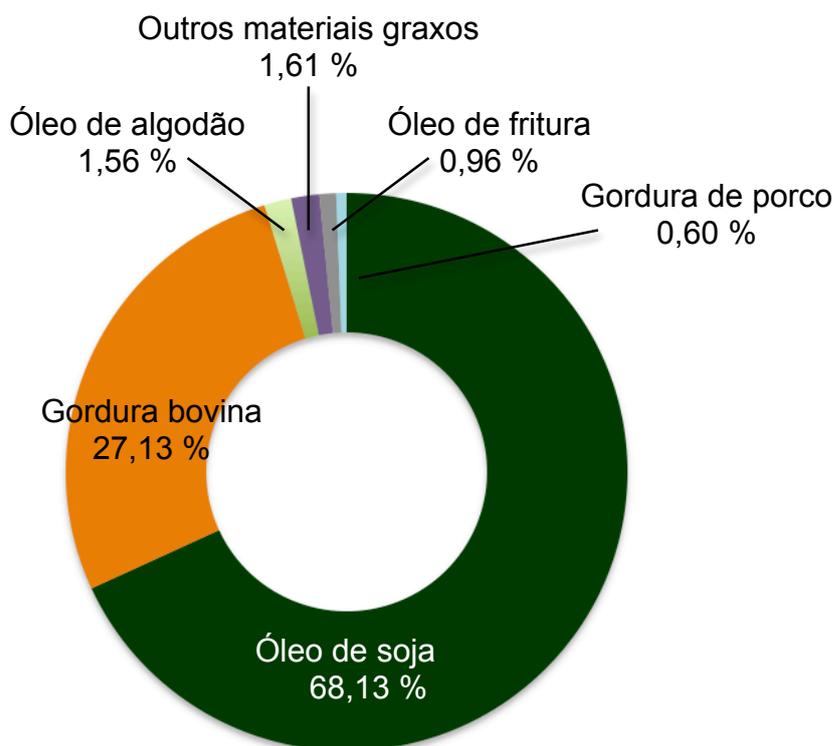
**Figura 2.4.** Participação do Brasil na produção mundial de biodiesel em 2013. Elaborado com base em FAPRI (2014).

### 2.1.1. MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Constituem matérias-primas para a produção de biodiesel os óleos e gorduras. Cerca de 80 % dos óleos produzidos no mundo são oriundos da soja, palma (dendê), girassol e colza (canola) (FERRÉS, 2012).

No Brasil, as principais matérias-primas utilizadas para o biodiesel são o óleo de soja, gordura bovina e óleo de algodão (ANP, 2014). Com menores participações encontram-se o óleo de fritura, gorduras de porco e de frango, óleo de palma, óleo de canola e outros materiais graxos. Dentre os outros óleos que também podem ser empregados, encontram-se os de mamona, amendoim, macaúba, babaçú e camelina (FERRARI *et al.*, 2005).

Todavía, o óleo de soja é a matéria-prima mais utilizada, com participação de aproximadamente 70 %, como pode ser visualizado na Figura 2.5, devido sua abundância e maturidade brasileira em sua produção.



**Figura 2.5.** Matérias-primas utilizadas na produção brasileira de biodiesel em 2013.

Elaborado com base em ANP (2014).

O custo da matéria-prima constitui 75 % do custo total da produção de biodiesel, devendo-se escolher aquela com o melhor custo benefício para assegurar um custo baixo deste biocombustível (AHMED *et al.*, 2011).

O custo da tonelada de grãos de soja encerrou em US\$ 453,29 em julho de 2014, enquanto o custo da tonelada do seu óleo ficou em US\$ 814,73 (ABIOVE, 2014). O preço médio da tonelada de biodiesel atingiu R\$ 2.090 em 2013, enquanto o óleo diesel custou ao consumidor R\$ 2.319/tonelada (ANP, 2014; MAPA, 2014).

Entretanto, uma desvantagem considerável da soja é o fator produção de alimentos *versus* produção de biocombustível, uma vez que a soja é um item importante na matriz alimentícia do Brasil e de outros países (NOGUEIRA, 2010; SCHENK *et al.*, 2008; STUART *et al.*, 2011).

Sob este aspecto, o cultivo de microalgas visando a produção de biodiesel pode ser considerado altamente promissor, devido principalmente às seguintes

vantagens (BARBOSA *et al.*, 2003; BASU *et al.*, 2014; NOGUEIRA, 2010; OLAIZOLA, 2003; RÖSCH *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012):

- ✓ Não requererem terras aráveis, podendo ser cultivada em região desértica e em solo degradado, uma vez que a demanda por terra é utilizada apenas como suporte para o sistema de cultivo;
- ✓ Não competem com a agricultura;
- ✓ Embora cresçam em meio aquoso, consomem menos água do que plantas terrestres e a água residual pode ser reutilizada no processo, reduzindo o consumo global de água doce;
- ✓ Sua produção pode ser realizada durante todo o ano, não seguindo o regime de safras;
- ✓ Apresentam alta produtividade em biomassa e rápido acúmulo de lipídeos, de 10 a 50 % da massa seca de muitas espécies;
- ✓ Podem produzir mais da metade do oxigênio da natureza; seu cultivo não exige a aplicação de herbicidas ou pesticidas;
- ✓ Os nutrientes para seu cultivo podem ser obtidos a partir de águas residuais e resíduos agroindustriais;
- ✓ São eficientes fixadoras de carbono atmosférico, ou mesmo o residual de processos industriais, através da fotossíntese (cada tonelada de biomassa produzida consome 1,83 tonelada de CO<sub>2</sub>, 10 – 20 vezes mais que o absorvido pelas plantas oleaginosas);
- ✓ Podem produzir uma série de outros produtos valiosos além de lipídeos, tais como proteínas, carotenóides e carboidratos, que podem ser utilizados como alimento ou fertilizantes, fermentados para produzir etanol ou outro produto com maior valor agregado.

Não obstante em ter todas estas inúmeras vantagens, o óleo de microalgas é semelhante aos óleos vegetais e sua produção (1 milhão de litros/ha/ano) pode superar a do óleo de palma (5 mil litros/ha/ano) e de soja (450 litros/ha/ano).

Análises financeiras mais otimistas afirmam que o óleo de microalgas pode ser produzido a um custo de US\$ 0,50/L (CHISTI, 2007).

Ao constituir uma fonte de energia limpa a um custo bastante competitivo, a aplicação das microalgas para a produção de biodiesel tem concentrado esforços em pesquisa e inovação nos setores acadêmicos e atraindo o interesse dos investidores privados (HALIM *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2010; HUERLIMANN *et al.*, 2010; JI *et al.*, 2014; SCHENK *et al.*, 2008; STUART *et al.*, 2011).

## 2.2. MICROALGAS

O grupo das microalgas agrupa microrganismos eucariotos e procariotos fotossintetizantes, sendo a grande maioria fitoplanctônica (DERNER *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008). De acordo com a classificação proposta por SIEBURTH *et al.* (1978), o tamanho das microalgas varia entre 20-200  $\mu\text{m}$ . O número de espécies de algas pode exceder os milhões e as microalgas constituem a maior parte (NOWAK & ZIOLEK, 2005).

As microalgas são ubiqüitárias e apresentam características diversas, como: podem ser unicelulares, coloniais e filamentosas; estão distribuídas principalmente nos ambientes aquáticos, desde rios de água doce (90 %) até lagos salgados, mas também são encontradas em solos terrestres; podem ou não apresentar motilidade; podem viver em associação simbiótica, entretanto a maioria é de vida livre; e têm tolerância para uma ampla faixa de pH, temperatura, turbidez e concentração de  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  (LEE *et al.*, 2008).

Este grupo heterogêneo está entre os mais antigos do planeta e constituem a base da cadeia trófica de ecossistemas aquáticos, sendo os principais organismos fotoautotróficos produtores de carbono orgânico nos mares e águas de interiores (CHISTI, Y., 2007; REYNOLDS, 2006).

Estima-se que a contribuição das algas de forma geral no processo de produção do oxigênio estaria em torno de 50 a 60 % (ANDERSEN, 2005).

As três classes de microalgas mais abundantes são as diatomáceas (Bacillariophyceae), as algas douradas (Chrysophyceae) e as algas verdes (classe

Chlorophyceae), esta datada da era proterozóica (3 bilhões de anos atrás) (DEMIRBAS & DEMIRBAS, 2010).

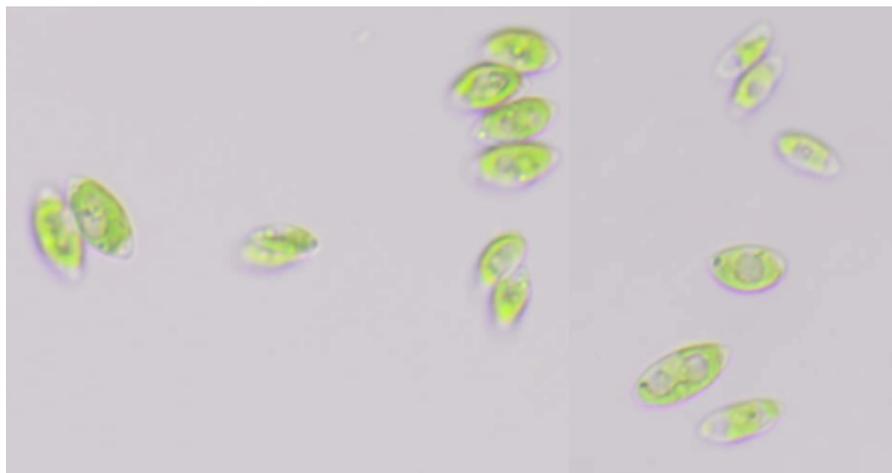
Segundo ROSENBERG *et al.* (2008), as algas verdes ou clorofíceas são as mais promissoras para a produção de biodiesel, sendo os gêneros *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Dunaliella* os mais amplamente utilizados. Todavia, as espécies de *Scenedesmus* e *Chlorella* vem sendo apontadas nos últimos anos como as mais eficientes no processo de fixação de CO<sub>2</sub> acoplado ao tratamento de águas residuais e à síntese de lipídeos para a produção de biodiesel (BLERSCH *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2012; XIN *et al.*, 2010).

Neste sentido, XIN e colaboradores (2011) selecionaram *Scenedesmus* sp. para a produção de óleo e reportaram sua elevada atividade metabólica (10 a 25 % de óleo), capacidade de resistir às severas variações ambientais e resistência às elevadas concentrações de nutrientes de águas residuais.

Sendo assim, *Scenedesmus* constitui uma fonte de óleo extremamente promissora para a produção de biodiesel. Este gênero pertence à família Scenedesmaceae, Ordem Chlorococcales, Classe Chlorophyceae e divisão Chlorophyta (LEE *et al.*, 2008). Possui clorofila a e b, xantofilas (luteína e prasinoxantina) e os carotenóides  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . O produto fotossintético de armazenamento é o amido, que é composto de amilose e amilopectina e, ao contrário de outras algas, é formado dentro do cloroplasto (REYNOLDS, 2006).

*Scenedesmus* é uma alga que comumente forma cenóbios com duas, quatro e oito células, mas também é encontrada como única célula. A morfologia pode variar consideravelmente pela alteração do meio de cultura onde estão crescendo (EGAN & TRAINOR, 1989). Em meio com pouco fósforo ou sais minerais, este gênero é induzido a crescer como única célula, semelhante aos gêneros *Chodatella* e *Franceia*, e quando privado de nitrogênio, podem ocasionalmente formar zoosporos (TRAINOR, 1992).

Na Figura 2.6, pode ser visualizada a morfologia microscópica da microalga *Scenedesmus* sp.



**Figura 2.6.** Morfologia microscópica de *Scenedesmus* sp. cultivada em meio ASM1, 400  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1  $\text{ar min}^{-1}$  e 23 °C.

## 2.2.1. CONDIÇÕES NUTRICIONAIS

A produção de lipídeos e as concentrações de diferentes ácidos graxos em microalgas parecem ser influenciadas principalmente pela composição do meio de cultura. Frequentemente, o aumento no acúmulo de ácidos graxos é descrito como consequência aos efeitos da limitação de nutrientes e do tempo de cultivo (JI *et al.*; 2014; CHELLAMBOLI & PERUMALSAMY *et al.*, 2014; MATA *et al.*, 2010).

Em condições limitantes de crescimento, verifica-se uma queda na divisão celular, na taxa fotossintética e na síntese de proteínas. A energia fotossintética é desviada da divisão celular para o acúmulo de carboidratos e síntese de lipídeos, ocorrendo também um aumento da síntese de enzimas específicas para a absorção de nutrientes (HU *et al.*, 2008; YEH & CHENG, 2012).

Por outro lado, HUERLIMANN e colaboradores (2010) verificaram um aumento do conteúdo de algumas classes lipídicas na fase exponencial de *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* sp. cultivadas no meio de cultura K e sob 250  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Usualmente, as microalgas apresentam uma pequena produção de lipídeos durante a fase exponencial, geralmente polares e poliinsaturados, com um aumento na síntese quando as culturas alcançam a fase estacionária de crescimento, predominando os apolares, produto de reserva (PIORRECK *et al.*, 1984).

Na composição da biomassa microalgácea, além do carbono (C), estão presentes pelo menos 19 elementos químicos. Alguns são necessários em concentrações na ordem de miligramas por litro, como H, N, O, P, S, K, Na, Ca e Mg. Outros podem ser detectados como elementos traços ou micronutrientes e normalmente são requeridos em concentrações de nanogramas a microgramas por litro, como Si, Fe, Mn, Mo, Cu, Co, Zn, B e V. Esses micronutrientes são incorporados em moléculas orgânicas essenciais, como em uma variedade de coenzimas (CoA, cobamamida e etc) que participam de reações primordiais à vida da célula (REYNOLDS, 2006).

Os macronutrientes formam os constituintes estruturais das biomoléculas, da membrana citoplasmática e do meio intracelular, e ainda participam dos processos energéticos e de regulação metabólica. A sua ausência ou insuficiência pode causar danos afetando algumas funções vitais desses microrganismos (LOURENÇO, 2006).

Dentre os nutrientes mais importantes estão o fósforo (P) e o nitrogênio (N), os quais existem no ambiente aquático de diversas formas, como dissolvidos, particulados ou na forma biótica. Entretanto, apenas a forma dissolvida é diretamente disponível para o crescimento das microalgas. Várias espécies ainda necessitam de quantidades ínfimas de compostos orgânicos para o seu crescimento, como as vitaminas (LOURENÇO, 2006).

O fósforo é um importante fator limitante ao crescimento de microalgas, pois é essencial aos processos celulares como transferência de energia (ATP) e biossíntese de ácidos nucleicos, fosfolipídeos, DNA, etc, influenciando na composição da biomassa. O ortofosfato inorgânico ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) é a forma iônica de fósforo de uso preferencial pelas microalgas e sua absorção é dependente de energia. Por isso, esta é a fonte de P mais utilizada nos meios de cultura. Existem outras fontes de fósforo inorgânico que podem ser absorvidas pelas microalgas, como o fosfato diácido ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) e o fosfato ácido ( $\text{HPO}_4^{-2}$ ) que podem ser provenientes do ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (REYNOLDS, 2006).

As vitaminas são compostos orgânicos essenciais ao funcionamento do metabolismo e muitas podem ser encontradas como co-fatores de enzimas, desempenhando a função de coenzimas, que apresentam papéis vitais tanto para manutenção e crescimento quanto para acúmulos de biomoléculas na célula. Dentre elas, encontram-se a biotina, coenzima que catalisa reações de ativação e

transferência de CO<sub>2</sub>; a cobalamina (B12), coenzima que catalisa reações de isomerização e transferência de grupos metil; e tiamina (B1), coenzima que catalisa reações de ativação e transferência de aldeídos (ALBERTS *et al.*, 2010).

Alguns processos biotecnológicos com microalgas almejam alcançar altos rendimentos em biomassa e para isso deve-se escolher os nutrientes e parâmetros físico-químicos adequados, levando em consideração o *habitat* natural das espécies para determinar as necessidades básicas para seu crescimento. Em contrapartida, algumas aplicações biotecnológicas visam condições de estresse para otimizar a biossíntese de biocompostos específicos, como os ácidos graxos. Os fatores de estresse mais estudados são as concentrações de certos nutrientes, intensidade luminosa, temperatura, salinidade e pH. A limitação de nutrientes nos meios de culturas afeta em grandes proporções a composição química das algas, assim como sua taxa de crescimento (RADMANN & COSTA, 2008; YEH & CHENG, 2012).

BEN-AMOTZ (1995) reportou o cultivo comercial de *Dunaliella* sp. para a produção elevada de beta-caroteno em duas etapas: na primeira, utilizou-se fotobiorreatores com excesso de N e baixa salinidade para otimizar a síntese de biomassa; e na segunda, reduziu-se a concentração de N e usou alta salinidade visando otimizar a produção de beta-caroteno.

Em estudos realizados com microalgas cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio, PIORRECK e colaboradores (1984) observaram um aumento no conteúdo lipídico dessas microalgas sem, no entanto, alterar o perfil lipídico e de ácidos graxos. Em culturas de *Chlorella*, nas quais a divisão celular cessou devido à falta de nitrogênio no meio de cultura, o conteúdo lipídico das células aumentou de 28 % para 70 %, coincidente com um decréscimo no conteúdo protéico de 30% para 8% (ROUND, 1973).

As diferentes espécies de microalgas respondem de forma particular às alterações nutricionais no ambiente externo. Porém, um padrão conservado é a capacidade de adaptação que esses organismos apresentam frente a variadas condições. Por exemplo, um estudo realizado por AUBRIOT e colaboradores (2011) demonstrou que o fitoplâncton que crescia num lago com baixa disponibilidade de fosfato era capaz de adaptar-se aos pulsos periódicos deste nutriente, devido a liberação de fezes por animais aquáticos, e regular suas cinéticas de absorção de fósforo. Assim, o crescimento celular ocorre mesmo sem absorção simultânea de

fosfatos, desde que estes sejam previamente acumulados na forma de corpos de polifosfatos (AUBRIOT *et al.*, 2011; YAO *et al.*, 2011).

Atualmente, o nutriente mais utilizado para a realização de estudos fisiológicos de microalgas é o nitrogênio (JI *et al.*, 2014), cuja fonte usualmente utilizada é o nitrato, mas também poderia ser uréia, dentre outras (LI *et al.*, 2011). Por isso, existe uma lacuna na literatura a ser preenchida referente à manipulação do fósforo e, mais ainda, de vitaminas no campo de fisiologia de microalgas. Portanto, faz-se importante o desenvolvimento de mais estudos ecofisiológicos utilizando não somente o nitrogênio mas também o fósforo e as vitaminas (FENG *et al.*, 2011<sup>a</sup>; ZHENG *et al.*, 2012).

### 2.2.2. TIPOS DE CULTIVO DE MICROALGAS

As características de crescimento e a composição das microalgas também são significativamente dependentes do tipo de cultivo, que pode ser fototrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (ANDRULEVICIUTE *et al.*, 2014; AMARO *et al.*, 2011; LIANG, 2013).

O cultivo fototrófico ocorre quando a microalga usa luz, por exemplo a luz solar, como fonte de energia, e carbono inorgânico, por exemplo o CO<sub>2</sub>, como fonte de carbono para produzir energia química através do processo de fotossíntese (HUANG *et al.*, 2010).

Este tipo de cultivo tem um apelo ambiental, uma vez que o dióxido de carbono atmosférico, um dos principais vilões do efeito estufa, pode ser utilizado na produção de biomassa microalgácea para o desenvolvimento de biocombustíveis, o que ocasionaria um balanço energético favorável. Principalmente por este motivo, o cultivo fototrófico é o tipo mais comumente usado para o crescimento de microalgas (MANDAL & MALLICK, 2009; YOO *et al.*, 2010).

MATA e colaboradores (2010) relataram que as microalgas cultivadas fototróficamente podem acumular um teor lipídico de 5 a 60 %, dependendo da espécie.

No entanto, intensidade de luz e suprimento de CO<sub>2</sub> insuficientes são sempre questões problemáticas para o cultivo fototrófico. Em sistemas de cultivos abertos, a

limitação é decorrente principalmente pelo fotoperíodo. Além disso, uma distribuição irregular da intensidade de luz afeta a produtividade em biomassa. Na literatura, raramente são reportadas concentrações finais de biomassa que ultrapassem  $2 \text{ g L}^{-1}$  quando cultivadas com ar atmosférico (AZMA *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2012).

Alguns autores alegam que a suplementação do cultivo de microalgas com mais  $\text{CO}_2$  poderia aumentar as produtividades em biomassa e lipídeos, já que sua concentração na atmosfera é baixa (BASU *et al.*, 2014; ISHIDA *et al.*, 2000; MURADYAN *et al.*, 2004). Entretanto, é importante construir sistemas que impeçam a perda do excesso de  $\text{CO}_2$ . Além disso, deve-se garantir que a concentração de  $\text{CO}_2$  não seja alta suficiente a ponto de prejudicar a produção de lipídeos, pois com o aumento da absorção de  $\text{CO}_2$ , aumentar-se-ia a produção de  $\text{O}_2$ , que atuaria como inibidor das hidrogenases e reduziria, conseqüentemente, a produção de hidrogênio, necessário à produção de lipídeos (SUALI & SARBATLY, 2012).

Algumas espécies de microalgas podem não só crescer sob condições fototróficas, mas também podem utilizar carbono orgânico na ausência de luz. Este caso, no qual as algas usam o carbono orgânico tanto como fonte de energia quanto como fonte de carbono, é chamado de cultivo heterotrófico (LIANG *et al.*, 2013; XIONG *et al.*, 2008).

O cultivo heterotrófico evita problemas associados à limitação de luz e tem apresentado relevantes resultados na produção de biomassa microalgácea, sendo os rendimentos significativamente superiores aos do cultivo fototrófico (HUANG *et al.*, 2010).

XU e colaboradores (2006) obtiveram um aumento de 40 % no teor lipídico quando alterou o tipo de cultivo de *Chlorella protothecoides* de fototrófico para heterotrófico.

A escolha pelo metabolismo heterotrófico é questionada no sentido de ser necessária a adição de uma fonte de carbono orgânica, o que pode acarretar custos elevados se a mesma tiver que ser comprada e, com isso, inviabilizar a produção de biocombustíveis a partir de microalgas. Sendo preferível utilizar fontes orgânicas residuais com custo baixo (FENG *et al.*, 2011<sup>a</sup>; LIANG *et al.*, 2013).

No cultivo mixotrófico, a microalga é submetida à fotossíntese e usa compostos orgânicos e inorgânicos ( $\text{CO}_2$ ) como fonte de carbono para o crescimento. Assim, a microalga está apta a viver tanto em condições fototróficas

quanto em heterotróficas. Ao utilizar compostos orgânicos, a microalga libera CO<sub>2</sub> via respiração e este é absorvido e utilizado sob cultivo fototrófico (MATA *et al.*, 2010).

No cultivo fotoheterotrófico, a microalga requer luz quando usa compostos orgânicos como fonte de carbono. A principal diferença entre o mixotrófico e o fotoheterotrófico é que neste último somente a luz é usada como fonte de energia. Além disso, no fotoheterotrófico a luz e as fontes orgânicas são necessárias ao mesmo tempo. Embora a produção de alguns metabólitos regulados pela intensidade de luz possa ser aumentada em cultivo fotoheterotrófico, a aplicação deste tipo de cultivo para produção de biodiesel é muito rara, assim como o caso de cultivo mixotrófico. Além disso, ambos tipos de cultivo são limitados por risco de contaminação e exigência de luz (SUALI & SARBATLY, 2012).

Na Tabela 2.2 estão sumarizadas as principais características de cada tipo de cultivo.

**Tabela 2.2.** Comparação das características de diferentes tipos de cultivos de microalgas.

	Fototrófico	Heterotrófico	Mixotrófico	Fotoheterotrófico
<b>Fonte de energia</b>	Luz	Orgânica	Luz e orgânica	Luz
<b>Fonte de carbono</b>	Inorgânica	Orgânica	Inorgânica e orgânica	Orgânica
<b>Densidade celular</b>	Baixa	Alta	Média	Média
<b>Tipo de reator</b>	Aberto ou fotobiorreator	Fermentador convencional	Fotobiorreator fechado	Fotobiorreator fechado
<b>Custo</b>	Baixo	Médio	Alto	Alto
<b>Principais desvantagens</b>	Baixa densidade Contaminação em sistema aberto	Alto custo de substrato Risco de contaminação	Alto custo de substrato e equipamento Risco de contaminação	Alto custo de substrato e equipamento Risco de contaminação

Elaborado com base em SUALI & SARBATLY (2012).

No cultivo fototrófico, os lipídeos são produzidos durante todo o ciclo celular das microalgas através da fotossíntese, composta por reações luminosas e reações de fixação de carbono. Nas reações luminosas, a clorofila e outros pigmentos absorvem energia luminosa, empregada na fotólise da água para produção de  $O_2$ ,  $H^+$  e elétrons. Os elétrons fluem nas membranas tilacóides do cloroplasto através de uma série de carregadores, incluindo citocromos e quinonas, e são utilizados na redução de  $NADP^+$  em NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido). Enquanto os prótons são bombeados do lúmen do tilacóide para o estroma do cloroplasto pelas ATP sintases, gerando uma força propulsora para estas enzimas sintetizarem ATP (adenosina trifosfato) a partir de ADP e  $P_i$ . Desta forma, na presença de luz e água, são produzidos ATP e NADPH, liberando  $O_2$  simultaneamente. Nas reações de fixação de carbono, ou ciclo de Calvin, os ATP e NADPH são empregados na condensação de  $CO_2$  a ribulose-1,5-bifosfato para formar 3-fosfoglicerato, reduzido a gliceraldeído-3-fosfato (GAP). O GAP pode ser obtido a partir de compostos orgânicos, pode ser utilizado na formação de carboidratos e outras moléculas, e pode também seguir na rota da glicólise para ser oxidado em ácido pirúvico, que por sua vez é convertido em acetil-CoA (HARDWOOD & JONES, 1989; HU *et al.*, 2008).

A partir da molécula de acetil-CoA e de grupo carboxil derivado do bicarbonato ocorre a produção de malonil-CoA, catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase. A biossíntese de ácidos graxos inicia com o malonil-CoA que é alongado através de reações repetitivas nas quais são adicionados grupos acetil da acetil-CoA, catalisada por um sistema conhecido como ácido-graxo sintase (HARDWOOD & JONES, 1989; HU *et al.*, 2008).

Os ácidos graxos são utilizados na formação dos lipídeos, como os triacilgliceróis. Os triacilgliceróis são compostos por três ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos saturados, mono ou poliinsaturados unidos por uma ligação éster a uma molécula de glicerol (ZEMKE *et al.*, 2010).

SUALI & SARBATLY (2012) associaram o baixo acúmulo de lipídeos no cultivo fototrófico de microalgas, comparando com o heterotrófico, à baixa concentração de grupos acetil, cujo aporte é menor se obtido através da fixação de  $CO_2$ , ao invés de uma fonte orgânica, como a glicose.

### 2.2.3. FONTES PROMISSORAS DE CARBONO ORGÂNICO PARA OS CULTIVOS HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DE MICROALGAS

As principais fontes de carbono aplicadas nos cultivos heterotrófico e mixotrófico são a glicose, o glicerol e o acetato de sódio. A glicose é a fonte de carbono que tem apresentado os melhores resultados para o crescimento heterotrófico (teor lipídico maior que 30 %), porém o glicerol vem surgindo como uma excelente opção para este cultivo, apresentando, além de bons resultados, a possibilidade da reutilização de um subproduto da produção do biodiesel (ANDRULEVICIUTE *et al.*, 2014; FENG *et al.*, 2011<sup>a</sup>; ZHENG *et al.*, 2012).

Diversas fontes alternativas, como águas residuais, melaço de cana e carboidratos hidrolisados, têm sido propostos para aplicação como fontes de carbono para estes tipos de cultivo, sendo sua eficiência ditada pela capacidade de metabolização de cada espécie de microalga (LIANG *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos focam seus esforços na busca por fontes orgânicas mais baratas, como o hidrolisado de milho, ao invés de glicose, utilizado por XU e colaboradores (2006) que alcançaram alta produtividade em biomassa ( $2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e lipídeos ( $932 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) de *Chlorella protothecoides*. As maiores produtividades em lipídeos obtidos com *C. protothecoides* foram reportadas por XIONG e colaboradores (2008),  $3700 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , realizando um cultivo heterotrófico conduzido em batelada alimentada em fermentador de 5 L. Assim, vários trabalhos da literatura relatam produtividades em lipídeos altíssimas quando se realiza cultivo heterotrófico, que pode aumentá-la em até 20 vezes quando comparado com o cultivo fototrófico (XIONG *et al.*, 2008).

Visando a aplicação de outros substratos orgânicos no cultivo heterotrófico, e com isso a diversificação desta matéria-prima, o presente trabalho teve interesse nos resíduos agroindustriais lignocelulósicos, principalmente na biomassa residual da indústria de celulose.

Na produção de celulose, a madeira é processada através de etapas de digestão alcalina, deslignificação, lavagem e depuração, nas quais são gerados inúmeros resíduos, como cavacos residuais, álcali ativo, licor negro e fibras. Todos os resíduos, exceto os cavacos residuais, são direcionados para os sistemas de decantação, onde o resíduo líquido é separado dos sólidos, que constituem a

biomassa residual. Nesta biomassa encontram-se todas as fibras refugadas de algumas etapas da produção de celulose, ou seja, fibras que não têm qualidade requerida para constituir a pasta de celulose ou papel e, por isso, são descartadas (ARACRUZ, 2010).

Por ser uma biomassa lignocelulósica, a biomassa residual da indústria de celulose é constituída por: celulose, um homopolissacarídeo linear formado por unidades de  $\beta$ -D-glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e por ligações hidrogênio; hemicelulose, um heteropolissacarídeo formado principalmente por xilose, arabinose, manose e glicose; e lignina, uma macromolécula de alcoóis aromáticos, que unida a hemicelulose envolve a celulose e a protege de ataques físicos e microbiológicos (ARANTES & SADDLER, 2010; SUN & CHENG, 2002).

Nos processos de aproveitamento da celulose de materiais lignocelulósicos residuais, como o bagaço de cana, normalmente é necessária a realização de pré-tratamentos que visam, principalmente, a remoção da hemicelulose e da lignina. E em seguida, deve-se hidrolisar a celulose para disponibilizar os monômeros de glicose a serem utilizados pelo microrganismo. A hidrólise da celulose pode ser catalisada por um complexo enzimático chamado de celulases. As celulases são compostas por: endoglicanase, que ataca as regiões de baixa cristalinidade da fibra celulósica, criando extremidades livres na cadeia; exoglicanase ou celobiohidrolase, que degrada ainda mais a molécula através da remoção das unidades de celobiose das extremidades livres da cadeia; e  $\beta$  – glicosidase, que hidroliza as celobioses, liberando moléculas de glicoses (SILVA *et al.*, 2011).

Todavia, no aproveitamento da biomassa residual da indústria de celulose poderia ser realizado apenas uma hidrólise com celulases para disponibilizar as moléculas de glicose, sem submeter esta biomassa à pré-tratamentos. Isto confere uma grande vantagem frente a outras biomassas lignocelulósicas residuais, pois acarreta uma brusca redução de custos.

Contudo, a respectiva biomassa residual constitui uma fonte promissora de açúcares para o cultivo heterotrófico de microalgas visando a produção de biodiesel, mas ainda não foi empregada com este propósito.

Vale ressaltar a necessidade de translocar qualquer biomassa residual de sua posição de resíduo para a de matéria-prima, visando tanto a redução dos impactos ambientais quanto o desenvolvimento economicamente viável. E, ao se pensar em

empregar carboidratos residuais, logo com custo reduzido, em cultivos heterotróficos de microalgas, acopla-se mais uma vantagem a esta fonte promissora de energia renovável.

### 2.3. SISTEMAS DE CULTIVOS DE MICROALGAS

Os sistemas de cultivo de microalgas foram desenvolvidos durante as primeiras décadas do século XX. Os sistemas de cultivo em larga escala comumente empregados são do tipo “open ponds” ou pista aberta (Figura 2.7), onde tanques de tamanhos variados são mantidos a céu aberto, expostos às condições naturais de iluminação, temperatura, evaporação e contaminação. Estes tanques geralmente são rasos, construídos em concreto, fibra de vidro ou policarbonato, com fundo de terra ou revestidos com material plástico, onde as culturas são mantidas em circulação constante (RAWAT *et al.*, 2013).



**Figura 2.7.** Sistemas de cultivo aberto e fechado (GREENWELL *et al.*, 2010).

Outro sistema mais sofisticado de cultivo que vem sendo desenvolvido é o fotobiorreator, um sistema fechado (Figura 2.7). Estes equipamentos são construídos geralmente com tubos plásticos, vidro ou policarbonato, distribuídos em painéis de forma achatada ou em serpentinas. Um aspecto muito interessante dos fotobiorreatores é a possibilidade de controlar as condições de cultivo. Dessa forma, a concentração de nutrientes, temperatura, luz e pH podem ser ajustados para a obtenção de maior biomassa em um espaço de tempo menor, alcançando-se

produtividade muito maior quando comparado com os sistemas abertos (RAWAT *et al.*, 2013).

Nos sistemas abertos, alcançam-se produções próximas de 180 toneladas/ha/ano, sofrendo concorrência natural dos outros microrganismos no meio de cultivo. Ainda mais expressiva é a produção em fotobiorreatores fechados, que proporciona volumes maiores, às vezes superiores a 1.500 toneladas/ha/ano, em virtude de poder otimizar o ambiente com luminosidade, temperatura e pH propícios para o crescimento da população de microalgas. Na atualidade, 95 % do total de produção de microalgas são realizados nos sistemas abertos, em torno de 20.000 toneladas de microalgas/ano, volume ainda incipiente quando se trata de biocombustíveis (FERRÉS, 2012).

Um estudo realizado por CHISTI (2007) corrobora as vantagens da produção de microalgas em fotobiorreatores, em detrimento aos tanques de recirculação. Tomando como base de cálculo a produção de 100 toneladas de biomassa para os dois sistemas, com mesma absorção de CO<sub>2</sub>, a produtividade volumétrica de fotobiorreatores é 13 vezes maior que a de tanques. A necessidade de área também favorecem aos fotobiorreatores, que é aproximadamente 30 % inferior, assumindo uma produtividade similar entre os dois equipamentos. Os custos de separação também é uma vantagem dos sistemas fechados, pois o cultivo é 30 vezes mais concentrado que nos tanques de recirculação, portanto a separação da biomassa da água é facilitada (MOLINA *et al.*, 2003).

O custo estimado de produção para cada quilograma de biomassa é US\$ 2,95 e US\$ 3,80 para fotobiorreatores e tanques de recirculação, respectivamente. Esses valores não contabilizam os custos de fornecimento do CO<sub>2</sub>, que poderia ser obtido a custo zero. Se a capacidade anual de produção de biomassa ultrapassar 10.000 toneladas, os custos de produção por quilograma reduzem para US\$ 0,47 e US\$ 0,60, para fotobiorreatores e tanques de recirculação, respectivamente, por causa da economia de escala (CHISTI, 2007).

Entretanto, os fotobiorreatores têm várias desvantagens que necessitam ser consideradas e abonadas, como a dificuldade de ampliação, deterioração do material transparente utilizado, alto custo de construção (investimento 10 vezes maior que do tanque aberto) e possíveis danos às células pelo estresse de cisalhamento (BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010).

## 2.4. FORMAS DE CONDUÇÃO DE CULTIVOS MICROALGÁCEOS

Existem inúmeras formas de se conduzir um cultivo de microalgas, seja em sistemas abertos ou fechados, em cultivos fototrófico, mixotrófico ou heterotróficos. Dentre elas, destacam-se o processo descontínuo simples, o semicontínuo, o descontínuo alimentado e o contínuo.

O processo descontínuo simples, também designado como batelada simples, é aquele no qual são adicionados ao biorreator o meio de cultura e o inóculo de microalga, simultaneamente ou não. E após um determinado tempo, termina-se o cultivo e separa-se a biomassa do meio. Para o caso de se utilizar sistemas fechados com o propósito de manter a cultura estéril, esta forma de condução é a mais segura (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

No processo semicontínuo (batelada semicontínua), adiciona-se o inóculo de microalga e o meio de cultura no biorreator e aguarda-se o fim do crescimento. Em seguida, retira-se parte do cultivo (30 a 60 %, por exemplo), mantendo-se no reator o restante da cultura, que constituirá o inóculo da próxima batelada. Para a segunda batelada, adiciona-se ao reator um volume de meio igual ao volume retirado, enquanto a parte retirada é encaminhada para o processo de separação ou sua aplicação direta. Após isso, espera-se o fim do crescimento das microalgas na segunda batelada e repete-se o ciclo de produção, até quando as células apresentarem um rendimento satisfatório. Nesta forma de condução se busca evitar o preparo de um novo inóculo para cada batelada, o que sempre significa custo adicional para o processo, além de significar também um certo tempo para obtenção do inóculo, bem como o consumo de nutrientes para isto (SANTOS *et al.*, 1992; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O processo descontínuo alimentado, ou batelada alimentada, é definido como uma técnica que adiciona um ou mais nutrientes durante o cultivo e em que o produto, neste caso a biomassa, permaneça no reator até o final do crescimento. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo; pode ainda ser feita de forma contínua ou intermitente, sendo conhecida como batelada alimentada contínua ou por pulsos, respectivamente. No final do cultivo, retira-se toda a cultura e a direciona para outros processos, como o de separação. Esta forma de condução

diferencia-se da semicontínua por não manter no biorreator parte da cultura a ser utilizada como inóculo no próximo cultivo (SCHMIDELL *et al.*, 2001; YAMANE & SHIMIZU, 1984).

O cultivo em batelada contínua caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de cultivo mantido através da retirada contínua de biomassa. A manutenção de volume constante no biorreator é de primordial importância, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, no qual a concentração de células e de substrato limitante permaneça constante ao longo do tempo de operação, que é limitado pela viabilidade das células (FACCIOTTI & SCHMIDELL, 1995; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

É claro que existem inúmeras particularizações e possibilidades de alteração das variáveis destas formas de condução de cultivos de microalgas, as quais possibilitam uma grande flexibilidade de operação.

## **2.5. LIPÍDEOS DE MICROALGAS E SUA EXTRAÇÃO**

O perfil lipídico entre as microalgas marinhas e de água doce apresenta semelhanças, variando nas proporções de cada ácido graxo. Os ácidos graxos compreendem a maior fração de lipídeos, entre 25 a 60 % dos lipídeos totais. O conteúdo lipídico nesses organismos varia em média entre 10 a 40 % em certas condições, podendo alcançar mais de 50 % do peso seco. Todavia, encontra-se nos casos com maiores teores lipídicos uma baixa produção de biomassa, sendo necessário otimizar as condições que favoreçam ambas variáveis, altas densidades de células e teores de lipídeos (CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010).

Os lipídeos neutros estocam energia para a célula, enquanto os lipídeos polares, glicolipídeos e os fosfolipídeos são partes estruturais de membranas celulares, além de participarem de atividades de modulação. A maioria dos lipídeos neutros é triacilglicerol e ácido graxo livre, podendo representar até 80 %. A síntese de ácidos graxos nas microalgas é inicialmente dirigida à formação das membranas celulares, organelas, cofatores enzimáticos, transportadores, mensageiros intracelulares e lipídeos de reserva. Mas, como já foi citado, o conteúdo lipídico pode

variar de acordo com a espécie, nutrição, época e estágio de crescimento da alga (DERNER *et al.*, 2006; NARENDRA *et al.*, 2010).

Em espécies marinhas, as maiores frações são constituídas de ácidos graxos poliinsaturados, em especial, o ácido aracdônico e o ácido eicosapentaenóico. Os ácidos graxos poliinsaturados (Polyunsaturated Fatty Acids – PUFA) também estão presentes em microalgas de água doce em proporções menores, além dos moinsaturados (MUFA) e saturados (SAFA). No entanto, é importante ressaltar que o meio marinho é mais complexo do que o de água doce. Além disso, espécies diferentes podem se comportar diferentemente também na produção de lipídeos, sendo necessários estudos com um número maior de espécies que possibilitem uma melhor comparação dos resultados com linhagens de água doce (ROUND, 1973; HUERLIMANN *et al.*, 2010).

Dentre os vários ácidos graxos de microalgas, os comercialmente relevantes são os PUFA's essenciais, como ácido linoléico (18:2), linolênico (18:3), araquidônico (20:4) e eicosapentaenóico (20:5). Alguns dos ácidos graxos de microalgas com potencial para utilização na produção de biodiesel são: palmítico (16:0), esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), linoléico (18:2), undecaenóico (11:0), duodecaenóico (12:0), cis-eicoesaenóico (20:1) e heptadecaenóico (17:0) (RAWAT *et al.*, 2013).

Embora todas as etapas de produção de microalgas citadas anteriormente sejam essenciais, a escolha do método de extração dos lipídeos, localizado no interior da célula, é de fundamental importância para aumentar a eficiência do processo como todo (LEE *et al.*, 2010).

Devido à solubilidade dos lipídeos em solvente, a seleção deste deve atender à alguns requisitos, como: possuir seletividade para separar o óleo de materiais indesejáveis; baixa toxicidade; fácil recuperação sem deixar resíduos no óleo; imiscibilidade em água; e apresentar ponto de ebulição que favoreça sua posterior eliminação. Solventes como hexano, metanol, etanol e misturas de clorofórmio:metanol, etanol:hexano, clorofórmio:metanol:água e etanol:hexano:água são comumente utilizados para extração lipídica de microalgas. A fração lipídica extraída pode mudar seu conteúdo e composição de acordo com a polaridade do solvente (D'OCA *et al.*, 2011; KING *et al.*, 2002).

Vários métodos de rompimento celular podem ser utilizados para ruptura da parede celular, incluindo processos mecânicos, tais como moinhos e ultrassom, e não mecânicos, incluindo choque osmótico, autoclave, hidrólise enzimática, ácida e alcalina (SING *et al.*, 2010).

Os trabalhos reportados na literatura relatam o uso de diferentes solventes orgânicos associados ou não à diferentes métodos de rompimento celular. LEE e colaboradores (2010) reportaram o efeito de diferentes métodos de extração lipídica sobre as microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *Botryococcus* sp. Entre os resultados obtidos na extração com clorofórmio:metanol (1:1) associado ao uso de autoclave, triturador, micro-ondas, sonicador e solução de NaCl 10 %, as maiores produtividades alcançadas com as três espécies foram com o método associado a micro-ondas, equivalentes à 7,4 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. e 10,2 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para *Botryococcus* sp.

## 2.6. TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS

O processo de produção de biodiesel que ainda predomina é a transesterificação. A transesterificação consiste numa reação catalítica de triacilgliceróis (TAG) com álcoois de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, formando ésteres (metílicos ou etílicos) de ácidos graxos, constituintes do biodiesel, e glicerina. Estequiometricamente, para cada três mol de álcool e um mol de TAG são produzidos três mol de ésteres e um glicerol (LAM & LEE, 2012).

Para o processo de transesterificação, geralmente, faz-se necessário uma etapa prévia de extração do óleo onde se encontram os triacilgliceróis, podendo esta etapa ser conduzida simultaneamente a de transesterificação, conhecida como transesterificação *in situ*, mas que requer biomassa seca. Existem restrições quanto à qualidade dos óleos ou gorduras a serem utilizados neste processo, tais como baixas acidez e umidade, pois os catalisadores comumente utilizados neste tipo de reação, tais como hidróxidos ou metóxidos de sódio ou potássio, também são reagentes da reação de saponificação formando sabões de ácidos graxos. Estes sabões consomem o catalisador utilizado, reduzem a eficiência catalítica, aumentam

a viscosidade e acrescentam um maior grau de dificuldade à purificação (MA & HANNA, 1999; ZHANG *et al.*, 2010).

Uma via alternativa de obtenção dos ésteres que compõe o biodiesel é a hidroesterificação, um processo que envolve uma etapa de hidrólise, que consiste numa reação química entre o óleo e a água, gerando-se glicerina e ácidos graxos, seguida de uma etapa de esterificação, na qual os ácidos graxos reagem com um álcool produzindo éster mais água (HALIM *et al.*, 2012).

Neste processo, podem ser empregadas matérias-primas com qualquer teor de acidez e umidade, como biomassa úmida de microalgas; obtém-se uma glicerina mais pura que a da advinda da transesterificação; o biodiesel é gerado com elevada pureza, sem necessidade de etapas de lavagem que geram efluentes e elevado consumo de compostos químicos; e a água, subproduto, pode ser reutilizada no processo de hidrólise (ARCEO, 2012; SANCHEZ *et al.*, 2011).

Através da reação de saponificação dos triacilgliceróis e ácidos graxos livres presentes na biomassa microalgácea também chegar-se-ia ao biodiesel, após etapa de acidulação da fase saponificável seguida da esterificação dos ácidos graxos (HALIM *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2005). Neste processo, também podem ser empregadas matérias-primas com alto teor de acidez e umidade. O biodiesel é gerado com elevada pureza, sem necessidade de etapas de lavagem que geram efluentes e elevado consumo de compostos químicos; e a água, subproduto, pode ser reutilizada no processo de saponificação (HALIM *et al.*, 2012).

O metanol e o etanol podem ser utilizados tanto na extração quanto na hidroesterificação, transesterificação, transesterificação *in situ* e saponificação/esterificação. O álcool pode atuar tanto como solvente extrator e quanto como agente de (trans)esterificação. Há uma preferência pelo metanol, principalmente em outros países, devido suas vantagens técnicas e econômicas. Por exemplo, a quantidade de metanol consumida por 1000 L de biodiesel é de 90 Kg e o excesso recomendável durante o processo é de 100 %. Enquanto que para o etanol, o consumo fica em 130 Kg por 1000 L de biodiesel e o excesso recomendável em 600 %. Entretanto, no Brasil, por existir uma grande oferta de álcool etílico, há maior viabilidade de se optar pela rota etílica do que a metílica, tendo em vista suas vantagens ambientais consideráveis (MEHER *et al.*, 2006).

ARCEO (2012) comparou as propriedades do biodiesel obtido a partir de *Nannochloropsis oculata* com a norma padrão de qualidade para biodiesel e diesel segundo o método ASTM. E o biodiesel de microalga atendeu aos parâmetros de qualidade como ponto de fulgor, ponto de solidificação, ponto de filtração a frio e acidez, não atendendo apenas na viscosidade, que ficou um pouco mais alta que a faixa ASTM, conforme a Tabela 2.3.

**Tabela 2.3.** Comparação das propriedades do biodiesel de microalga e diesel convencional com o padrão do método ASTM para biodiesel.

PROPRIEDADE	BIODIESEL DE MICROALGA	DIESEL	PADRÃO ASTM
Densidade (Kg/L)	0,864	0,838	0,86-0,90
Viscosidade (mm <sup>2</sup> /s a 40°C)	4,8	1,9- 4,1	3,5-5,0
Ponto de fulgor (°C)	138	75	Min 100
Ponto de solidificação (°C)	-12	-50 a -10	-
Ponto de filtração a frio (°C)	-11	-3,0 (max -6,7)	verão max 0 inverno max < -15
Acidez (mg KOH/g)	0,374	max 0,5	max 0,5
Aquecimento (MJ/kg)	41	40 – 45	-
Taxa H/C	1,81	1,81	-

Elaborado com base em ARCEO (2012).

As microalgas parecem ser a única fonte renovável para produção de biodiesel com capacidade de suprir a demanda global de combustíveis no setor de transporte. No caso do Brasil, é estimada a produção de 29,5 milhões de toneladas de biodiesel para a substituição de todo o diesel utilizado em transporte por ano. Considerando a soja como matéria-prima, seria necessária a ampliação do cultivo em 63 milhões de hectares para atender esta necessidade, enquanto utilizando-se microalgas cultivadas em fotobiorreatores, poderia utilizar apenas 55 mil ha para a mesma produção (PÉREZ, 2007).

Além do biodiesel, as microalgas podem fornecer diversos tipos de biocombustíveis renováveis, como por exemplo: o metano produzido a partir de

digestão anaeróbica de sua biomassa; o biohidrogênio produzido durante a fotossíntese; e o bioetanol produzido a partir de seus carboidratos (CHISTI, 2007).

É fato conhecido que as microalgas podem ser uma alternativa para obtenção de ácidos graxos para o consumo humano, visto que são grandes produtoras de  $\omega$ -3 (BARCLAY *et al.* 1994). Muitas algas produzem ácidos graxos de cadeia longa (> C:18) e apresentam mais de 20 % dos seguintes ácidos graxos: eicosapentanoico (EPA), docosahexanoico (DHA) e aracdônico (AA), que são de grande interesse da indústria alimentar. Os PUFA's da série  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 como o EPA, o DHA e o AA também são considerados farmacologicamente importantes desde o ponto de vista dietético até o terapêutico (HARWOOD & GUSCHINA, 2009). Segundo SPOLAORE *et al.* (2006), as microalgas possuem composição nutricional próxima a dos alimentos convencionais que afetam positivamente a saúde. E pela quantidade de proteínas presentes em várias espécies podem ser consideradas como fontes destas biomoléculas.

Dentro deste contexto, a microalga passou a ser utilizada no início na década de 60, quando espécies de *Chlorella* e *Spirulina* foram produzidas para serem suplementos dietéticos, enquanto *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* eram utilizadas como fontes de  $\beta$ -caroteno e astaxantina (BENEMAN, 1990).

Nas últimas décadas, ampliou-se a aplicação das microalgas na aquicultura, introduzida como alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos e crustáceos (DERNER *et al.*, 2006; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Além das aplicações citadas, muitas pesquisas vêm sendo realizadas em outros campos, tais como: no tratamento de águas residuais de processos industriais; para a detoxificação biológica e remoção de metais pesados; como bioindicadores de nutrientes e substâncias tóxicas (detergentes, efluentes industriais, herbicidas, etc.); na agricultura, como biofertilizante do solo; e no emprego de moléculas bioativas com propriedades antibióticas, anticâncer, anti-inflamatórias, antivirais, redutoras do colesterol, enzimáticas e com outras atividades farmacológicas (DERNER *et al.*, 2006).

Contudo, a humanidade passou a utilizar as microalgas na solução de inúmeros problemas através de sua aplicação direta ou do uso de suas biomoléculas de alto valor agregado do ponto de vista ambiental, social e econômico.

## **CAPÍTULO 3**

### **3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

Neste capítulo é apresentada a justificativa para o desenvolvimento do presente trabalho, assim como o objetivo geral do trabalho e os objetivos específicos idealizados para que esse fosse alcançado.

#### **3.1. JUSTIFICATIVA**

Petróleo, gás natural e seus derivados representam 55 % do consumo mundial de energia. São esses combustíveis que permitem a existência dos meios de transporte rápidos e eficientes que temos hoje, bem como boa parte das atividades industriais. Lamentavelmente, a previsão de durabilidade para as fontes de petróleo não ultrapassa mais do que cinco décadas; a segurança do abastecimento é problemática para muitos países que os importam; e o seu uso é a principal fonte dos gases poluentes que estão provocando mudanças climáticas a nível global (SILVA *et al.*, 2011).

É preciso, pois, encontrar substitutos para esses combustíveis. Nada mais racional do que produzi-los com base em matéria orgânica renovável (biomassa), da

qual, no passado distante, os combustíveis fósseis foram originados. Uma das opções é o biodiesel, um excelente substituto para o diesel, que é o combustível mais utilizado do Brasil.

Dentro desta panorâmica, torna-se evidente a importância do desenvolvimento de processos de produção de biodiesel a partir do óleo de microalgas, cujas vantagens em relação à soja, principal matéria-prima utilizada para o biodiesel, são: não requerem terras aráveis (BARBOSA *et al.*, 2003); não competem com a agricultura (OLAIZOLA, 2003); sua produção não segue regimes de safra (BARBOSA *et al.*, 2003); fixam CO<sub>2</sub> de 10 a 20 vezes mais (cada tonelada de biomassa produzida consome 1,83 tonelada de CO<sub>2</sub>); sua produção de óleo (1 milhão de litros/ha/ano) supera a da soja (450 litros/ha/ano); e ainda pode ser produzido a um custo bastante competitivo (US\$ 0,50/L) (CHISTI, 2007).

Dentre as alternativas de microalgas, muitos trabalhos reportados na literatura apontam o gênero *Scenedesmus* como o mais promissor para a captação de CO<sub>2</sub> acoplada com o tratamento de águas residuais visando a produção de biodiesel, devido à sua resistência às condições ambientais severas, nas quais aumentam sua atividade metabólica em direção ao acúmulo de óleo. Entretanto, tais trabalhos indicam a necessidade de otimizar o cultivo de *Scenedesmus* sp. a fim de maximizar a produtividade em lipídeos e, com isso, reduzir os custos da produção de biodiesel a partir de sua biomassa (BASU *et al.*, 2014; BLERSCH *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2012; XIN *et al.*, 2010).

### 3.2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a utilização de seu óleo na produção de biodiesel.

Para alcançar o objetivo descrito, alguns objetivos específicos foram definidos:

- ✓ Otimizar as concentrações de nitrato, fosfato e vitaminas do meio ASM1, utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp. SCIB-01, com o propósito

de mensurar os efeitos destas variáveis sobre a densidade celular, o teor de lipídeos e a produtividade em lipídeos totais, maximizando tais respostas simultaneamente e validando as melhores condições estabelecidas;

- ✓ Avaliar diferentes meios de cultura no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp., comparando seus efeitos sobre a produtividade em biomassa e lipídeos e determinando qual o melhor para este propósito;
- ✓ Avaliar os cultivos fototrófico, mixotrófico e heterotrófico de *Scenedesmus* sp. visando maximizar sua produção em biomassa e lipídeos;
- ✓ Obter glicose a partir da biomassa residual da indústria de celulose e empregá-la no cultivo heterotrófico de *Scenedesmus* sp., comparando o efeito da fonte de carbono orgânico residual com o da glicose comercial sobre a produção de biomassa e lipídeos;
- ✓ Desenvolver o escalonamento do cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp. da escala laboratorial para a escala piloto, empregando fotobiorreatores de 1.100 L, a fim de analisar os gargalos nesse escalonamento e avaliar se a produção de biomassa atenderia à produção de biodiesel em escala piloto;
- ✓ Comparar a performance da microalga nos cultivos em fotobiorreatores de 1.100 L conduzidos em batelada simples, semicontínua e alimentada, selecionando a melhor forma de condução;
- ✓ Produzir biodiesel por transesterificação, hidroesterificação e saponificação/esterificação a partir da biomassa de *Scenedesmus* sp. produzida em fotobiorreatores de 1.100 L, avaliando os perfis de FAME obtidos.

## ***CAPÍTULO 4***

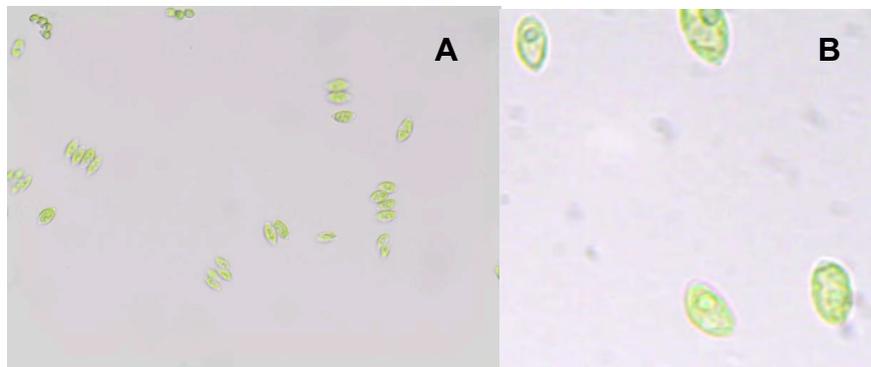
### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados para o desenvolvimento da pesquisa e as diferentes metodologias empregadas em cada experimento realizado.

#### **4.1. MICRORGANISMO**

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a linhagem da microalga *Scenedesmus* sp. SCIB-01, gentilmente cedida pelo Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ. Esta microalga foi coletada na Lagoa de Ibirité (20° 01' 19"S 44° 03' 32"O), Minas Gerais, e isolada pelo LETC em 2011; classificada pelo Departamento de Botânica do Museu Nacional/UFRJ; e preservada na coleção de culturas de microalgas do LETC.

Na Figura 4.1, observa-se o aspecto microscópico de *Scenedesmus* sp. visualizada em microscópio óptico (Olympus, modelo SC30) a um aumento de 400x e 1000x.



**Figura 4.1.** Aspecto microscópico de *Scenedesmus* sp. a um aumento de 400x (A) e 1000x (B) após 4 dias de cultivo em meio ASM1, sob  $400 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ L de ar min}^{-1}$  e  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 4.2. MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram: ASM1 original (GORHAM *et al.*, 1964); ASM1 com as concentrações de nutrientes modificadas de acordo com a otimização realizada no presente trabalho, denominado de ASM1-O; BG11 original (BG11-N) (ALLEN & STANIER, 1969); BG11 contendo ureia (BG11-U); e BBM (BOLD, 1949). Todos os meios de cultura tiveram seu pH inicial ajustado para 8,0.

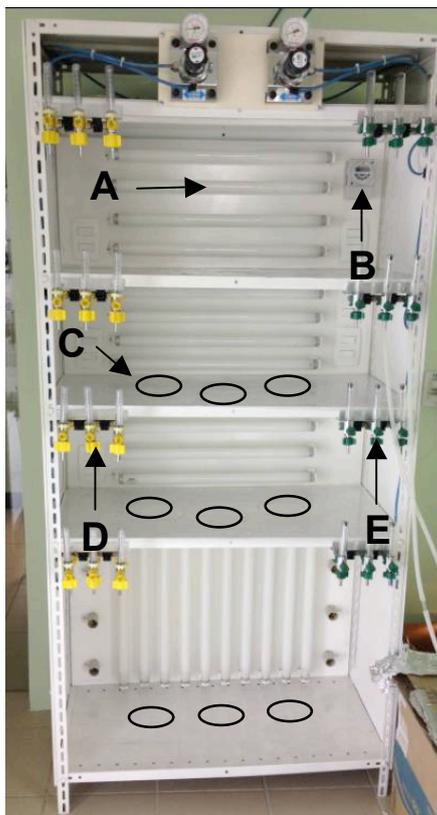
O meio ASM1 original consistiu em ( $\text{mg L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$ , 170;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 49;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 41;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 29;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 17,4;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 35,6;  $\text{FeCl}_3$ , 0,65;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2,48;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,39;  $\text{ZnCl}_2$ , 0,33;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,049;  $\text{CuCl}$ , 0,0014;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 8,24.

O meio BG11-N foi composto por ( $\text{mg L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$ , 1.500; ácido cítrico, 6; citrato férrico, 6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 75;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,22;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,079;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 36;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 40;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2,86;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,81;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,049;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,31;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 20;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1. E o meio BG11-U consistiu em ( $\text{mg L}^{-1}$ ):  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ , 140;  $(\text{NH}_2)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 14; ácido cítrico, 6; citrato férrico, 6;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,22;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,079;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,017;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 75;  $\text{FeCl}_3$ , 6;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,04;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,39;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2,85;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.

Enquanto o meio BBM foi composto por ( $\text{mg L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$ , 250;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 175;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 75;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8,82;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1,59;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4,98;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 75;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 25;  $\text{NaCl}$ , 25;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,44;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,49;  $\text{MoO}_3$ , 0,71;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 11,42;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 50.

### 4.3. PRESERVAÇÃO DE *Scenedesmus* sp.

Após o recebimento da cepa de origem, 5 mL da cultura foi inicialmente propagada em sistemas de cultivo de 250 mL (Figura 4.A) com 195 mL de meio ASM1. Em seguida, os sistemas foram colocados em estante de cultivo (Figura 4.2) e submetidos a uma intensidade luminosa de  $400 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 horas, aeração de  $1,0 \text{ L}$  de ar  $\text{min}^{-1}$  e temperatura de  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 4 dias.

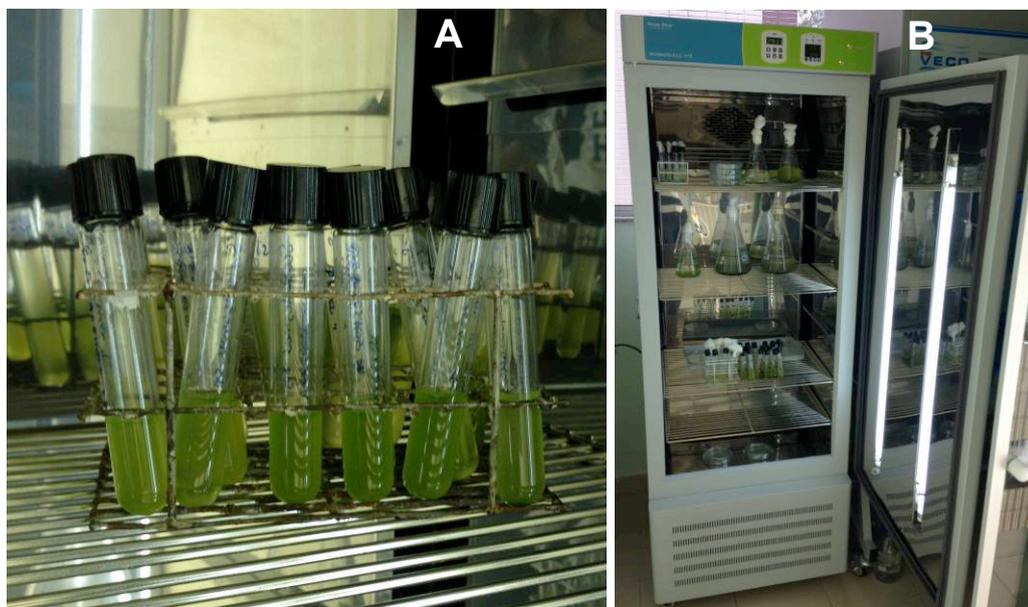


**Figura 4.2.** Estante de cultivo: Lâmpada luz do dia (A); Temporizador (B); Prateleira com áreas demarcadas para incidência luminosa de  $400 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (C); Saídas de ar comprimido (D); Saídas de  $\text{CO}_2$  (E).

Para a preservação dos inóculos, após 4 dias de propagação da cultura de origem, esta foi transferida em alíquotas de 5 mL para tubos de vidro estéreis de 15 mL (Figura 4.3A) e preservada em incubadora (Incubadora B.O.D. 411D, Nova Ética) (Figura 4.3B). Esta preservação foi conduzida a uma temperatura de 23 °C, sob intensidade luminosa de  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  dentro de um fotoperíodo de 12 h e agitação manual três vezes por semana promovendo a ressuspensão das células com o objetivo de impedir sua decantação prolongada.

A incubadora possui um sistema de controle digital de temperatura e iluminação artificial fornecida por duas lâmpadas fluorescentes na vertical (Luz do dia, 20 W, 80 cm, OSRAM).

A reposição do banco de preservação foi realizada através da inoculação de 5 mL de cultura preservada em sistemas de cultivo de 250 mL contendo 195 mL de meio ASM1 e crescimento em estante de cultivo sob intensidade luminosa de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 h, aeração de  $1,0 \text{ L min}^{-1}$  e temperatura de 23 °C por um período de 4 dias. Em seguida, as culturas foram transferidas em alíquotas de 5 mL para tubos de vidro estéreis e mantidas em incubadora.



**Figura 4.3.** Inóculos de *Scenedesmus* sp. preservados (A) e incubadora (B).

A estante de cultivo é composta por quatro prateleiras, sendo as três primeiras contendo, cada uma, quatro lâmpadas na horizontal e a quarta com 10

lâmpadas na vertical. A iluminação é fornecida unilateral e artificialmente por meio de lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do dia especial, 20 W, 60 cm, OSRAM) fixadas no fundo da estante de cultivo (Figura 4.2A).

O circuito elétrico da estante de cultivo que controla a iluminação tem um temporizador (*timer*) acoplado (Figura 4.2B), o qual permite realizar ajustes de regime de fotoperíodo, estando ajustado para um regime de 12 horas de luz: 12 horas de escuro.

Considerando que, se os frascos fossem posicionados em linha paralela às lâmpadas na horizontal, aqueles próximos ao centro destas receberiam mais radiação luminosa do que aqueles posicionados nas extremidades. Essa situação é de fácil compreensão porque as extremidades das lâmpadas produzem menos radiação luminosa que as porções medianas, uma vez que os íons que circulam no interior das lâmpadas são lá gerados. Para contornar essa questão, os frascos são dispostos em arco, de forma que os que ficam situados nas extremidades ficam mais próximos das lâmpadas do que os frascos centrais, mais afastados. Por outro lado, no caso das prateleiras com lâmpadas na vertical, os frascos podem estar alinhados e receberem radiação sem discrepância. Assim, cada prateleira possui marcações (Figura 4.2C) que indicam a posição dos frascos para que os cultivos estejam sob mesma intensidade luminosa, de  $400 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

A radiação luminosa fotossinteticamente ativa (PAR), também conhecida como taxa de fluência de fluxo de fóton fotossintético (PPFFR), é mensurada periodicamente com o auxílio de um irradiômetro de leitura direta (Li-250A, marca LICOR) acoplado à um sensor quantum sub-aquático esférico (US-SQS-L, da marca WALZ) colocado no interior do sistema de cultivo contendo água Milli-Q.

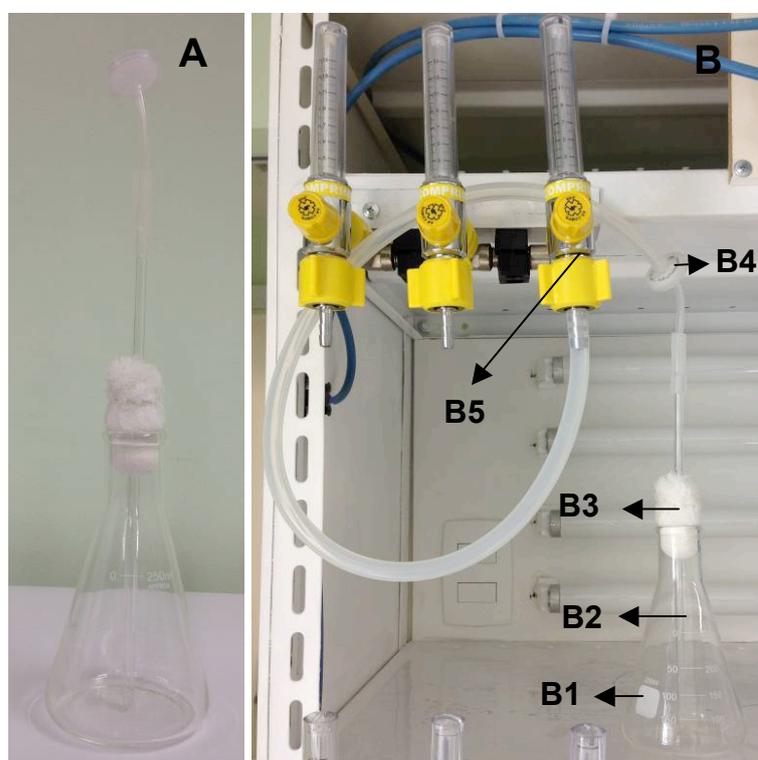
Acopladas a cada prateleira, estão três saídas de ar comprimido e outras três de gás carbônico (Figura 4.2D, E) com válvulas que permitem injetar ar ou CO<sub>2</sub>, respectivamente, até uma vazão de  $15 \text{ L min}^{-1}$ .

A sala de cultivo é aclimatizada com o uso de um condicionador de ar (Springer maxiflex,  $12000 \text{ BTU h}^{-2}$  de capacidade térmica) que mantém a temperatura em  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ , com variações de até  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Através de termômetros dispostos próximos aos locais onde os frascos experimentais são posicionados, a temperatura é averiguada e ajustada sempre que necessário.

#### 4.4. CULTIVO DE ATIVAÇÃO DE *Scenedesmus* sp.

O cultivo de ativação das células foi obtido a partir da transferência da cultura de alga do tubo de preservação para o sistema de cultivo de 250 mL com adição de meio de cultura.

O sistema de cultivo de 250 mL (Figura 4A) foi composto de um frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL (Figura 4.5B1) acoplado a um aerômetro (Figura 4.4B2, B3, B4).



**Figura 4.4.** Sistema de cultivo de 250 mL (A) e os seus componentes conectados à rede de aeração (B): Erlenmeyer de 250 mL (B1); Tubo de vidro (B2); Rolha de gaze e algodão hidrofóbico (B3); Filtro 25 mm e porosidade 0,20  $\mu\text{m}$  (B4); Saída de ar comprimido (B5).

O aerômetro, por sua vez, é composto de uma rolha confeccionada com gaze e algodão hidrofóbico, utilizada para fechar o sistema, contendo um tubo de vidro que a transpassa e se estende até o fundo do frasco. Através deste tubo, o ar é injetado na parte mais basal e central do frasco e se difunde por toda a cultura ao sair em borbulhas. O borbulhamento proporciona a homogeneização da cultura e com

isso garante que todas as células tenham acesso às mesmas condições físico-químicas, como intensidade luminosa, nutrientes, etc.

A esterilização do ar injetado ocorre através de um filtro (porosidade de 0,20  $\mu\text{m}$ , 25 mm de diâmetro, CHROMAFIL) que se conecta entre o tubo de vidro e a rede de aeração (Figura 4.B5) via conectores de silicone.

Para a condução do cultivo de ativação, avaliou-se duas relações sólido:líquido (mL de cultura de células: mL de meio de cultura): 1:50 e 1:4, ou seja, foram adicionados 49 mL e 3 mL de meio de cultura ASM1, respectivamente, para cada 1 mL de cultura de microalga.

O cultivo de ativação com relação sólido:líquido (S:L) 1:50 continha 5 mL de inóculo de preservação, com densidade celular de  $5,85\text{E}+06$  céls  $\text{mL}^{-1}$ , e 245 mL de meio ASM1. Este cultivo foi conduzido em triplicata sob intensidade luminosa de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aeração de  $1 \text{ L min}^{-1}$  e sob uma temperatura de  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ . O tempo de cultivo foi determinado baseado na duração da fase exponencial apresentada na cinética realizada.

O cultivo de ativação com S:L 1:4 continha 50 mL de inóculo de preservação, com densidade celular  $1,31\text{E}+07$  céls  $\text{mL}^{-1}$ , e 150 mL de meio ASM1. Este cultivo foi conduzido em triplicata sob intensidade luminosa de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aeração de  $1 \text{ L min}^{-1}$  e a uma temperatura de  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ . O tempo de cultivo também foi determinado baseado na duração da fase exponencial apresentada na cinética realizada.

Uma amostra de cada experimento foi coletada a cada 24 h para determinação da densidade celular, que foi utilizada para construir os perfis cinéticos. Antes de cada coleta de amostra, adicionou-se água Milli-Q estéril em volume equivalente ao de água evaporado da cultura.

Baseando-se nos resultados obtidos nos cultivos de ativação com S:L 1:50 e 1:4, determinaram-se qual das duas relações foi a melhor e qual tempo de cultivo ideal a serem empregados nos seguintes cultivos de ativação.

#### 4.5. CULTIVO DO INÓCULO DE *Scenedesmus* sp.

A fim de se obter o inóculo, realizou-se a transferência do cultivo de ativação para o sistema de cultivo de 1 L (Figura 4.5) com adição de meio de cultura. O sistema de 1 L foi composto de um Erlenmeyer de 1 L acoplado a um aerômetro constituído pelos mesmos componentes que o do sistema de 250 mL.



**Figura 4.5.** Sistema de cultivo de 1 L conectado à saída de ar da estante de cultivo.

Para a construção do perfil cinético do inóculo, utilizaram-se 200 mL de cultivo de ativação, adicionado 600 mL de meio ASM1, logrando-se uma relação sólido:líquido 1:4, e submeteu o cultivo a  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa,  $1 \text{ L min}^{-1}$  de aeração e  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Uma amostra de cada um dos três experimentos foi coletada a cada 24 h para determinação da densidade celular, utilizada para construir os perfis cinéticos. Adicionando-se água Milli-Q estéril antes da amostragem para repor a água evaporada.

O tempo de cultivo do inóculo foi determinado baseado no perfil cinético e na produtividade em biomassa obtida ao longo do cultivo. Este tempo foi utilizado nos inóculos posteriores.

#### 4.6. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA ASM1

A fim de otimizar as concentrações das fontes de nitrato, fosfato e vitamina do meio de cultura ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp., realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Como fonte de nitrato utilizou-se  $\text{NaNO}_3$ , como fonte de fosfato utilizou-se uma mistura 1:2 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e como fonte de vitamina utilizou-se uma mistura de 1:1:200 de biotina, cianocobalamina e tiamina.

No DCCR, avaliaram-se as 3 variáveis independentes em 2 níveis e 4 repetições do ponto central, totalizando 18 experimentos, cujas condições foram variadas dentro das faixas especificadas na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** Níveis do DCCR para os nutrientes do ASM1 avaliados no cultivo de *Scenedesmus* sp.

Variáveis independentes	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentração de nitrato ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,0	42,5	106,2	170,0	212,5
Concentração de fosfato ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,0	13,2	33,1	53,0	66,2
Concentração de vitamina ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,0	0,1262	0,3131	0,5000	0,6262

A matriz do planejamento é apresentada na Tabela 4.2 e as variáveis de resposta selecionadas foram a densidade celular ( $\text{cél mL}^{-1}$ ), o teor de lipídeos totais (% em biomassa seca) e a produtividade em lipídeos totais ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ).

Os 18 cultivos do DCCR foram conduzidos em sistemas de 1 L contendo 200 mL de inóculo mais 600 mL de meio ASM1 original com as concentrações de nitrato, fosfato e vitamina modificadas de acordo com a Tabela 4.2. O inóculo dos 18 experimentos foi obtido através do cultivo de *Scenedesmus* sp. de acordo com o item 4.5.

**Tabela 4.2.** Matriz do DCCR para os nutrientes do ASM1 avaliados no cultivo de *Scenedesmus* sp.

Experimento	Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	Fosfato (mg L <sup>-1</sup> )	Vitamina (mg L <sup>-1</sup> )
1	42,5	13,2	0,1262
2	42,5	13,2	0,5000
3	42,5	53,0	0,1262
4	42,5	53,0	0,5000
5	170,0	13,2	0,1262
6	170,0	13,2	0,5000
7	170,0	53,0	0,1262
8	170,0	53,0	0,5000
9	0,0	33,1	0,3131
10	212,5	33,1	0,3131
11	106,2	0,0	0,3131
12	106,2	66,2	0,3131
13	106,2	33,1	0,0
14	106,2	33,1	0,6262
15 (PC)	106,2	33,1	0,3131
16 (PC)	106,2	33,1	0,3131
17 (PC)	106,2	33,1	0,3131
18 (PC)	106,2	33,1	0,3131

(PC) – Ponto Central

Todos os experimentos do DCCR iniciaram com uma densidade celular de  $2,16 \pm 0,27 \times 10^6$  céls mL<sup>-1</sup> e foram realizados simultaneamente em estantes de cultivo sob intensidade luminosa de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aeração de  $1 \text{ L min}^{-1}$  e temperatura de 23 °C.

Amostras foram coletadas diariamente para determinação da densidade celular que foi utilizada para construir os perfis cinéticos. As primeiras e últimas amostras foram também utilizadas para obtenção dos valores de biomassa seca iniciais e finais, respectivamente. No final de cada cultivo, as culturas foram concentradas através de decantação natural por 12 h seguida de centrifugação a

3800 g por 20 minutos. E a partir das culturas concentradas, o teor de lipídeos totais alcançado no final de cada cultivo foi determinado.

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do *software* Statistica versão 6.0.

#### 4.6.1. VALIDAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO DO MEIO ASM1

Utilizando a função *Desirability* obtida a partir da análise dos resultados do DCCR com o programa Statistica 6.0, foram preditas as condições ótimas do cultivo. Esta função buscou a combinação dos fatores de forma que todas as variáveis de resposta fossem maximizadas simultaneamente. O valor *Desirability* (D) tem uma amplitude que varia de 0 a 1, onde D=1 corresponde a plena obtenção dos objetivos e D=0 corresponde à impossibilidade de satisfação dos objetivos (MONTGOMERY & CALADO, 2003). Desta forma, a função *Desirability* foi utilizada para determinar as concentrações de nitrato, fosfato e vitamina que maximizam a densidade de celular, o teor de lipídeos totais e a produtividade em lipídeos totais simultaneamente.

Para validar a otimização, realizou-se três cultivos nas condições ótimas de nitrato, fosfato e vitamina previstas pelo modelo, em sistemas de 1 L com meio ASM1 otimizado (ASM1-O), com densidade celular inicial de  $2,0E\pm 0,25+06E$  céls mL<sup>-1</sup>, sob 400  $\mu$ mol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, aeração de 1 L min<sup>-1</sup> e temperatura de 23 °C. A densidade celular, biomassa seca e o teor de lipídeos totais foram determinados no final de cada cultivo.

#### 4.7. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NO CULTIVO DE *Scenedesmus* sp.

Com o propósito de analisar o efeito de diferentes meios de cultura sobre a produção de biomassa, acúmulo de lipídeos totais e produtividades em biomassa e lipídeos, a microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada fototroficamente em ASM1 original, ASM1-O, BG11-N, BG11-U e BBM.

Nesse estudo, o cultivo em cada meio foi realizado em sistemas de cultivos de 1 L, em triplicata, sob as seguintes condições: 200 mL de inóculo obtido de acordo com o ítem 4.5; 600 mL de meio; densidade celular inicial  $3,38 \pm 0,39 \times 10^6$  céls mL<sup>-1</sup>; 400  $\mu\text{mol}$  fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 1 L ar min<sup>-1</sup>; e 23 °C.

Foram coletadas amostras a cada 24 h para a análise de densidade celular e cada 48 h para análise de biomassa seca. As culturas foram concentradas no final do processo através de decantação natural por 12 h seguida de centrifugação a 3800 g por 20 minutos. O teor de lipídeos alcançado no final de cada cultivo foi determinado.

#### **4.8. OBTENÇÃO DE GLICOSE A PARTIR DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE CELULOSE VISANDO SUA APLICAÇÃO NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Scenedesmus* sp.**

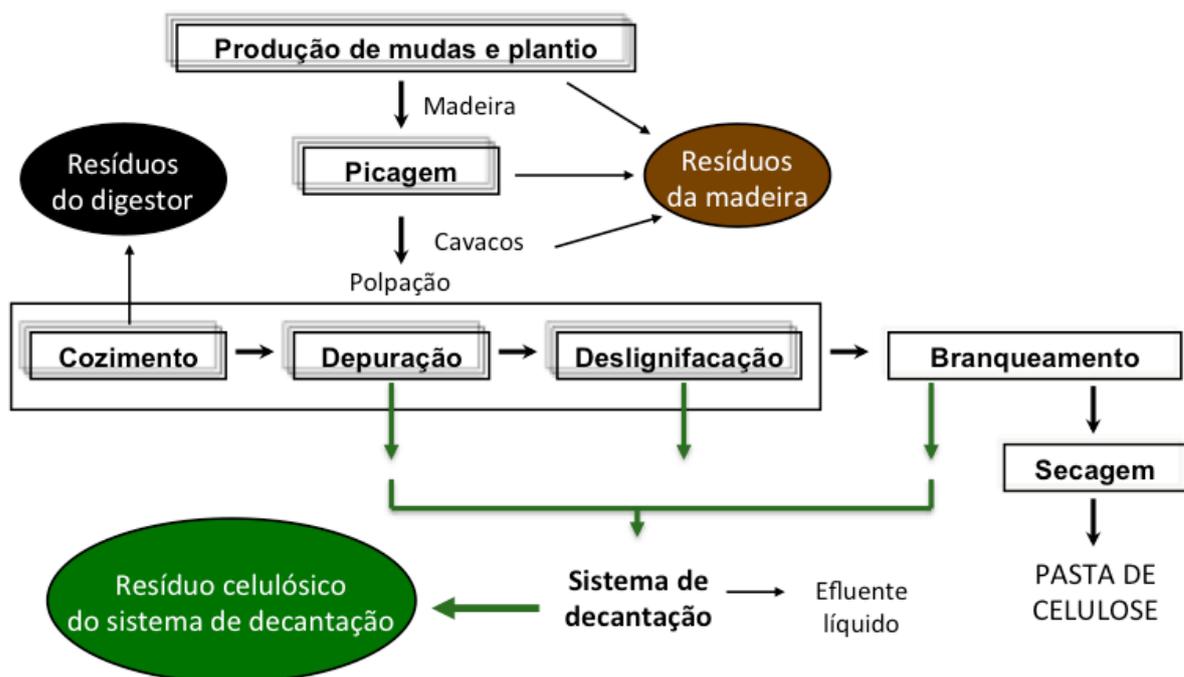
A biomassa lignocelulósica residual (Figura 4.6) utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pela empresa Aracruz Celulose, Espírito Santo. Esta biomassa consistiu do resíduo lignocelulósico proveniente do sistema de decantação, onde foram reunidas todas as fibras refugadas de algumas etapas do processo (Figura 4.7) por não terem qualidade requerida para constituir a pasta de celulose ou papel.

Este resíduo foi oriundo do processo de celulose que foi produzida majoritariamente a partir da madeira do híbrido de *Eucalyptus grandis* com *E. urophylla*, que foi modificado geneticamente no programa de melhoramento genético clássico da empresa Aracruz Celulose.

Após o recebimento dessa biomassa, o pH foi ajustado para 4,5 – 5,0 pela adição de ácido clorídrico, em virtude da natureza altamente alcalina, realizaram-se lavagem, empregando-se 35 L de água para cada quilo de biomassa, e secagem em estufa a 70 °C, apresentando teor de umidade de 4,5 % que foi considerado em todos experimentos.



**Figura 4.6.** Biomassa lignocelulósica residual proveniente do sistema de decantação da indústria de celulose.



**Figura 4.7.** Fluxograma da produção de celulose e a origem da biomassa lignocelulósica residual do sistema de decantação.

A caracterização deste resíduo foi realizada no Centro de Tecnologia da Indústria Aracruz Celulose. Na caracterização foi possível quantificar a porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa residual.

Uma vez que não foram encontrados dados na literatura sobre a obtenção de glicose a partir desta biomassa, o presente trabalho almejou realizar este estudo prévio à sua aplicação no cultivo heterotrófico.

Para a otimização da hidrólise enzimática do complexo lignocelulósico, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) considerando 2 variáveis independentes em 2 níveis e com 3 repetições do ponto central, cujas condições foram variadas nas faixas especificadas na Tabela 4.3, totalizando 11 experimentos. A variável de resposta escolhida foi a concentração final de glicose.

**Tabela 4.3.** Intervalo utilizado para construir o DCCR para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual.

Variáveis independentes	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Relação sólido:líquido (g:mL)	1:11	1:10	1:7,5	1:5	1:4
Carga enzimática (FPU g <sup>-1</sup> )	7	10	17,5	25	28

A hidrólise enzimática foi realizada em frascos cônicos de 500 mL, contendo 200 mL de meio reacional mais biomassa, agitados a 200 rpm, utilizando celulasas comerciais Multifect (Genecor), meio tamponado com citrato de sódio e ácido cítrico (pH 5,0) e a uma temperatura de 47 °C.

O complexo celulásico apresentava 100 FPU mL<sup>-1</sup> de atividade FPásica, 125 U mL<sup>-1</sup> de atividade  $\beta$ -glicosidásica e 5.500 U mL<sup>-1</sup> de atividade CMCásica que foram determinadas pelo método GHOSE (1987).

Para a construção dos perfis cinéticos da hidrólise enzimática, foram coletadas amostras em intervalos de tempo apropriado para quantificação dos açúcares redutores totais, sendo as últimas amostras submetidas à quantificação de glicose, celobiose e xilose.

Ao se determinar as melhores condições da hidrólise enzimática, 4 réplicas foram realizadas sob as mesmas condições para validar o resultado. Amostras foram coletadas a cada 4 h e submetidas à quantificação de glicose.

Com o propósito de aplicar o hidrolisado da biomassa residual no cultivo heterotrófico, 6 réplicas da hidrólise enzimática deste resíduo foram realizadas em

frascos cônicos de 1 L, contendo 300 mL de meio reacional mais 100 g biomassa, agitados a 200 rpm, utilizando celulases Multifect (Genecor), meio tamponado com citrato de sódio e ácido cítrico (pH 5,0) e a uma temperatura de 47 °C. O produto resultante foi centrifugado a 12.800 g, 6 °C e por 20 min e o sobrenadante contendo glicose (hidrolisado) foi separado e esterilizado em autoclave (121 °C, 20 min). Posteriormente, o hidrolisado contendo glicose foi empregado diretamente no cultivo heterotrófico de *Scenedesmus* sp.

#### **4.9. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE CULTIVOS SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DA MICROALGA *Scenedesmus* sp.**

Visando avaliar a performance de *Scenedesmus* sp. em diferentes tipos de cultivo, foram realizados cultivos fototrófico, mixotrófico e heterotrófico.

Os cultivos fototrófico e mixotrófico foram realizados em sistemas de 250 mL localizados em estante de cultivo, sob 400  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 L ar  $\text{min}^{-1}$  e 23 °C. No cultivo mixotrófico foi utilizada glicose comercial em concentração de 10 g  $\text{L}^{-1}$  (G10).

Para o cultivo heterotrófico, realizaram-se dois planejamentos fatoriais univariável: em um empregou-se glicose comercial em dois níveis, 10 e 20 g  $\text{L}^{-1}$ , G10 e G20, respectivamente; em outro foi utilizado o hidrolisado da biomassa lignocelulósica residual como fonte de glicose, avaliada também em 10 e 20 g  $\text{L}^{-1}$ , R10 e R20, respectivamente. Ambos cultivos foram conduzidos simultaneamente em frascos cônicos de 500 mL, em shaker, a 28 °C, 200 rpm e sem luz.

Cada tipo de cultivo foi realizado em triplicata, usando em cada uma delas o meio BG11-N (150 mL), 50 mL de inóculo obtido de acordo com o item 4.5 e densidade celular inicial  $2,84 \pm 0,26 \text{E}+06$  céls  $\text{mL}^{-1}$ .

Foram coletadas amostras a cada 12 h nos primeiros 4 dias e posteriormente a cada 24 h para a análise de densidade celular e biomassa seca. Ao final de cada cultivo, as culturas foram concentradas através de decantação natural por 12 h seguida de centrifugação a 3800 g por 20 minutos. E foram determinados os teores de lipídeos no final de cada cultivo.

#### 4.10. ESCALONAMENTO DO CULTIVO DE *Scenedesmus* sp.

O aumento do cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. em escala laboratorial para a escala piloto foi realizado através de transferências sucessivas das culturas algáceas de sistemas de cultivos menores para sistemas de cultivos maiores seguidas de adição de meio ASM1. Sendo assim, foram realizadas cinco transferências, a saber: da cultura do tubo de preservação para o sistema de cultivo de 250 mL, denominado de cultivo de ativação; do cultivo de ativação para um sistema de 1 L, nomeado de inóculo; do inóculo para um sistema de 20 L, para obtenção do cultivo de garrafão; seguido da propagação do cultivo de garrafão em vários sistemas de 20 L, chamados de cultivos de propagação; e a transferência dos cultivos de propagação para os fotobiorreatores em série, atingindo-se nesta etapa o cultivo da microalga em escala piloto.

A Figura 4.8. apresenta um fluxograma bem simples do escalonamento do cultivo de *Scenedesmus* sp. desde a cultura preservada até o cultivo em fotobiorreatores.



**Figura 4.8.** Fluxograma do escalonamento do cultivo da microalga *Scenedesmus* sp.

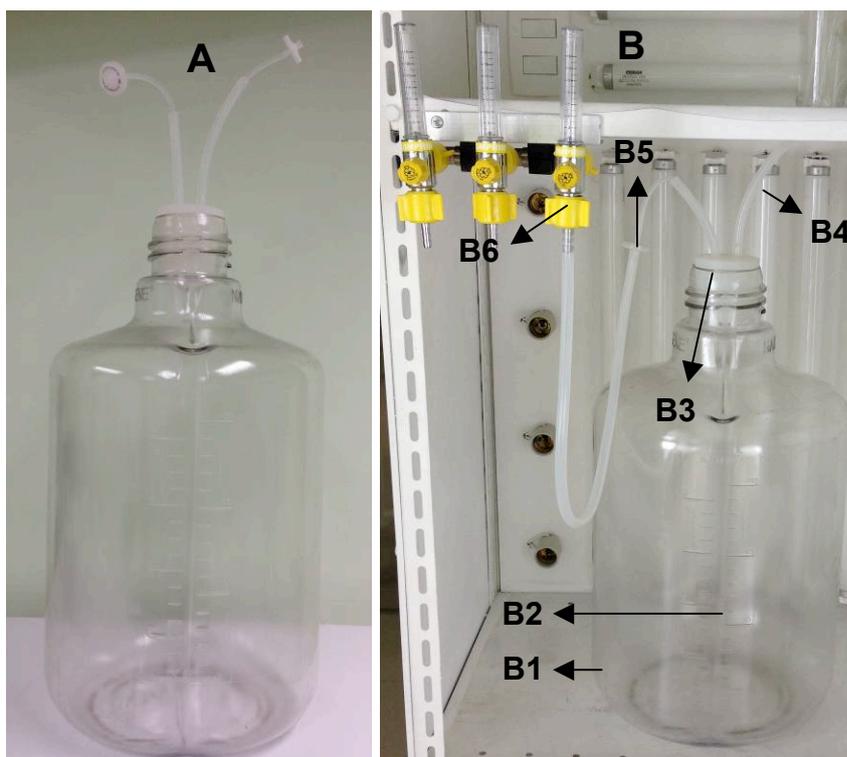
As quatro primeiras transferências, desde a etapa de preservação até a de cultivo de propagação, foram realizadas em ambientes estéreis e utilizando materiais também estéreis. Entretanto, a quinta transferência, a dos cultivos de propagação para os fotobiorreatores, foi realizada em ambiente não estéril, uma vez que estes aparelhos não são totalmente fechados, encontram-se a céu aberto e este procedimento seria muito mais laborioso e oneroso.

As condições empregadas no cultivo de preservação, no cultivo de ativação e no cultivo do inóculo foram descritas nos itens 4.3, 4.4 e 4.5, respectivamente. As condições utilizadas no cultivo de garrafão e sua propagação serão descritas no

item 4.11. Enquanto a descrição dos fotobiorreatores e das produções de biomassa realizadas nestes sistemas serão descritas nos itens 4.12 e 4.13, respectivamente.

#### 4.11. CULTIVO DE *Scenedesmus* sp. EM GARRAFÃO E SUA PROPAGAÇÃO

O cultivo de garrafão bem como os cultivos de propagação foram realizados em um sistema de cultivo de 20 L (Figura 4.9A). Este sistema é composto de um garrafão de polycarbonato transparente de 20 L (Figura 4.9B1) acoplado a um aerômetro (Figura 4.9B2, B3, B4, B5) com rolha de silicone, através da qual transpassam o tubo de vidro para entrada de ar e o tubo de silicone para escape de ar.



**Figura 4.9.** Sistema de cultivo de 20 L (A) e seus componentes conectados à rede de aeração (B): Garrafão de 20 L (B1); Tubo de vidro para entrada de ar (B2); Rolha de silicone (B3); Escape de ar (B4); Filtro (B5); Saída de ar comprimido (B6).

O tubo de vidro (Figura 4.9B2) se prolonga até o fundo, através do qual o ar é injetado e sai em borbulhas no interior da cultura. Na extremidade superior do tubo

de vidro e do escape de ar se insere um filtro (0,20  $\mu\text{m}$  de porosidade e 25 mm de diâmetro). Sem este escape e com a areação ligada, a pressão interna aumentaria até que a rolha desprende-se e o cultivo contaminasse.

Ressalta-se que nos aerômetros dos sistemas de cultivo de 250 mL e de 1L, não existe um tubo de escape, pois as rolhas, confeccionadas com gaze e algodão, permitem a saída fluente de ar. Assim, mantêm um equilíbrio entre as pressões do interior da cultura e do meio externo. Em contrapartida, a rolha de gaze contribue para uma maior evaporação de água, o que pouco ocorre quando se utiliza rolha de silicone.

A fim de se realizar o cultivo de garrafão, primeiramente foram obtidos dois cultivos de ativação e com estes dois inóculos. Dessa forma, 1,6 L de cultura dos dois inóculos foram transferidos para um sistema de 20 L contendo 14,4 L de meio ASM1, fazendo uma diluição 1:10. O cultivo de garrafão foi conduzido em triplicata sob 400  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aeração de 8  $\text{L min}^{-1}$  e temperatura de 23 °C na estante de cultivo.

Durante o cultivo, uma amostra foi coletada a cada 24 h, após reposição de água evaporada, para determinar densidade celular utilizada na construção do perfil cinético. Sendo as primeiras e as últimas amostras também utilizadas para quantificar a biomassa seca inicial e final das culturas, respectivamente.

Baseando-se na análise dos resultados, o tempo ideal de cultivo foi determinado e o mesmo foi empregado nos cultivos de garrafão utilizados como inóculo dos cultivos de propagação. Antes de cada inoculação, confirmava-se se a densidade do cultivo de garrafão estava coerente com o tempo ideal.

O cultivo de propagação foi realizado em seis réplicas, todos em sistema de 20 L, cultivadas em estante de cultivo, contendo 1 L de cultivo de garrafão e 17 L de meio ASM1 (S:L 1:18), sob 400  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 9 L de ar  $\text{min}^{-1}$  e 23 °C.

Amostras diárias foram coletadas de cada uma das réplicas, após o volume original da cultura ser repostado com água Milli-Q estéril, e submetidas às análises de densidade celular e biomassa seca. O tempo de cultivo foi determinado mediante a cinética construída e as mesmas condições foram empregadas nos cultivos de propagação realizados posteriormente para serem inoculados nos fotobiorreatores.

#### 4.12. ESTRUTURA DOS FOTOBIORREADORES DE 1.100 L

Os fotobiorreatores utilizados no presente trabalho foram construídos na unidade piloto do Centro de Biocombustíveis, Petróleo e Derivados da Escola de Química da UFRJ (NBPD/EQ/UFRJ).

São 30 fotobiorreatores verticais do tipo janela distribuídos em três séries de dez dispostas em paralelo, como pode ser visualizado na Figura 4.10. Cada série de fotobiorreatores tem capacidade de 1.100 L de cultivo, totalizando 3,3 m<sup>3</sup>.

As séries de fotobiorreatores da unidade piloto apresentam as seguintes características:

- Estrutura em policarbonato (5 mm de espessura) com 1,2 m de largura, 0,8 m de altura e 11 cm de espessura, contendo aletas internas, tampa superior, duas saídas inferiores e engate para mangueiras de PVC;
- Três sistemas de resfriamento composto de três geradores de água gelada com controladores de temperatura; tubulação com isolamento; três sensores de temperatura; e três serpentinas de aço inoxidável, submersas no primeiro reator de cada série;
- Um sistema de injeção de ar em cada fotobiorreator com tubulação em aço inox, com saídas de ar em borbulhas na parte basal do reator, e válvulas de controle de vazão de ar;
- Um sistema para controle de pH composto de um painel de controle, três sensores de pH e tubulação ligada a rede de CO<sub>2</sub> através da qual o injeta no cultivo quando o limite do pH é ultrapassado;
- Sistema de recirculação do cultivo com tubulação e bombas.

A recirculação do cultivo ao longo dos dez fotobiorreatores de cada série ocorre através de sua passagem do primeiro reator para o segundo, do segundo para o terceiro e assim sucessivamente até chegar ao décimo, de onde é bombeado de volta para o primeiro via tubulação (Figura 4.11). A passagem da cultura de um reator para o outro ocorre por transbordo através de uma caneleta, situada entre os

reatores na parte superior. Em cada reator, o cultivo faz uma trajetória em ziguezague determinada pelo posicionamento das aletas internas (Figura 4.12).

A água utilizada para fazer os meios de culturas dos cultivos de microalgas desenvolvidos em fotobiorreatores foi tratada através de um sistema de microfiltração com carvão ativado pressurizado, que tem capacidade de aproximadamente  $900 \text{ L h}^{-1}$  (Figura 4.13). Este sistema encontra-se ao lado das séries dos fotobiorreatores na unidade piloto.



**Figura 4.10.** Fotobiorreatores verticais do tipo janela da unidade piloto do NBPD/EQ/UFRJ.

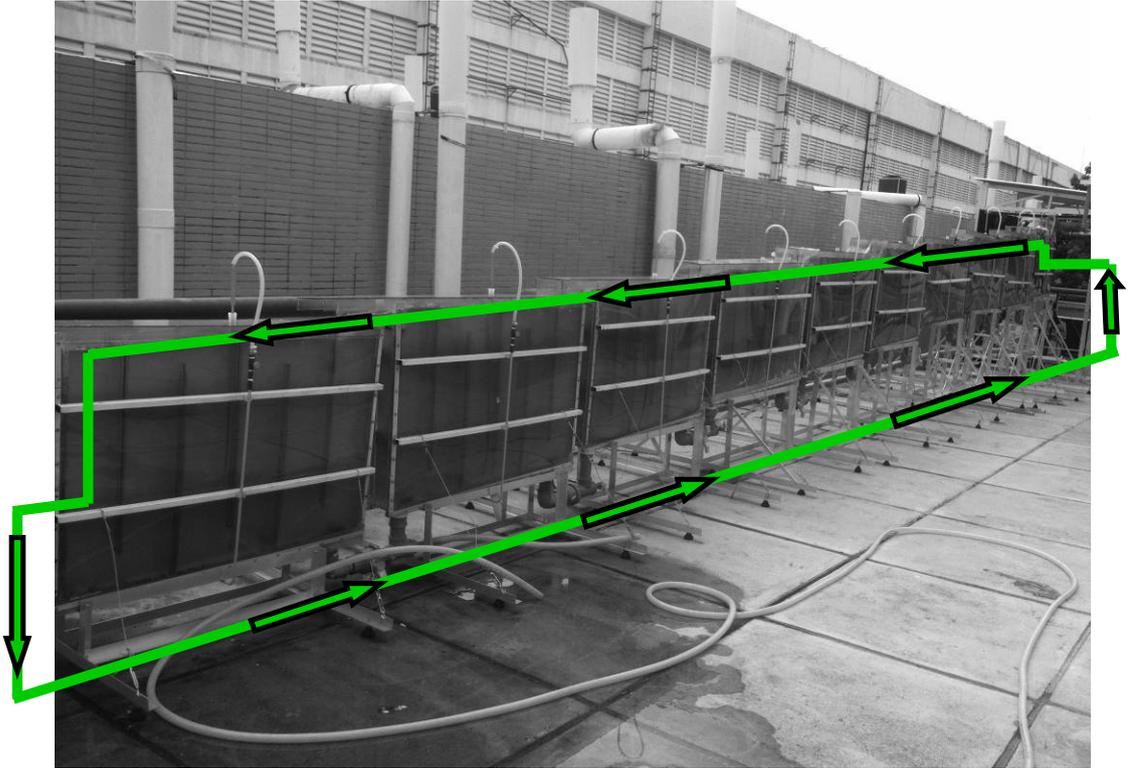


Figura 4.11. Esquema de recirculação do cultivo ao longo dos dez fotobiorreatores de cada série.

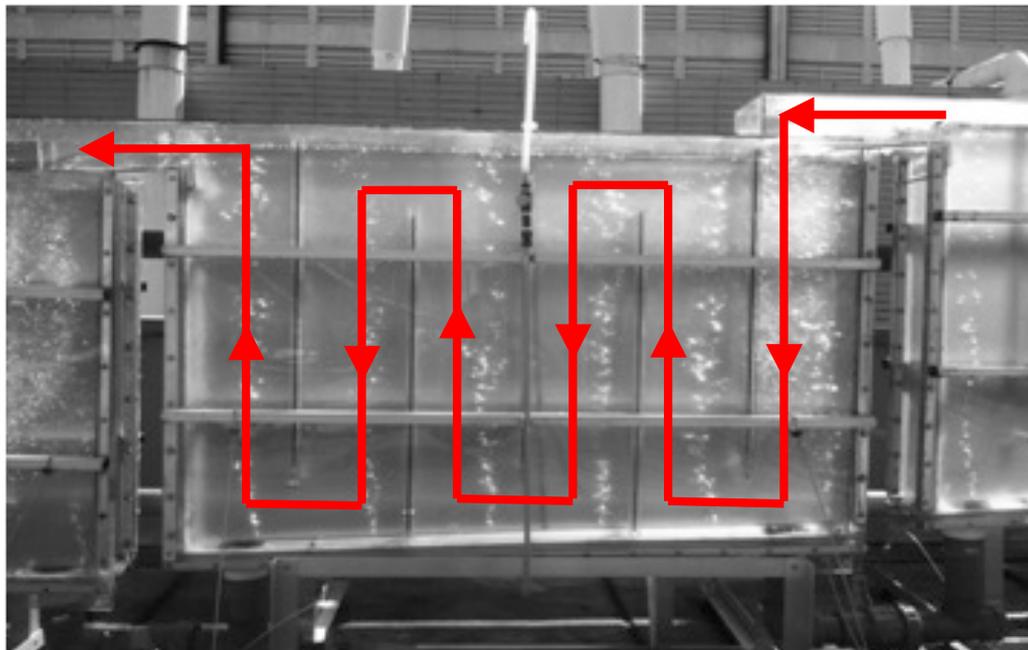


Figura 4.12. Trajetória do cultivo dentro de um fotobiorreator durante sua recirculação.



**Figura 4.13.** Sistema de microfiltração de água com carvão ativado pressurizado.

#### **4.13. PRODUÇÃO DE *Scenedesmus* sp. EM FOTOBIORREATORES DE 1.100 L**

Realizaram-se quatro produções da microalga *Scenedesmus* sp. em fotobiorreatores, a saber: uma conduzida de forma descontínua (batelada simples); uma conduzida de forma descontínua e com alimentação em pulso (batelada alimentada por pulso); e três conduzidas de forma semicontínua.

##### **4.13.1 PRODUÇÃO DE *Scenedesmus* sp. EM BATELADA SIMPLES**

Para a condução da batelada simples realizada em uma série de fotobiorreatores, inocularam-se 4 cultivos de propagação com 8 dias de crescimento e  $4,51E+06$  céls mL<sup>-1</sup>. Em seguida, diluíram-se os 72 L de inóculo 1:15, adicionando 1.026 L de água corrente tratada e 20 L de meio ASM1 com nutrientes concentrados para o volume final de 1.100 L. O tempo 0 h do cultivo foi marcado após 1 h do início

da recirculação das células ao longo da série, de forma que a primeira amostra coletada pudesse representar um cultivo homogêneo.

O processo foi controlado automaticamente a uma temperatura máxima de 30 °C, pH 8,0 mediante injeção de CO<sub>2</sub>, aeração de 1 L min<sup>-1</sup> em cada reator e sob radiação solar.

A densidade celular, a biomassa seca e a turbidez foram determinadas diariamente e utilizados para construir o perfil cinético desta batelada simples.

No final do cultivo, toda cultura algácea foi direcionada à etapa de concentração e análises de teores de lipídeos totais.

#### **4.13.2. PRODUÇÃO DE *Scenedesmus* sp. EM BATELADA ALIMENTADA**

Na batelada simples com alimentação, realizada em uma série de fotobiorreatores, avaliou-se o efeito desta sobre o crescimento da microalga. Desta forma, inocularam-se 4 cultivos de propagação (72 L) crescidos por 8 dias com 4,46E+06 céls mL<sup>-1</sup>. Diluiu-se este inóculo 1:15 com adição de água e nutrientes para 1.100 L. No sexto dia de cultivo, um pulso de alimentação, correspondendo a 20 L com todos os nutrientes do meio ASM1 em quantidades para 1.100 L, foi realizado.

Assim como os outros processos, o cultivo com alimentação foi controlado automaticamente a uma temperatura máxima de 30 °C, pH 8,0, aeração de 1 L min<sup>-1</sup> em cada reator e sob radiação solar. A cada 24 h, amostras foram coletadas para determinar a densidade celular, biomassa seca e turbidez ao longo do processo e, com isso, levantou-se a cinética de crescimento da microalga nestas condições. Ao final do cultivo, toda biomassa foi coletada, concentrada e submetida às análises de teores de lipídeos totais.

#### **4.13.3. PRODUÇÃO DE *Scenedesmus* sp. EM BATELADA SEMICONTÍNUA**

A batelada semicontínua realizada em uma série de fotobiorreatores foi constituída de dois estágios sequenciais conduzidos da seguinte forma: iniciou-se o

primeiro estágio do cultivo e o conduziu até sua fase estacionária; coletou-se parte da cultura de microalgas, mantendo o restante nos reatores; adicionou-se aos reatores um volume de água mais nutrientes igual ao volume retirado; e conduziu-se o segundo estágio de cultivo até sua fase estacionária.

A batelada semicontínua inciou com 4 cultivos de propagação (72 L) crescidos por 8 dias e com  $4,11E+06$  céls mL<sup>-1</sup>. Após inoculação, avolumou-se com água e nutrientes para 1.100 L, começando o primeiro estágio do cultivo com diluição 1:15. No final do primeiro estágio, 950 L de cultura foram retirados e direcionados para a concentração. Aos 150 L restantes, foram adicionados 950 L de água com nutrientes para o volume de 1.100 L, iniciando o segundo estágio com diluição 1:7. No final do segundo estágio, toda cultura foi coletada, concentrada, adicionada à biomassa do primeiro estágio e direcionada para as análises de teores de lipídeos totais.

O processo foi controlado automaticamente a uma temperatura máxima de 30 °C, pH 8,0 mediante injeção de CO<sub>2</sub>, aeração de 1 L min<sup>-1</sup> em cada reator e sob radiação solar. As amostras coletadas diariamente foram submetidas às análises de densidade celular, biomassa seca e turbidez para a construção dos perfis cinéticos. Após concentração do cultivo, analisou-se o teor de lipídeos totais.

Para validar os resultados obtidos na primeira batelada semicontínua, realizou-se duas réplicas conduzidas sob as mesmas condições: 72 L de cultivos de propagação de 8 dias e com  $4,78 \pm 0,68E+06$  céls mL<sup>-1</sup>; 30 °C, pH 8,0, aeração de 1 L min<sup>-1</sup> em cada reator e sob radiação solar. As amostras coletadas a cada 24 h foram submetidas às análises de contagem direta de células, biomassa seca e turbidez. Após a concentração da biomassa dos dois estágios, determinaram-se os teores de lipídeos totais.

#### **4.14. CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA DE *Scenedesmus* sp. PRODUZIDA EM FOTOBIORREATORES DE 1.100 L**

Após o término de cada cultivo em fotobiorreatores, a cultura de microalgas foi direcionada para a etapa de concentração, constituída de microfiltração seguida de centrifugação.

Assim, para a microfiltração: a cultura foi transferida para o tanque de armazenamento de cultura de 1.200 L (Figura 4.14A); deste seguiu para o sistema de filtragem (Figura 4.14B), que contém uma membrana de microfiltração (0,4  $\mu\text{m}$ ) (Figura 4.14C), através da qual a água do cultivo passou e foi armazenada no tanque de água residual (Figura 4.14D); enquanto a biomassa retida pela membrana foi coletada.

A biomassa proveniente da microfiltração, concentrada aproximadamente 35 vezes, foi submetida a centrifugação a 12.800 g, 6 °C e 15 minutos e concentrada mais 5 vezes, obtendo no final de todo o processo um cultivo de microalgas concentrado mais de 170 vezes. E a água residual da microfiltração e centrifugação foi tratada no sistema de microfiltração com carvão ativado e armazenada para futura reutilização.

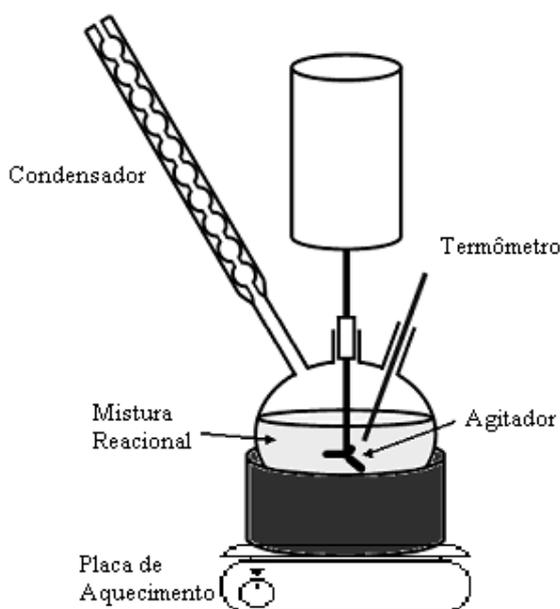


**Figura 4.14.** Sistema de concentração de biomassa por microfiltração composto de um tanque de armazenamento de cultura (A), sistema de filtragem (B), contendo uma membrana (C), e um tanque de armazenamento de água residual (D).

#### 4.15. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EM FOTOBIORREATORES

Após concentração da biomassa cultivada em batelada semicontínua nos fotobiorreatores, realizou-se a produção de biodiesel por transesterificação, hidroesterificação e saponificação seguida de esterificação.

Para a transesterificação, foi utilizado um sistema reacional constituído por um balão de vidro de 150 mL, com 3 saídas. Na saída central, foi conectado o agitador mecânico. Em uma das saídas laterais, acoplou-se um condensador, utilizado para promover refluxo e evitar perdas de álcool. Na outra saída lateral, foi conectado um termômetro de mercúrio para controlar a temperatura, que foi mantida constante ao longo da reação. O aquecimento foi promovido por um banho de água, no qual o balão foi parcialmente imerso (Figura 4.15).



**Figura 4.15.** Sistema reacional para produção de biodiesel por transesterificação.

Utilizaram-se 25 g de óleo da microalga *Scenedesmus* sp. ( $MM = 256.42 \text{ g mol}^{-1}$ ), metanol (relação álcool:óleo 4:1), hidróxido de potássio (KOH) (5 % com relação à massa do óleo), 45 °C e 100 rpm agitação durante 60 minutos. Após a reação, adicionou-se água ao sistema para promover separação de duas fases

líquidas. A fase rica em glicerina foi separada por decantação e a fase rica em biodiesel foi submetida a lavagem com água mais 0,08 % de ácido fosfórico para remoção de catalisador e o álcool não reagido. Por último, o biodiesel foi aquecido até 110 °C para evaporação do álcool residual.

A biomassa produzida em fotobiorreatores também foi submetida à produção de biodiesel por hidroesterificação, realizada em um reator batelada, do tipo autoclave, da marca Parr Instruments Inc., modelo 4836, em aço inoxidável, de volume útil de 400 mL e pressão máxima de trabalho de 3.000 psi. Esse reator possui tubo para a retirada de amostras, bem como sistema de agitação e manta externa para aquecimento (Figura 4.16).



**Figura 4.16.** Reator Parr utilizado na hidroesterificação de *Scenedesmus* sp.

Para a produção dos ácidos graxos (nas reações de hidrólise), as condições operacionais foram: 200 mL de biomassa com  $90 \pm 0,87$  % de umidade, temperatura de 300 °C, tempo de reação de 120 minutos e agitação de 200 rpm. Nas reações de esterificação, os ácidos graxos e metanol (razão molar ácidos graxos:metanol 1:3,5) foram adicionados ao reator, juntamente com o catalisador heterogêneo nióbia fosfatada (17 % de  $H_3PO_4/Nb_2O_5$  em relação à massa de ácidos graxos), e submetidos à temperatura de 200 °C, tempo de reação de 90 minutos e agitação de 400 rpm.

Para a saponificação, empregaram-se 10 Kg de biomassa ( $94,24 \pm 0,06$  % de umidade) e 3 L de solução de etanol com 8 % de KOH (razão solução hidroalcoólica:biomassa seca 1:5). Esta foi conduzida por 1h a 80 °C, 10 psi e 200

rpm em reator batelada do tipo autoclave (Parr Instruments Inc. - Modelo 4550), de aço inoxidável, volume útil de 20 L e pressão máxima de trabalho de 3.000 psi (Figura 4.17). Esse reator possui sistema de resfriamento para garantir o controle da temperatura, sistema de agitação e manta externa para aquecimento.



**Figura 4.17.** Reator Parr utilizado na saponificação e acidulação de *Scendesmus* sp.

Após a saponificação, foram adicionados 3 L de hexano e o produto foi centrifugado a 12.800 g por 20 min, separando-se a biomassa residual das fases saponificável e insaponificável. Sendo o sabão direcionado para a acidulação realizada no reator Parr com 130 mL de  $H_2SO_4$ , a 80 °C, 9 psi, 200 rpm e por duas horas. O produto da acidulação foi submetido à centrifugação (12.800 g por 20 min) após adição de 3 L de hexano, separando-se os ácidos graxos junto com o hexano, posteriormente recuperado por rotaevaporação. Os ácidos graxos foram esterificados utilizando as seguintes condições: razão molar metanol:ácido graxo 10:1; 4 % de catalisador ( $H_2SO_4$ ) em relação à massa de ácidos graxos; 3 horas de reação; e a 200 °C. O biodiesel bruto foi destilado até 290 °C.

Os produtos finais dos processos de transesterificação, hidroesterificação e saponificação seguida de esterificação foram analisados por cromatografia gasosa (CG) para obtenção dos perfis dos ésteres metílicos, segundo metodologia descrita no ítem 4.16.7, e a eficiência da produção de biodiesel foi determinada por cálculos estequiométricos.

## 4.16. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.16.1. DENSIDADE CELULAR

A densidade celular das amostras coletadas durante os cultivos foi determinada por contagem direta em microscópio ótico (modelo Olympus SC30), utilizando uma câmara de Fuchs-Rosenthal.

### 4.16.2. DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA SECA E TEOR DE UMIDADE

A análise de biomassa seca foi realizada conforme o seguinte protocolo definido pelo CENPES/PETROBRAS: calcinou-se uma membrana a 575 °C por 1 hora para remoção de umidade; resfriou-a em dessecador e registrou-se sua massa inicial ( $m_i$ ); filtraram-se 10 mL ( $V_f$ ) de cultura de microalga na membrana; em seguida, acondicionou-se a membrana em estufa a 65 °C por 1h; resfriou-a em dessecador e registrou-se sua massa final ( $m_f$ ) para determinação da biomassa seca e, conseqüentemente, dos teores de biomassa e de umidade, de acordo com as equações 1, 2 e 3. As membranas com biomassa seca foram calcinadas a 575 °C por 1 hora para descontar as massas de cinzas. A determinação de peso seco de cada amostra foi realizada em triplicata.

$$X = \frac{(m_f - m_i) \times 1000 \times FD}{V_f} \quad \text{Equação (1)}$$

$$TS = \frac{X}{10} \quad \text{Equação (2)}$$

$$TU = 100 - TS \quad \text{Equação (3)}$$

Onde: X = concentração de biomassa seca em g L<sup>-1</sup>;  $m_i$  = massa da membrana calcinada sem a microalga filtrada (massa inicial);  $m_f$  = massa da

membrana com a microalga seca (massa final);  $V_f$  = volume de cultura de microalga filtrado; FD = fator de diluição; TS = teor de massa seca; TU = teor de umidade.

Na análise de teor de umidade de microalga, foi utilizado o protocolo a seguir: colocou-se um béquer em estufa a 102 °C durante 1 hora para remoção da umidade; esfriou-o em dessecador; registrou-se a massa do béquer; colocou-se 2 g da amostra úmida ( $m_2$ ); e acondicionou-se em estufa a 65 °C até atingir massa constante, em aproximadamente 24 horas. Decorrido esse intervalo de tempo, colocou-se o recipiente com amostra seca no dessecador, resfriou-a e registrou-se a massa final. Os teores de umidade e de sólidos foram determinados pelas equações 4 e 5. A determinação de teor de umidade de cada biomassa foi realizada em triplicata. Os teores de umidade obtidos por esta análise foram considerados na determinação de teores de lipídeos totais e de óleo.

$$TU \equiv 100 \left( 1 - \frac{m_1}{m_2} \right) \quad \text{Equação (4)}$$

$$TS \equiv 100 \times \frac{m_1}{m_2} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde: TU = teor de umidade (%); TS = teor de sólidos (%);  $m_1$  = massa da amostra após a secagem (g) (igual peso do béquer com massa seca menos peso do béquer vazio);  $m_2$  = massa inicial da amostra (g).

#### 4.16.3. DETERMINAÇÃO DE TURBIDEZ

A turbidez da cultura de microalgas foi determinada em NTU (Unidade Nefelométrica de Turbidez) e realizada em triplicata usando um turbidímetro portátil (modelo DM TU – Digimed).

#### 4.16.4. CÁLCULO DE PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA E EM LIPÍDEOS, VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO E TEMPO DE DUPLICAÇÃO

A produtividade em biomassa ( $P_x$ ), velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), o tempo de duplicação ( $Td$ ) e a produtividade em lipídeos foram determinados conforme as equações 6, 7, 8 e 9, respectivamente, descritas em ANDERSEN (2005). O  $\mu$  foi determinado na fase exponencial após averiguação da sua linearidade. O tempo de duplicação corresponde ao intervalo de tempo necessário para que ocorra a duplicação da população inteira.

$$P_x \equiv \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad \text{Equação (6)}$$

$$\mu \equiv \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i} \quad \text{Equação (7)}$$

$$Td \equiv \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Equação (8)}$$

$$P_{LT} \equiv \frac{(X_f - X_i) \times TLT}{t} \quad \text{Equação (9)}$$

Onde:  $P_x$  = produtividade em biomassa ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) ou em células ( $\text{cél mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ );  $\mu$  = velocidade específica de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ );  $Td$  = tempo de duplicação (d);  $P_{LT}$  = produtividade em lipídeos totais ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ );  $TLT$  = teor de lipídeos totais;  $X_f$  = biomassa final ( $\text{mg L}^{-1}$ ) ou densidade celular final ( $\text{cél mL}^{-1}$ );  $X_i$  = biomassa inicial ( $\text{mg L}^{-1}$ ) ou densidade celular inicial ( $\text{cél mL}^{-1}$ );  $t_f$  = tempo final (d);  $t_i$  = tempo inicial (d);  $t$  = intervalo de tempo (d).

#### 4.16.5. DETERMINAÇÃO DE TEOR DE LIPÍDEOS TOTAIS

O teor de lipídeos foi mensurado através do método de extração de lipídeos totais desenvolvido segundo BLIGH & DYER (1959) modificado e foi aplicado com a biomassa microalgácea úmida.

O processo para extração foi realizado, em triplicata, em duas etapas: na primeira, a amostra foi submetida a um pré-tratamento com ácido clorídrico para hidrolisar as células; e na segunda, os lipídeos foram extraídos com uma mistura de solventes. Após a extração, o excesso de solvente foi removido e a quantificação dos lipídeos foi realizada gravimetricamente.

Para o procedimento do pré-tratamento ácido realizou-se o seguinte: pesou-se em balança analítica uma quantidade de biomassa úmida correspondente a 400 mg de massa seca; adicionou-se 5 mL de HCl 2 mol L<sup>-1</sup> à biomassa e homogenizou com o auxílio do vortex; colocou-se o tubo em banho termostatizado a 80 °C durante 1h; centrifugou-se a 2500 g durante 15 minutos para separar a biomassa do resíduo de ácido; removeu-se o resíduo de ácido e o descartou em frasco adequado para este resíduo.

Posterior ao pré-tratamento, realizou-se o procedimento de extração de lipídeos totais, descrito a seguir: adicionou-se 4 mL de metanol à biomassa hidrolisada e homogenizou; adicionou-se à suspensão 2 mL de clorofórmio e agitou-se em vortex por 2 minutos; adicionou-se mais 2 mL de clorofórmio e agitou em vortex por 2 minutos; adicionou-se 3,6 mL de água MilliQ e agitou em vortex por 2 minutos; e centrifugou-se a 2500 g durante 15 minutos. A fase dos lipídeos em clorofórmio foi transferida para um balão já pesado e reservado. Para a re-extração dos lipídeos que ainda estavam na biomassa, adicionou-se 4 mL da solução 10 % v/v de metanol em clorofórmio às fases que restavam e agitou-se em vortex durante 2 minutos. Centrifugou-se a mistura a 2500 g durante 15 minutos, retirou-se a fase dos lipídeos e a colocou no balão juntamente com o primeiro extrato. O procedimento de re-extração foi repetido uma vez. O excesso de clorofórmio foi evaporado a 75 °C a pressão ambiente e o balão foi seco em estufa a 60 °C até obter peso constante.

O teor de lipídeos totais foi determinado de acordo com a equação 10.

$$TLT \equiv 100 \times \frac{m_3 - m_1}{m_2} \quad \text{Equação (10)}$$

Onde: *TLT* = teor de lipídeos totais; *m*<sub>1</sub> = massa do balão (g); *m*<sub>2</sub> = massa da amostra (g); *m*<sub>3</sub> = massa do balão com material extraído e seco (g).

#### 4.16.6. DETERMINAÇÃO DE TEOR DE ÓLEO

A determinação de óleo pelo método J: Schmid-Bondzynski-Ratzlaff modificado (IDF, 1986) é baseado na hidrólise da biomassa com ácido clorídrico, adição de álcool etílico e subsequente extração com éter etílico e éter de petróleo.

O procedimento foi realizado da seguinte forma: pesou-se uma quantidade de biomassa úmida correspondente a 0,5 -1,0 g de massa seca; adicionou-se 10 mL de HCl, em diferentes molaridades (3, 5 e 8 mol L<sup>-1</sup>) para determinar qual a melhor; homogenizou-se manualmente; aqueceu-se em banho a 70 °C por 10 minutos; adicionou-se 10 mL de álcool etílico e agitou manualmente por 30 segundos; adicionou-se 25 mL de éter etílico e 25 mL de éter de petróleo, agitando manualmente por 1 minuto; seguido de centrifugação a 3800 g por 15 min. A fase etérea foi separada, lavada com água MilliQ até alcançar um pH 6-7 e transferida para um balão previamente pesado. Os solventes foram evaporados a 60 °C a pressão ambiente e o balão foi seco em estufa a 60 °C até obter peso constante.

O teor de óleo foi determinado de acordo com a equação 11.

$$TO \equiv 100 \times \frac{m_3 - m_1}{m_2} \quad \text{Equação (11)}$$

Onde:  $TO$  = teor de óleo;  $m_1$  = massa do balão (g);  $m_2$  = massa da amostra (g);  $m_3$  = massa do balão com material extraído e seco (g).

#### 4.16.7. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÉSTERES METÍLICOS

A determinação do perfil de ésteres metílicos do biodiesel obtido conforme metodologia descrita no ítem 4.15, foi realizada por Cromatografia Gasosa (Cromatógrafo marca Shimadzu, modelo 2014), com o auxílio de injetor Split a 250 °C com fluxo de 20 mL min<sup>-1</sup>, detector FID a 250 °C, forno à temperatura isotérmica de 200 °C, coluna capilar Carbowax 20M (marca Quadrex) com fase estacionária de polietileno glicol e dimensões de 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm.

#### 4.16.8. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES

A quantificação de açúcares redutores totais (ART) foi determinada colorimetricamente, em triplicata, pelo método DNS (Ácido 3,5 Dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

A determinação da concentração de glicose, xilose e celobiose foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com o auxílio de uma coluna HPX-87P (BioRad®) utilizando água como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e uma temperatura de separação de 80°C.

## **CAPÍTULO 5**

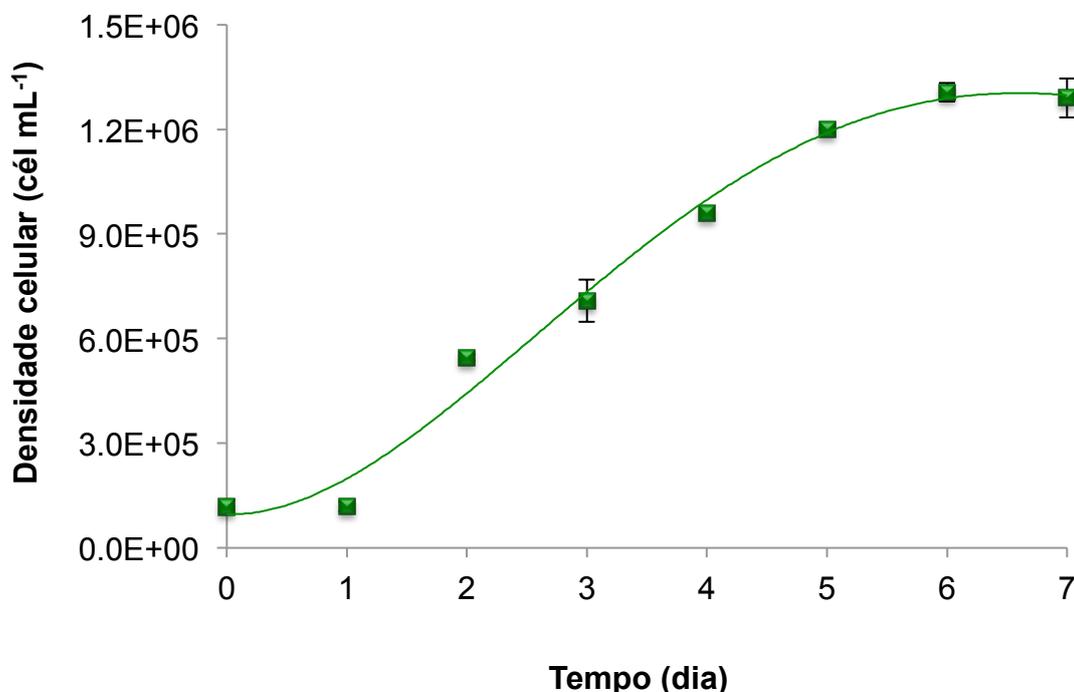
### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos e as respectivas discussões nas seguintes etapas da pesquisa: cultivo de ativação de *Scenedesmus* sp.; cultivo do inóculo; a otimização do meio AMS1 e sua validação; avaliação de diferentes meios de cultura; obtenção de glicose a partir da biomassa residual da indústria de celulose; comparação do cultivo fototrófico com o mixotrófico e heterotrófico, empregando glicose comercial e de resíduo; cultivo da microalga em garrafão e sua propagação; as diferentes bateladas de produção de microalgas em fotobiorreatores; e a produção de biodiesel por transesterificação, hidroesterificação e saponificação seguida de esterificação a partir de *Scenedesmus* sp..

#### **5.1. CULTIVO DE ATIVAÇÃO DE *Scenedesmus* sp.**

No cultivo de ativação de *Scenedesmus* sp., inicialmente foram avaliadas duas diferentes relações sólido:líquido (1:50 e 1:4) de acordo com a metodologia do item 4.4.

Na Figura 5.1 encontra-se o perfil cinético do cultivo de ativação conduzido com relação sólido:líquido (S:L) 1:50.

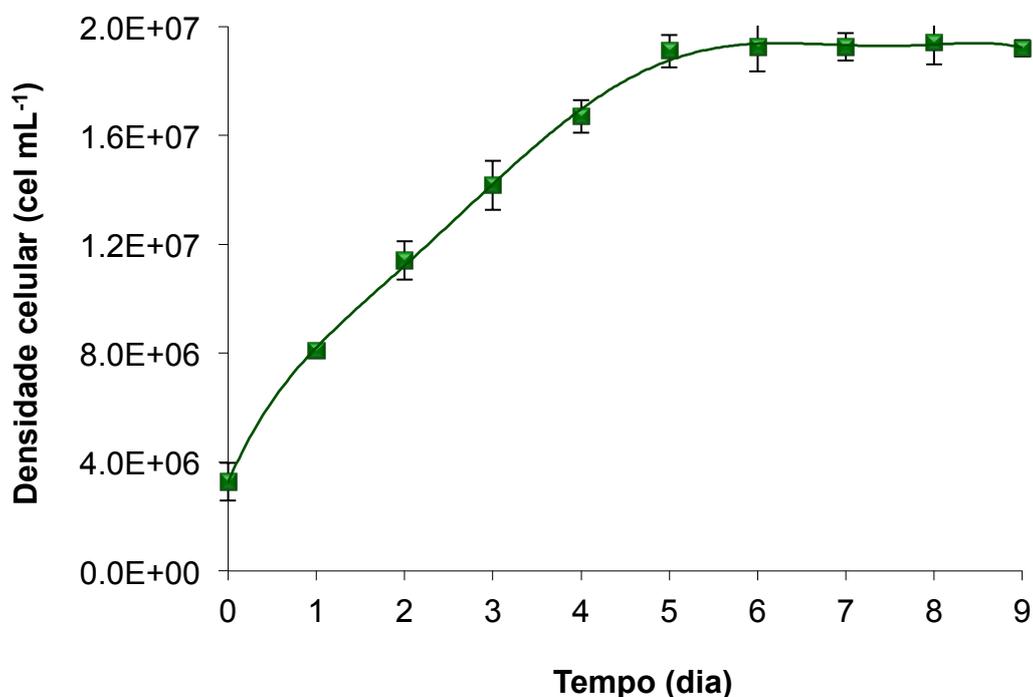


**Figura 5.1.** Cultivo de ativação de *Scenedesmus* sp. com S:L 1:50 conduzido em sistema de 250 mL sob  $400 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $1 \text{ L ar min}^{-1}$  e  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os valores s\u00e3o a m\u00e9dia de tr\u00eas r\u00e9plicas  $\pm$  desvio padr\u00e3o.

Verificou-se que a microalga apresentou, em sua curva de crescimento, fase lag com dura\u00e7\u00e3o de um dia, per\u00edodo em que ocorreu pouca ou nenhuma divis\u00e3o celular pois as c\u00e9lulas se encontravam em estado de lat\u00eancia, decorrente da mudan\u00e7a das condi\u00e7\u00f5es de cultivo. Nessa fase, a popula\u00e7\u00e3o alg\u00e1cea passa por um per\u00edodo de intensa atividade metab\u00f3lica, principalmente s\u00edntese de enzimas e de mol\u00e9culas variadas. Ap\u00f3s a fase lag, as c\u00e9lulas entraram na fase exponencial ou de crescimento com dura\u00e7\u00e3o de 4 dias. Depois disso, a microalga entra na fase estacion\u00e1ria ap\u00f3s 6 dias de cultivo, quando n\u00e3o ocorreu mais divis\u00e3o celular devido, principalmente, \u00e0 limita\u00e7\u00e3o de nutrientes, luz,  $\text{CO}_2$  e ao ac\u00famulo de metab\u00f3litos n\u00f3xios \u00e0s c\u00e9lulas (ALBERTS *et al.*, 2010).

No final da fase exponencial obteve-se uma densidade celular de  $1,31\text{E}+06$  céls  $\text{mL}^{-1}$  e com isso alcançou-se uma produtividade ( $P_x$ ) de  $2,0\text{E}+05$  céls  $\text{mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ . A taxa de crescimento analisada foi a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) (Equação 7, ítem 4.16.4) mensurada na fase exponencial, quando se atingiu  $\mu$  de  $0,58 \text{d}^{-1}$ . Ao analisar a divisão celular, o  $T_d$  (tempo de duplicação) foi de 1,2 d, ou seja, durante o crescimento linear na fase exponencial a microalga demandou aproximadamente 28 h para dobrar a densidade celular.

Na Figura 5.2 pode ser visualizado o perfil cinético do cultivo de ativação conduzido com S:L 1:4.



**Figura 5.2.** Cultivo de ativação de *Scenedesmus* sp. com S:L 1:4 conduzido em sistema de 250 mL sob  $400 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $1 \text{L}$  ar  $\text{min}^{-1}$  e  $23 \text{°C}$ . Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Neste cultivo, a microalga não apresentou fase lag detectável e iniciou seu crescimento em plena fase exponencial com duração de 5 dias, quando  $1,91\text{E}+07$  céls  $\text{mL}^{-1}$  foram obtidas e alcançou-se uma produtividade de  $3,2\text{E}+06$  céls  $\text{mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ .

O  $\mu$  alcançado foi de  $0,35 \text{ d}^{-1}$  com  $T_d$  respectivo de 1,9 d. Com isso, a microalga inicia a fase estacionária após o quinto dia.

Baseando-se nos resultados obtidos com as cinéticas de crescimento com S:L 1:50 e 1:4, foi realizada uma análise comparativa visando selecionar a melhor condição dentre aquelas estudadas.

Para esta análise, consideraram-se inicialmente os diferentes volumes de inóculo e, conseqüentemente, as diferentes densidades celulares iniciais. No cultivo com S:L 1:4 (200 mL), o volume do inóculo foi de 50 mL com densidade celular de  $1,31\text{E}+07$  céls  $\text{mL}^{-1}$ . E no cultivo com S:L 1:50 (250 mL), o volume do inóculo foi de 5 mL com densidade celular de  $5,85\text{E}+06$  céls  $\text{mL}^{-1}$ . Após a inoculação, atingiu-se uma densidade celular inicial de  $3,28\text{E}+06$  céls  $\text{mL}^{-1}$  em S:L 1:4, 28 vezes maior que  $X_i$  de S:L 1:50 ( $1,17\text{E}+05$  céls  $\text{mL}^{-1}$ ).

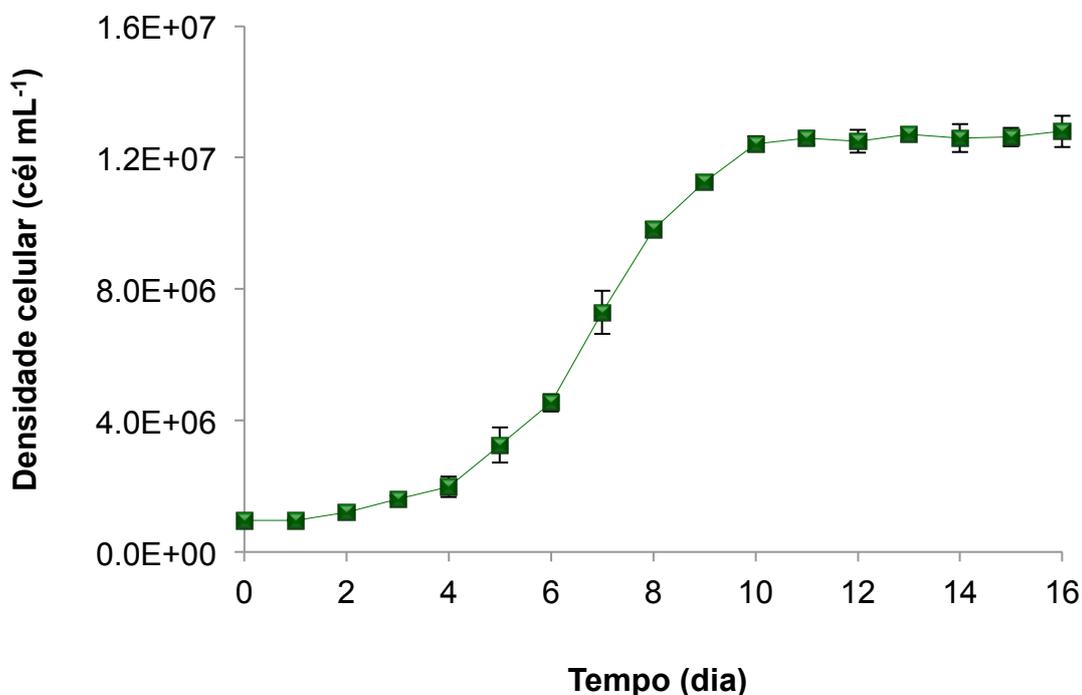
Ao final de 5 dias, o cultivo com S:L 1:4 atingiu uma densidade celular ( $X_f = 1,9\text{E}+07$  céls  $\text{mL}^{-1}$ ) 16 vezes maior que aquela alcançada no cultivo 1:50 ( $X_f = 1,2\text{E}+06$  céls  $\text{mL}^{-1}$ ). Assim, ao aumentar  $X_i$  22 vezes de 1:50 para 1:4, não se aumentou  $X_f$  em 22 vezes, e sim em 16 vezes, mostrando claramente que não existe uma proporcionalidade entre  $X_i$  e  $X_f$ . Ao analisar  $P_x$  para 5 dias de cultivo, a da cultura 1:4 ( $3,2\text{E}+06$  céls  $\text{mL}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) foi 93,3 % maior que aquela do cultivo 1:50 ( $2,1\text{E}+05$  céls  $\text{mL}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ).

Desta forma, decidiu-se dar continuidade ao trabalho empregando uma relação sólido:líquido 1:4 no cultivo de ativação conduzido por 5 dias ou até que alcançasse  $1,93 \pm 0,20\text{E}+07$  céls  $\text{mL}^{-1}$ . A partir deste ponto, a cultura do cultivo de ativação foi realizada nas condições selecionadas e utilizada no cultivo do inóculo, cujos resultados e discussões encontram-se no ítem a seguir.

## 5.2. CULTIVO DO INÓCULO DE *Scenedesmus* sp.

A Figura 5.3 apresenta o perfil cinético do cultivo do inóculo realizado com relação sólido:líquido 1:4. A densidade de células permaneceu constante nas primeiras 24 h e a fase exponencial teve início no dia 4. Após 10 dias de crescimento, as máximas densidade celular e produtividade em células de  $1,24\text{E}+07$

céls mL<sup>-1</sup> e 1,17E+06 céls mL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente, foram atingidas. O  $\mu$  de 0,40 d<sup>-1</sup> conferiu um tempo de duplicação de 1,7 d na fase exponencial.



**Figura 5.3.** Cultivo do inóculo de *Scenedesmus* sp. com S:L 1:4 conduzido em sistema de 1 L sob 400  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 L ar  $\text{min}^{-1}$  e 23 °C. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Na Figura 5.4, encontram-se imagens do inóculo nos dias 0 e 10, nas quais visualiza-se claramente o grande aumento da densidade celular.

De acordo com os resultados obtidos, os inóculos seguintes foram conduzidos por até 10 dias, ou até que atingissem  $1,4 \pm 0,13 \text{E}+07$  céls mL<sup>-1</sup>, e utilizados como inóculo na otimização do meio de cultura ASM1, na avaliação de diferentes meios de culturas, nos diferentes tipos de cultivos e no cultivo de garrafão, cujos resultados e discussões encontram-se nas próximas seções.

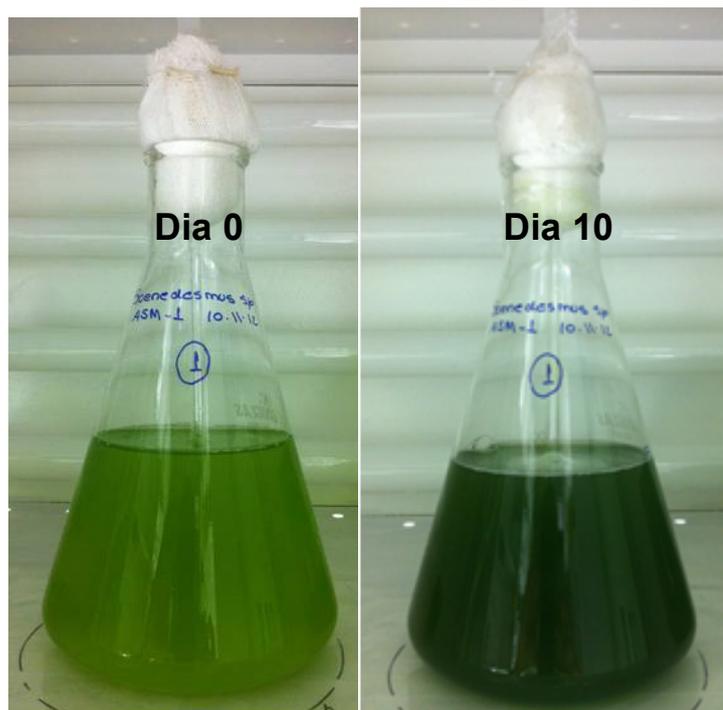


Figura 5.4. Imagens do cultivo do inóculo de *Scenedesmus* sp. nos dias 0 e 10.

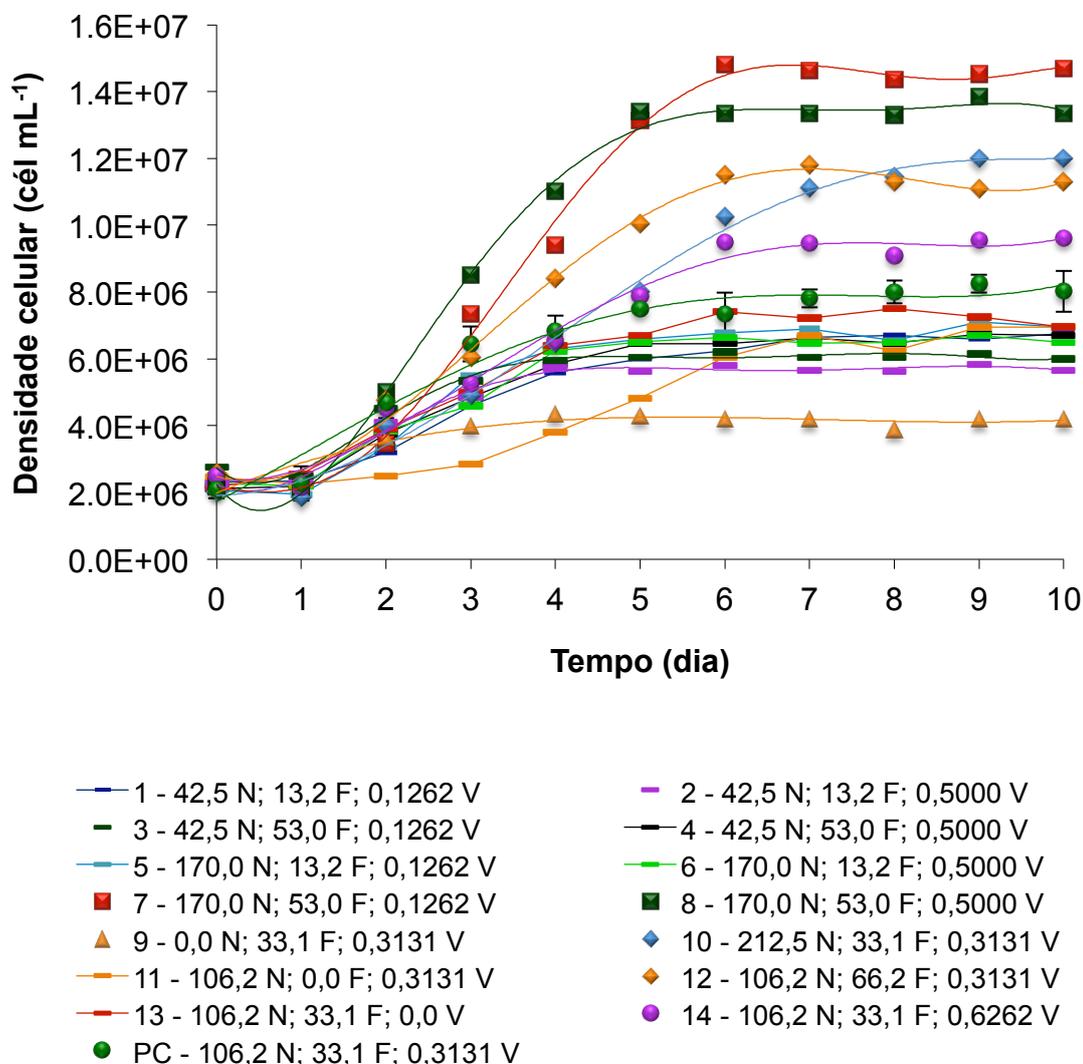
### 5.3. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA ASM1

Nesta etapa de trabalho almejou-se otimizar as concentrações de nitrato, fosfato e vitamina do meio AMS1 para maximizar a densidade final de células, o teor de lipídeos totais e a produtividade em lipídeos totais, selecionadas como variáveis de resposta do cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp.. Para isso, realizou-se um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) variando as concentrações dos nutrientes de acordo com as Tabelas 4.2, composto de 18 experimentos e com quatro réplicas do ponto central (PC).

Na Figura 5.5 são apresentados os perfis cinéticos dos cultivos fototróficos do DCCR construídos a partir das densidades celulares.

No final dos cultivos, 10 dias, a densidade de células dos experimentos variou de  $4,2E+06$  a  $1,47E+07$  céls  $mL^{-1}$ . A densidade celular mais baixa foi alcançada no experimento 9, cujo meio de cultura não continha nitrato. A mais alta foi obtida com o experimento 7, cujo meio continha concentrações de nitrato ( $170 \text{ mg L}^{-1}$ ) e fosfato ( $53 \text{ mg L}^{-1}$ ) em seu nível fatorial superior (+1) e vitamina ( $0,1262 \text{ mg L}^{-1}$ ) em seu nível fatorial inferior (-1). Empregando as mesmas concentrações de nitrato e fosfato

e mais vitamina ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) no experimento 8, obteve-se resultado ( $1,34\text{E}+07$  céls  $\text{mL}^{-1}$ ) similar ao do 7 ( $1,47\text{E}+07$  céls  $\text{mL}^{-1}$ ).



**Figura 5.5.** Perfis cinéticos dos cultivos de *Scenedesmus* sp. do DCCR conduzidos em sistema de 1 L sob  $400 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 1 L ar  $\text{min}^{-1}$  e  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ . Legenda: n\u00famero do experimento – condi\u00e7\u00f5es (concentra\u00e7\u00e3o de nitrato (N), fosfato (F) e vitamina (V) em  $\text{mg L}^{-1}$ ). (PC) – Ponto Central. Os valores de PC s\u00e3o a m\u00e9dia de quatro r\u00e9plicas  $\pm$  desvio padr\u00e3o.

Com os experimentos 10 e 12 alcan\u00e7aram-se densidades de  $1,2\text{E}+07$  e  $1,13\text{E}+07$  céls  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Isto demonstrou que quando se mantiveram as concentra\u00e7\u00f5es de fosfato ( $33,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e vitamina ( $0,3131 \text{ mg L}^{-1}$ ) em seus pontos centrais e usou o n\u00edvel axial superior ( $+\alpha$ ) para nitrato ( $212,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) no experimento 10, foi t\u00e3o bom quanto ter mantido o nitrato ( $106,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) e vitamina ( $0,3131 \text{ mg L}^{-1}$ )

nos seus pontos centrais e utilizado o  $+\alpha$  do fosfato ( $66,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) no experimento 12. Quando se compara os resultados do 10 e 12 com o resultado médio dos pontos centrais (PC),  $8,0\text{E}+06 \text{ céls mL}^{-1}$ , nos quais ambas concentrações foram mantidas no ponto intermediário ( $106,2 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato,  $33,1 \text{ mg L}^{-1}$  de fosfato e  $0,3131 \text{ mg L}^{-1}$  de vitamina), verificou-se que o aumento da concentração de nitrato ou fosfato conferiu um aumento da densidade celular de aproximadamente 45 %.

Na Tabela 5.1 estão sumarizadas as produtividades em células ( $P_x$ ), as velocidades de crescimento ( $\mu$ ) e os tempos de duplicação ( $T_d$ ) alcançados no final de cada experimento.

**Tabela 5.1.** Produtividades em células ( $P_x$ ), velocidade de crescimento ( $\mu$ ) e tempos de duplicação ( $T_d$ ) dos cultivos do DCCR após dez dias.

Experimento – concentrações de nutrientes ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$P_x$ ( $\text{cél mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )	$\mu$ ( $\text{d}^{-1}$ )	$T_d$ (d)
1 – 42,5 N 13,2 F 0,126 V	6,75E+05	0,29	2,4
2 – 42,5 N 13,2 F 0,50 V	5,65E+05	0,30	2,3
3 – 42,5 N 53 F 0,126 V	6,00E+05	0,38	1,8
4 – 42,5 N 53 F 0,50 V	6,70E+05	0,27	2,6
5 – 170 N 13,2 F 0,126 V	6,95E+05	0,39	1,8
6 – 170 N 13,2 F 0,5 V	6,50E+05	0,35	1,9
7 – 170 N 53 F 0,126 V	1,47E+06	0,49	1,4
8 – 170 N 53 F 0,5 V	1,34E+06	0,62	1,2
9 – 0 N 33,1 F 0,3131 V	4,20E+05	0,29	2,4
10 – 212,5 N 33,1 F 0,3131 V	1,20E+06	0,34	2,0
11 – 106,2 N 0 F 0,3131 V	6,95E+05	0,21	3,2
12 – 106,2 N 66,2 F 0,3131 V	1,13E+06	0,37	1,8
13 – 106,2 N 33,1 F 0 V	6,95E+05	0,24	2,9
14 – 106,2 N 33,1 F 0,626 V	9,60E+05	0,30	2,3
PC – 106,2 N 33,1 F 0,3131 V	8,03±0,62E+05	0,52±0,02	1,33±0,23

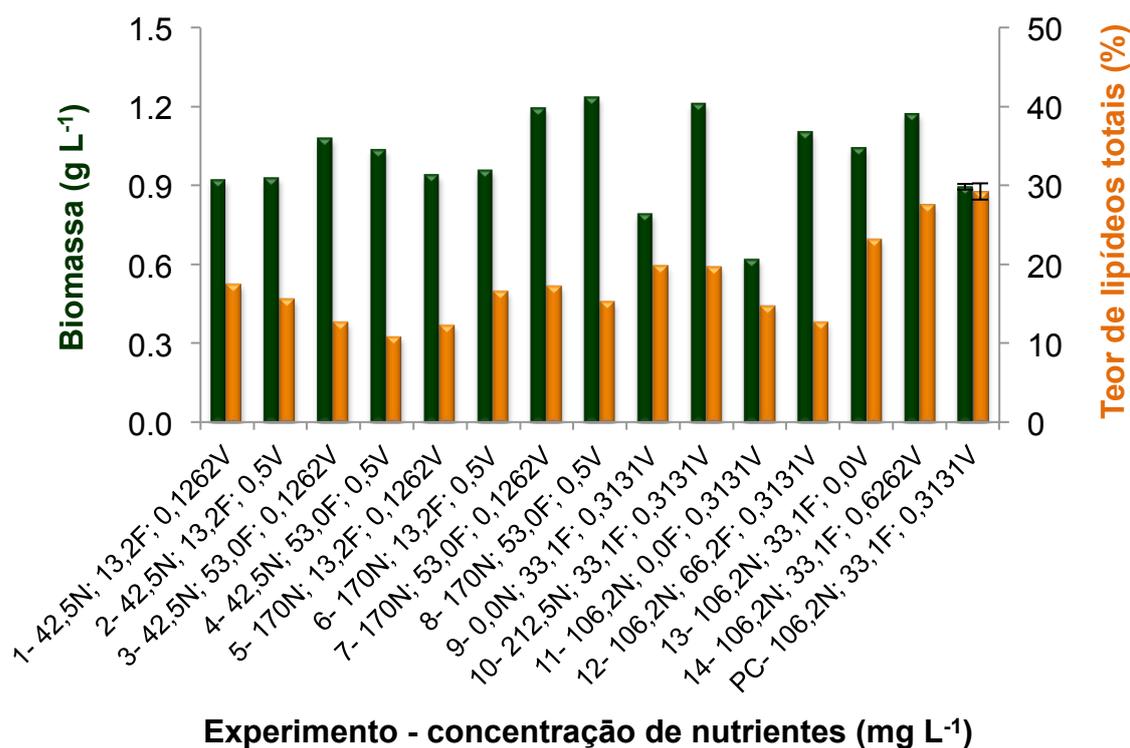
(N) – Nitrato, (F) – Fosfato, (V) – Vitamina, (PC) – Ponto Central. Os valores de PC são a média de quatro réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Neste estudo, as máximas produtividades em células foram atingidas nos experimentos 7 e 8,  $1,47E+06$  e  $1,34E+06$  céls mL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente. Sendo que no 8, atingiram-se o menor Td (1,2 d) e o maior  $\mu$  (0,62 d<sup>-1</sup>), mostrando que neste cultivo a população praticamente dobrou a cada 24 h durante a fase exponencial. Enquanto no experimento 11, onde não havia fosfato, a população levou o máximo de tempo para dobrar, Td de 3,2 dias.

A máxima velocidade específica de crescimento (0,62 d<sup>-1</sup>) alcançada por *Scenedesmus* sp. SCIB-01 no DCCR foi bem maior que aquela obtida com outras linhagens de *Scenedesmus* sp. (0,10 – 0,16 d<sup>-1</sup>), de acordo com os trabalhos reportados por ARAVANTINO *et al.* (2013), ANDRULEVICIUTE *et al.* (2014) e BASU *et al.* (2014). ARAVANTINO *et al.* (2013) empregou meio BG11, sistema de 3 L, 22 °C, 150  $\mu$ mol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> por 24 h e 3 L ar min<sup>-1</sup>. BASU *et al.* (2014) realizou o cultivo em sistema de 5 L, 25±1 °C, 6000 lux e fotoperíodo 14:10; e ao empregar de 15 a 35 % de CO<sub>2</sub> conseguiram aumentar o  $\mu$  para 0,18 - 0,64 d<sup>-1</sup>. Já ANDRULEVICIUTE *et al.* (2014) realizaram cultivos fototróficos utilizando meio BG11, pH 7,6±0,3, sistema de 3 L, 22±2 °C, 250  $\mu$ mol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo 8:16 e agitados manualmente várias vezes ao dia. O  $\mu$  de SCIB-01 ainda foi bem maior que o das espécies *Chlorella* sp. (0,16 d<sup>-1</sup>), *Haematococcus* sp. (0,13 d<sup>-1</sup>) e *Nannochloropsis* sp. (0,13 d<sup>-1</sup>) também estudadas por ANDRULEVICIUTE *et al.* (2014).

Na Figura 5.6 é possível visualizar comparativamente as biomassas secas e os teores de lipídeos totais alcançados no DCCR após 10 dias de cultivo.

Ao analisar os valores de biomassa seca, a máxima obtida foi com o experimento 8 (1,24 g L<sup>-1</sup>), onde todos os nutrientes estavam em concentrações no seu nível fatorial superior (+1), 170 mg L<sup>-1</sup> de nitrato, 53 mg L<sup>-1</sup> de fosfato e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de vitamina. Com o experimento 10 foi alcançada a segunda maior biomassa, 1,21 g L<sup>-1</sup>, onde o fosfato (33,1 mg L<sup>-1</sup>) e vitamina (0,3131 mg L<sup>-1</sup>) estavam em seus pontos centrais e o nitrato em + $\alpha$ , 212,5 mg L<sup>-1</sup>. O terceiro melhor resultado para biomassa (1,17 g L<sup>-1</sup>) foi o do experimento 7, com concentrações altas de nitrato e fosfato. Em contrapartida, nos experimentos 11 (sem fosfato) e 9 (sem nitrato) foram atingidas as menores biomassas, 0,61 e 0,80 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 5.6.** Biomassa e teor de lipídeos totais de *Scenedesmus* sp. alcançados em cada cultivo do DCCR após dez dias. Nitrato (N), fosfato (F), vitamina (V), Ponto Central (PC). Os valores de PC são a média de quatro réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Desta forma, a variação das concentrações de nitrato, fosfato e vitamina influenciaram muito os valores de biomassa seca finais, que variou de 0,62 a 1,24 g L<sup>-1</sup>, indicando o quanto estes nutrientes são importantes.

O valor máximo de biomassa obtida com SCIB-01 foi 2,3 vezes maior que aquela reportada por ANDRULEVICIUTE *et al.* (2014) quando cultivou *Scenedesmus obliquus* com CO<sub>2</sub> do ambiente (0,54 g L<sup>-1</sup>) e similar aquela obtida quando a mesma microalga foi cultivada com 35 % de CO<sub>2</sub> (1,29 g L<sup>-1</sup>).

HO *et al.* (2012) atingiu 1,34 g L<sup>-1</sup> de biomassa quando cultivou *S. obliquus* com 2,5 % de CO<sub>2</sub>, meio DM, sistema de 1 L, pH 6,2, 300 rpm, 140  $\mu$ mol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 28 °C. Enquanto TANG *et al.* (2011) cultivou *S. obliquus* com 30 % de CO<sub>2</sub> e obteve 1,03 g L<sup>-1</sup> de biomassa.

Jl *et al.* (2014) reportou um máximo de 0,41 g L<sup>-1</sup> de biomassa de *Desmosdesmus* sp. cultivada fototroficamente por 14 dias em BG11, pH 7,0, sistema de 100 mL, 24 $\pm$ 1 °C, 120  $\mu$ mol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo 15:9 e 10 % de CO<sub>2</sub>.

Com isso, verificou-se que mesmo em altas concentrações de CO<sub>2</sub>, trabalhos da literatura reportaram concentrações de biomassa menores ou similares àquela alcançada com SCIB-01.

Em relação aos teores de lipídeos totais (TLT) do DCCR do presente trabalho, foram obtidos desde 10,9 até 29,3 % em relação à biomassa seca. Os maiores TLT foram mensuradas nos experimentos 14 e PCs, 27,6 e 29,3±1,0 %, respectivamente, quando os pontos centrais do nitrato (106,2 mg L<sup>-1</sup>) e fosfato (33,1 mg L<sup>-1</sup>) foram avaliados. Comparando o 14 com o 13, verificou que foi melhor ter usado o máximo de vitamina (0,62 mg L<sup>-1</sup>) do que 0 mg L<sup>-1</sup>, pois esta concentração reduziu TLT em 16 % (23,3 %). Quando retirou o nitrato do meio no experimento 9 ou o utilizou em concentração máxima (212,5 mg L<sup>-1</sup>) no experimento 10, alcançaram-se TLT muito similares, 19,9 e 19,8 %, respectivamente. Ao retirar o fosfato do meio de cultura, reduziu-se TLT em 49 %, como pode ser verificado no experimento 11 (106,2 mg L<sup>-1</sup> de nitrato, 0 mg L<sup>-1</sup> de fosfato e 0,3131 mg L<sup>-1</sup> de vitamina), com o qual se atingiu 14,8 %. O resultado piorou quando se usou o máximo de fosfato no experimento 12 (106,2 mg L<sup>-1</sup> de nitrato, 66,2 mg L<sup>-1</sup> de fosfatos e 0,3131 mg L<sup>-1</sup> de vitaminas), reduzindo o TLT em 56 % (12,8 %).

Ficou evidenciado que o aumento das concentrações de nitrato e fosfato conferiu um aumento da biomassa final e ao manter as concentrações de todos os nutrientes no nível 0 ou próximas à ele, aumentou consideravelmente o teor de lipídeos.

Geralmente, a microalga acumula lipídeos sob limitações de nutrientes quando as fontes de energia (luz) e carbobo (CO<sub>2</sub>) estão acessíveis e os mecanismos celulares para a fotossíntese estão ativados.

No presente estudo, SCIB-01 acumulou um teor de lipídeos 2 vezes maior ao reportado por ZHAO *et al.* (2012) quando cultivou *S. quadricauda* com CO<sub>2</sub> atmosférico (15 %) e similar ao do cultivo com 2 % de CO<sub>2</sub> (28,1 %), utilizando BG11, pH 6,5 – 7,5, sistema de 2,3 L, 27 °C, 70 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 2 L ar min<sup>-1</sup>.

CONVERTI *et al.* (2009) atingiu TLT de aproximadamente 15 % com *C. vulgaris* e *N. oculata* quando as cultivaram em BBM a 25 °C e f/2 a 15 °C, respectivamente, utilizando sistemas de 2 L, 70 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 300 rpm e ar atmosférico.

Enquanto ANDRULEVICIUTE *et al.* (2014) alcançaram TLT de 15,1 %, 16,2 %, 15,9 % e 16,2 % com *Scenedesmus* sp., *Haematococcus* sp., *Chlorella* sp., e *Nannochloropsis* sp., respectivamente, cultivada fototroficamente.

Resultados similares ao deste trabalho (29,3 %) foram reportados por PRAVEENKUMAR *et al.* (2012) que obtiveram acúmulos de 31,2 %, 31,9 % e 31,5 % de lipídeos em biomassa seca de *Chlorella* sp. ao cultivá-la em meio Chu10, Chu10 sem fosfato e Chu10 sem ferro, respectivamente, sob 70  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo 12:12 e 24 °C. Estes pesquisadores alcançaram teores ainda maiores ao conduzir cultivos sob ausência de nitrato e dos 3 nutrientes juntos (nitrato, fosfato e ferro), 42,8 e 40,8 %, respectivamente.

LIU *et al.* (2010) relataram que uma faixa de 20 a 40 % de TLT em massa seca é comumente encontrada em trabalhos que cultivam a microalga *Scenedesmus* sp.

Na Tabela 5.2 estão sumarizadas as produtividades em biomassa seca ( $P_X$ ) e em lipídeos totais ( $P_{LT}$ ) alcançados no final de cada experimento do DCCR.

As melhores condições para atingir os maiores TLT também foram as mesmas para alcançar a máxima  $P_{LT}$  (32,4  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ). Pode ser visualizado através dos experimentos 13, 14 e PC que o aumento da concentração de vitamina, mantendo nitrato e fosfato constantes, também proporcionou um aumento significativo na produtividade em lipídeos.

A máxima  $P_X$  foi de 123,6  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , maior que as obtidas por ANDRULEVICIUTE *et al.* (2014) ao cultivarem fototroficamente *Chlorella* sp. (89  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), *Scenedesmus* sp. (94  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), *Haematococcus* sp. (51  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) e *Nannochloropsis* sp. (78  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ).

TANG *et al.* (2011) cultivaram *S. obliquus* e obtiveram uma produtividade em biomassa de 81  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , 35 % menor que a da SCIB-01. BASU *et al.* (2014) ultrapassou a  $P_X$  de SCIB-01 ao cultivar *S. obliquus* em 35 % de  $\text{CO}_2$ , 139,4  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ .

Foi claramente observado que a densidade celular, biomassa,  $P_X$ , TLT e  $P_{LT}$  foram diferentemente influenciados pelas concentrações de nutrientes. Ao comparar o meio ASM1 original com o meio ASM1 modificado, contendo 38 % menos de nitrato e fosfato e com 0,31  $\text{mg L}^{-1}$  de vitamina, verificou-se que com

este foi possível aumentar TLT e  $P_{LT}$  em 90 e 55 %, respectivamente, em relação aquele.

**Tabela 5.2.** Produtividades em biomassa seca ( $P_X$ ) e em lipídeos totais ( $P_{LT}$ ) dos cultivos do DCCR após dez dias.

Experimento – concentrações de nutrientes ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$P_X$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	$P_{LT}$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )
1 – 42,5 N 13,2 F 0,126 V	92,4	16,2
2 – 42,5 N 13,2 F 0,50 V	93,0	14,6
3 – 42,5 N 53 F 0,126 V	108,0	13,8
4 – 42,5 N 53 F 0,50 V	103,8	11,3
5 – 170 N 13,2 F 0,126 V	94,2	11,7
6 – 170 N 13,2 F 0,5 V	96,0	15,9
7 – 170 N 53 F 0,126 V	119,4	20,7
8 – 170 N 53 F 0,5 V	123,6	19,0
9 – 0 N 33,1 F 0,3131 V	79,5	15,8
10 – 212,5 N 33,1 F 0,3131 V	121,2	23,9
11 – 106,2 N 0 F 0,3131 V	62,1	9,2
12 – 106,2 N 66,2 F 0,3131 V	110,4	14,2
13 – 106,2 N 33,1 F 0 V	104,4	24,3
14 – 106,2 N 33,1 F 0,626 V	117,3	32,4
PC – 106,2 N 33,1 F 0,3131 V	89,5±10,9	26,2±1,72

(N) – Nitrato, (F) – Fosfato, (V) – Vitamina, (PC) – Ponto Central. Os valores de PC são a média de quatro réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Na Figura 5.7, encontram-se imagens dos 18 experimentos do DCCR após 10 dias de cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp..

Na análise estatística dos resultados do DCCR, o gráfico de Pareto foi construído utilizando o *software* Statistica, permitindo visualizar tanto graficamente como numericamente os efeitos padronizados ou  $t_{\text{calculados}}$  de cada variável independente, assim como o de suas interações. Neste gráfico, os efeitos são

representados por barras, sendo que apenas aquelas que ultrapassam o valor de 0,05 para o *p*-valor apresentam significância estatística. O valor deste parâmetro garante, com um nível de confiança de 95 %, que um determinado fator influencia a variável de resposta analisada (MONTGOMERY & CALADO, 2003).



**Figura 5.7.** Imagens dos cultivos de *Scenedesmus* sp. no DCCR para otimizar o meio ASM1.

A Figura 5.8 apresenta o gráfico de Pareto construído para a densidade celular selecionada como variável de resposta. É possível visualizar que o maior efeito linear e positivo (12,98) foi gerado pelo nitrato, seguido do efeito linear e positivo (9,78) do fosfato e do efeito da interação entre tais variáveis (8,22), todos estatisticamente significativos.

Os efeitos lineares positivos confirmam que ao aumentar a concentração de nitrato e fosfato do nível mínimo para o máximo, resultou num aumento da densidade celular (Figura 5.8). O efeito significativo da interação entre nitrato e

fosfato mostrou que utilizando os dois nutrientes juntos conferiu um resultado maior do que o uso deles separados. Verificou-se também que não houve interações significativas do nitrato e fosfato com a vitamina (1Lx3L e 2Lx3L). Isto significa que o nitrato e o fosfato apresentaram efeitos sobre a densidade celular sem interferência da vitamina (Figura 5.8).

O efeito linear ou quadrático da vitamina não apresentou significância estatística a nível de 95 % de confiança, assim como os efeitos quadráticos de nitrato e fosfato, mostrando que dentro da faixa estudada não houve presença de curvatura (Figura 5.8).

A Figura 5.9 apresenta o gráfico de Pareto construído para o teor de lipídeos totais. O maior efeito significativo foi o quadrático negativo de fosfato (-24,84), seguido dos efeitos quadráticos negativos de nitrato (-15,78) e vitamina (-7,32) e da interação entre os efeitos lineares de nitrato e fosfato.

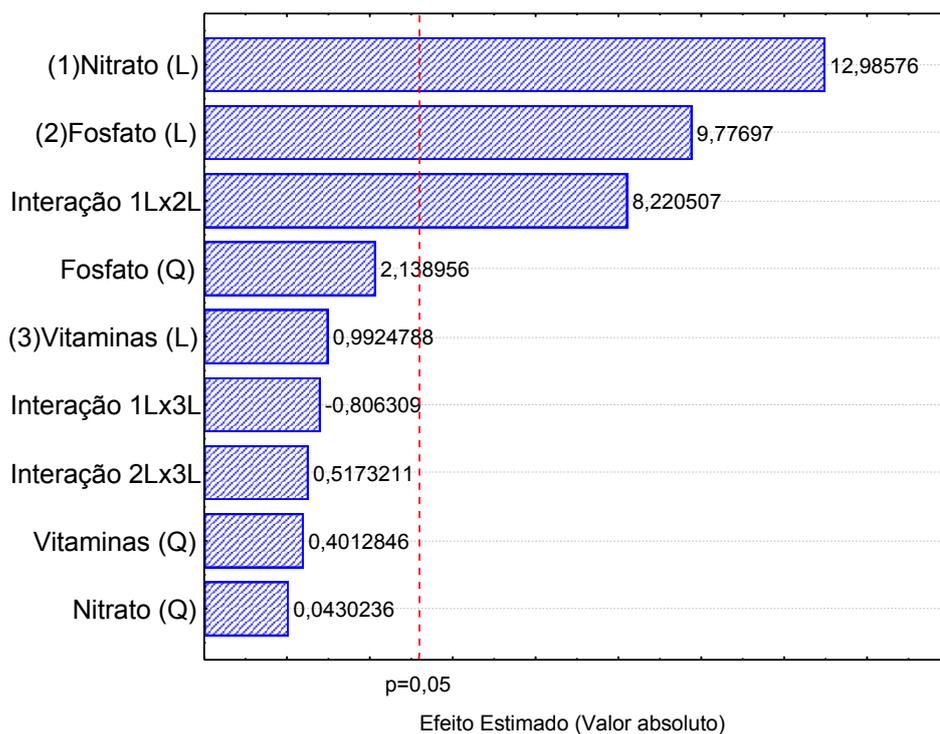
Os efeitos quadráticos negativos significativos indicam comportamento curvilíneo convexo em determinada região da superfície de resposta, referente à maximização da resposta.

Os efeitos da interação do nitrato e fosfato com a vitamina foram considerados marginalmente significativos, uma vez que seus *p-valores* estavam muito próximos do valor considerado (0,05): interação 1Lx3L igual à 0,08 e 2Lx3L igual à 0,07 (Figura 5.9).

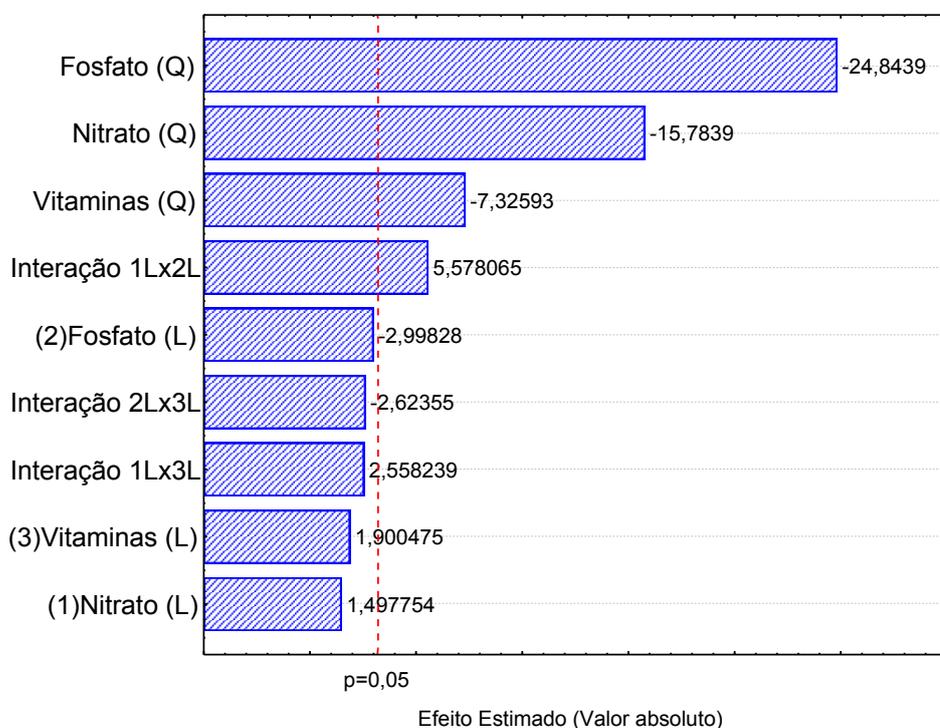
Baseado nisto, determinou-se que somente com a presença de nitrato, fosfato e vitamina juntos foi possível aumentar consideravelmente o teor de lipídeos totais.

A Figura 5.10 apresenta o gráfico de Pareto construído para a produtividade em lipídeos totais. O maior efeito significativo foi o quadrático negativo de fosfato (-26,48), seguido dos efeitos quadrático negativo (-13,89) e linear negativo (-8,38) de nitrato, (-15,78), da interação entre os efeitos lineares de nitrato e fosfato (1Lx2L) e dos efeitos lineares negativo e positivo do fosfato e vitamina, respectivamente.

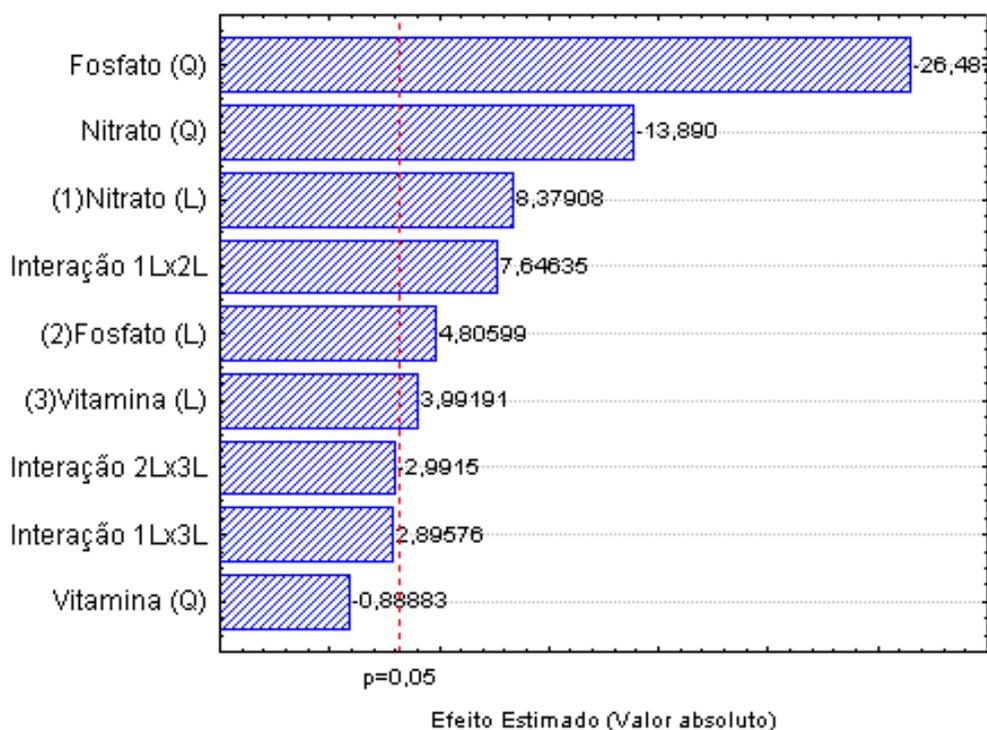
O planejamento experimental apresentou coeficientes de correlação,  $R^2$ , de 0,95, 0,88 e 0,86 para densidade celular, TLT e  $P_{LT}$ , respectivamente, mostrando que o modelo se ajustou aos resultados em, no mínimo, 86 % dos casos.



**Figura 5.8.** Gráfico de Pareto para a densidade de células como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp.



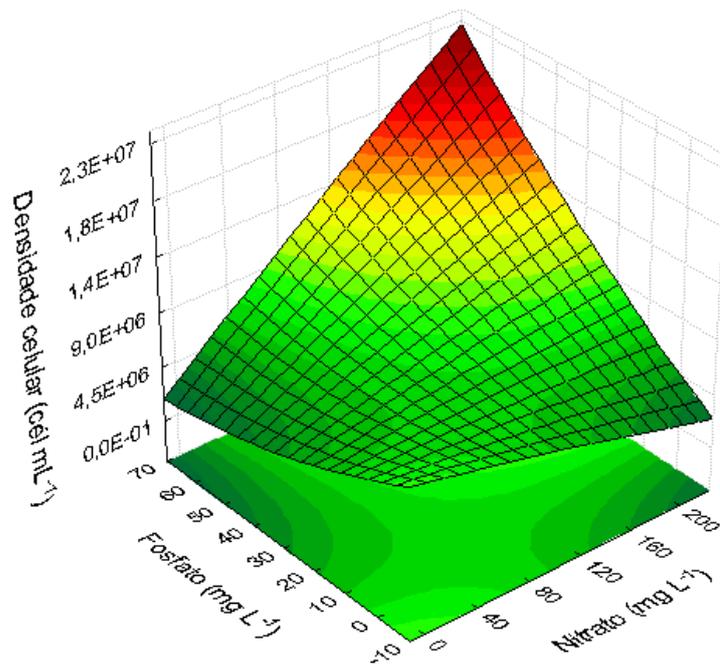
**Figura 5.9.** Gráfico de Pareto para o teor de lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp.



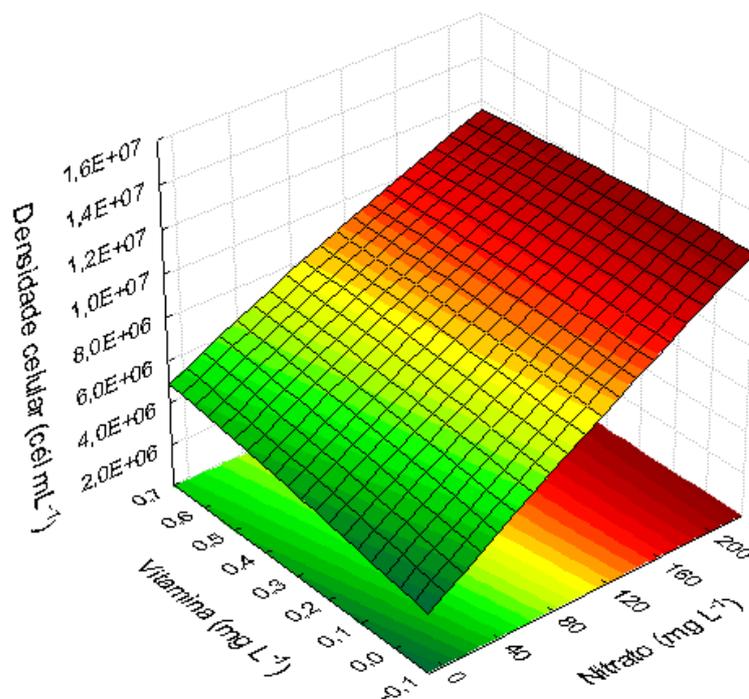
**Figura 5.10.** Gráfico de Pareto para o produtividade em lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp.

Através das superfícies de respostas geradas pelos modelos obtidos a partir dos resultados de densidade celular (Figuras 5.11, 5.12 e 5.13), verificou-se que o aumento das concentrações de nitrato e fosfato, do nível inferior ( $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) para o superior ( $212,5$  e  $66,2 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente), conduziu aos maiores valores de densidades celulares finais (até  $2,0\text{E}+07 \text{ céls mL}^{-1}$ ), independente do valor da concentração de vitamina. Tais superfícies mostraram que o cultivo fototrófico não foi otimizado para a densidade celular, uma vez que o ponto máximo da curvatura da superfície não foi alcançado. Isto poderia ter sido obtido se aumentasse mais ainda as concentrações de nitrato e fosfato do meio de cultura ASM1 original ( $170 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato e  $53 \text{ mg L}^{-1}$  de fosfato).

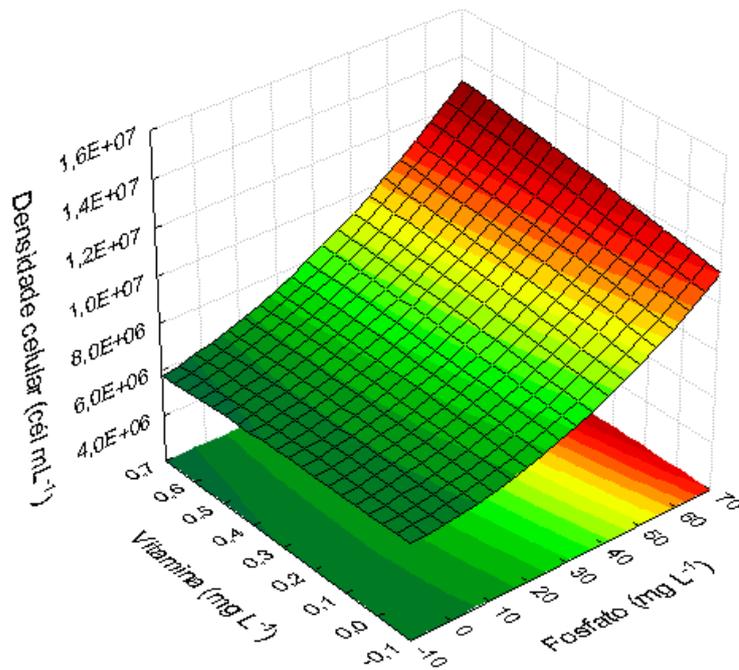
As superfícies de respostas para o teor de lipídeos como variável de resposta são apresentadas nas Figuras 5.14, 5.15 e 5.16. E para a produtividade em lipídeos como resposta são apresentadas nas Figuras 5.17, 5.18 e 5.19. Verificou-se um ponto máximo em todas as superfícies, tanto em função de nitrato e fosfato e nitrato e vitamina como em função de fosfato e vitamina.



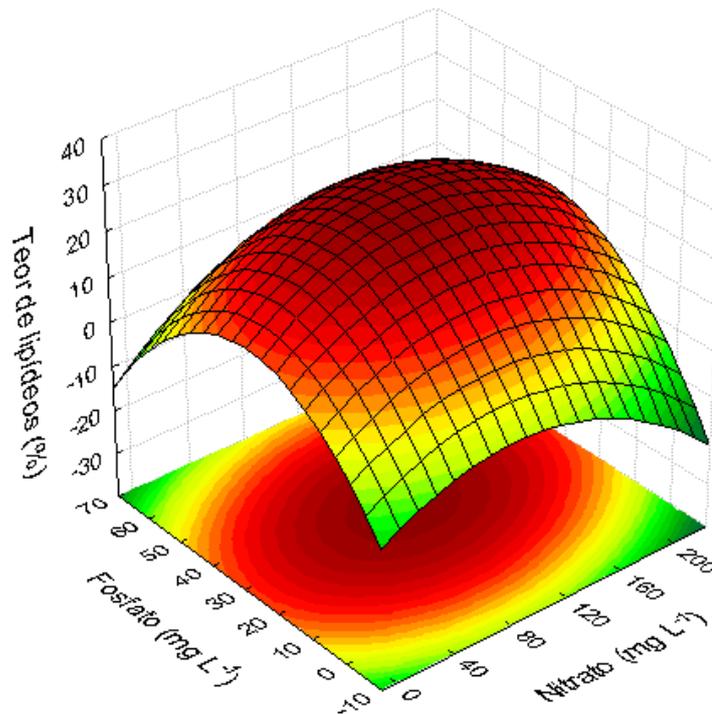
**Figura 5.11.** Superfície de resposta em função de nitrato e fosfato para a densidade celular como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp..



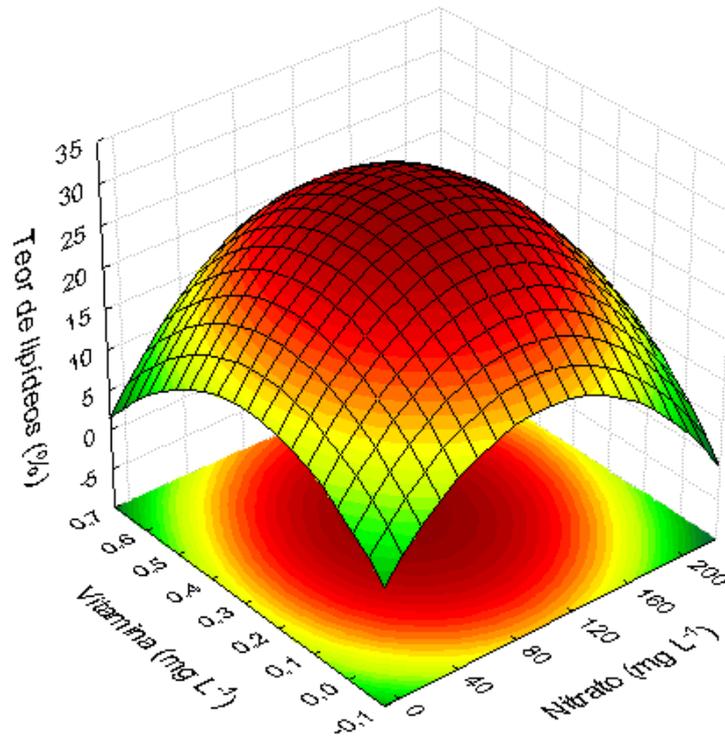
**Figura 5.12.** Superfície de resposta em função de nitrato e vitamina para a densidade celular como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp..



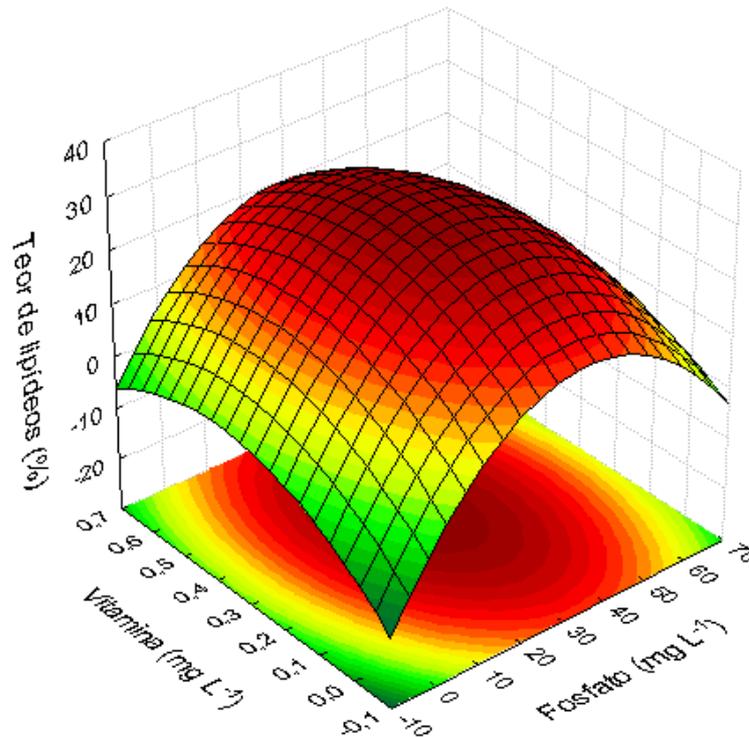
**Figura 5.13.** Superfície de resposta em função de fosfato e vitamina para a densidade celular como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp..



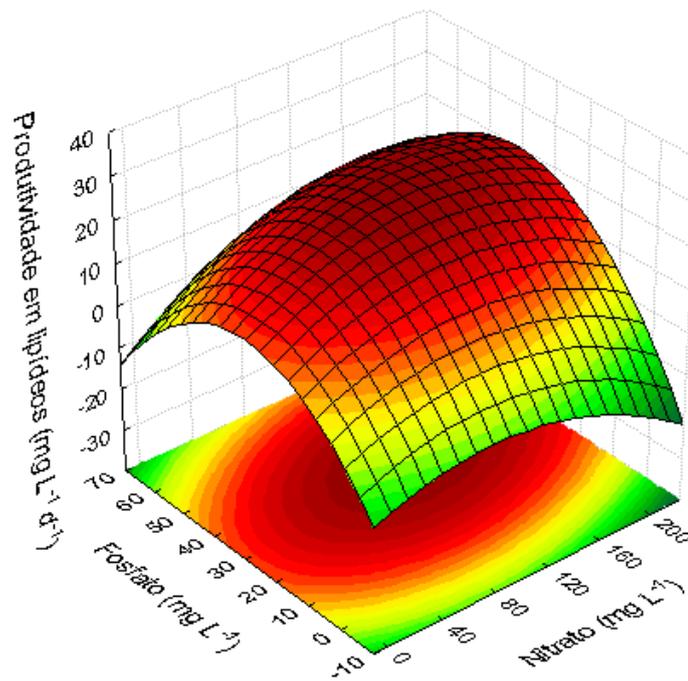
**Figura 5.14.** Superfície de resposta em função de nitrato e fosfato para o teor de lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp..



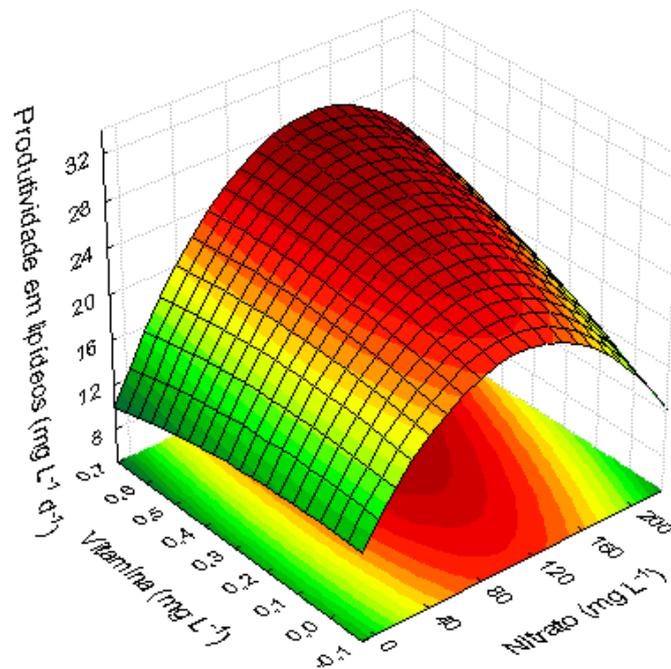
**Figura 5.15.** Superfície de resposta em função de nitrato e vitamina para o teor de lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp..



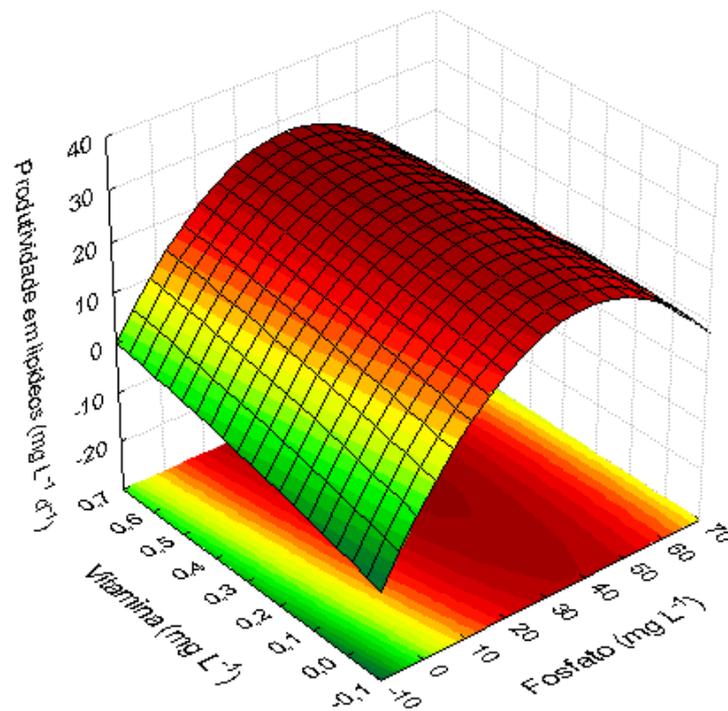
**Figura 5.16.** Superfície de resposta em função de fosfato e vitamina para o teor de lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp..



**Figura 5.17.** Superfície de resposta em função de nitrato e fosfato para a produtividade em lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp..



**Figura 5.18.** Superfície de resposta em função de nitrato e vitamina para a produtividade em lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp..



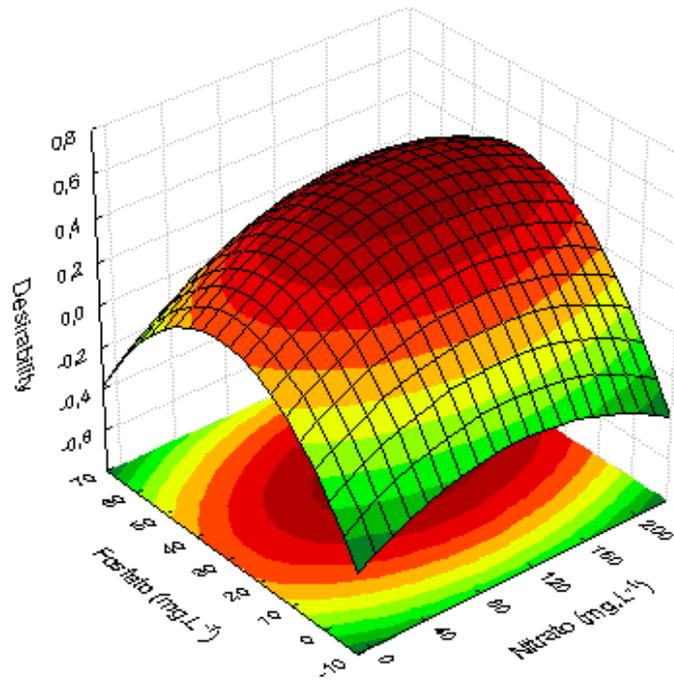
**Figura 5.19.** Superfície de resposta em função de vitamina e fosfato para a produtividade em lipídeos totais como variável de resposta do DCCR para a otimização do meio ASM1 utilizado no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp..

Ficou claro que a produção de lipídeos totais foi maximizada mediante a otimização das concentrações de nitrato, fosfato e vitamina do meio ASM1. Esta otimização permitiu a produção de até 300 mg de lipídeos g<sup>-1</sup> de biomassa seca e uma  $P_{LT}$  máxima de 32,4 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

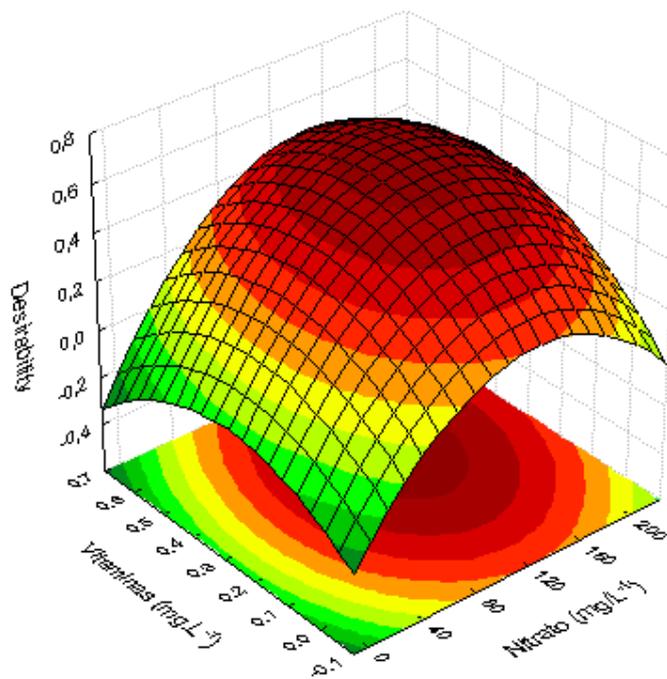
### 5.3.1. VALIDAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO DO MEIO ASM1

Considerando que as concentrações de nutrientes ótimas para a densidade celular não foram as mesmas para TLT e  $P_{LT}$ , foi gerado um modelo matemático para prever os valores ótimos de nutrientes para maximizar ambas respostas simultaneamente. Isto foi realizado através da função *Desirability* obtida a partir dos resultados do DCCR com o programa Statistica. Nas Figuras 5.20, 5.21 e 5.22 podem ser visualizadas as superfícies de resposta da função *Desirability*, mostrando

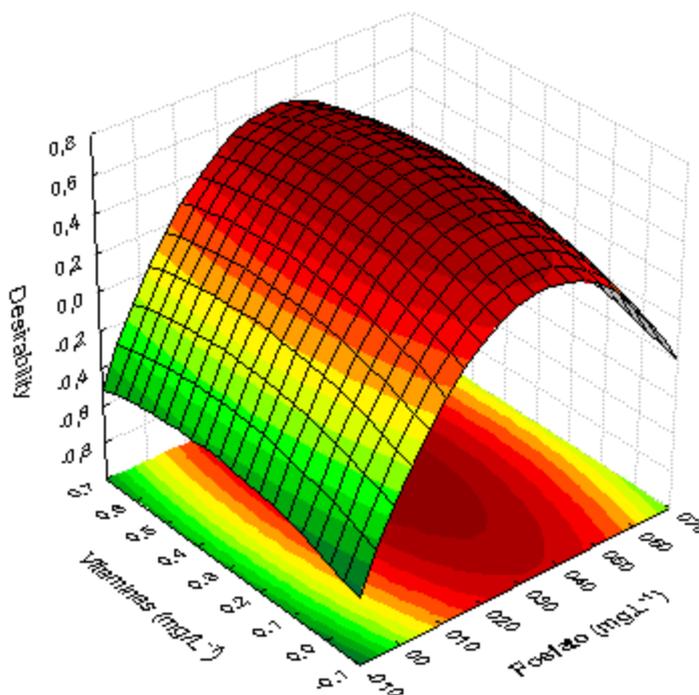
claramente que através da mesma se otimizou as concentrações dos nutrientes avaliados para ambas variáveis de respostas.



**Figura 5.20.** Superfície de resposta da função *Desirability* para otimização simultânea das concentrações de nitrato e fosfato para produção de lipídeos e células de *Scenedesmus* sp..



**Figura 5.21.** Superfície de resposta da função *Desirability* para otimização simultânea das concentrações de nitrato e vitamina para a produção de lipídeos e células de *Scenedesmus* sp..



**Figura 5.22.** Superfície de resposta da função *Desirability* para otimização simultânea das concentrações de fosfato e vitamina para produção de lipídeos e células de *Scenedesmus* sp..

A Tabela 5.3 apresenta os valores preditos para a densidade celular ( $1,37E+07$  céls mL<sup>-1</sup>), teor de lipídeos (19,6 %) e produtividade em lipídeos (24,8 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) se utilizasse 159 mg L<sup>-1</sup> de nitrato, 49 mg L<sup>-1</sup> de fosfato e 0,31 mg L<sup>-1</sup> de vitamina.

O valor da função *Desirability* de 0,78 para se atingir o ótimo das três respostas simultaneamente indicou que a otimização por esta função atende 78 % do máximo obtível.

Baseando-se nestes dados, conduziram-se três réplicas do cultivo fototrófico empregando as condições ótimas segundo a função *Desirability*. Como resultados, foram produzidos  $1,30E+07$  céls mL<sup>-1</sup>, 20,3 % de TLT e 25,2 mg de lipídeos L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. (Tabela 5.3).

Contudo, as melhores condições do meio ASM1, dentre aquelas avaliadas, para o cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp. foram validadas, corroborando a reprodutibilidade do processo em sistemas de 1 L.

**Tabela 5.3.** Valores preditos de densidade celular ( $X_f$ ), teor de lipídeos totais (TLT) e produtividade em lipídeos ( $P_{LT}$ ) conforme a função *Desirability*.

Variável de resposta	Valor predito	Limites		N (mg L <sup>-1</sup> )	F (mg L <sup>-1</sup> )	V (mg L <sup>-1</sup> )	Resultado validação
		-0,95%	+0,95%				
$X_f$ (céls mL <sup>-1</sup> )	1,37E+07	1,27E+07	1,47E+07				1,30±0,08 E+07
TLT (%)	19,7	18,2	23,2	159	49	0,31	20,3±2,6
$P_{LT}$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	24,8	22,1	26,3				25,2±4,6

(N) – Nitrito; (F) – Fosfatos; (V) – Vitaminas. O resultado da validação é a média de três réplicas ± desvio padrão.

Ficou claro que no presente trabalho foi possível encontrar condições ótimas tanto para o teor de lipídeos quanto para a produtividade em lipídeos, sendo que estas respostas usualmente estão em contradição uma com a outra, de acordo com LIU *et al.* (2010) e XIN *et al.* (2010).

Esta contradição foi também demonstrada através de alguns experimentos realizados neste estudo, onde sob menores concentrações iniciais de nutrientes, *Scenedesmus* sp. acumulou alto TLT, porém com baixa produção de biomassa. Enquanto sob maiores concentrações iniciais de nutrientes, a microalga apresentou alta produção de biomassa com pouco acúmulo de lipídeos. Como a alta produtividade em lipídeos depende diretamente de altas produções de biomassa e lipídeos, de acordo com a Equação 9 (item 4.16.4), é importante encontrar condições favoráveis para ambas respostas. E o presente trabalho alcançou este objetivo ao utilizar a estratégia de otimização através da função *Desirability*.

A produtividade em lipídeos obtida com o ASM1-O (25,2 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) está em conformidade com as de HO *et al.* (2012), em cujo trabalho obtiveram 21,2 – 45 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> cultivando diferentes espécies de *S. obliquus*. ZHAO *et al.* (2012) reportaram produtividade em lipídeos próxima de 18 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> com a *S. quadricauda* cultivada sem nitrogênio e com ar atmosférico, porém quando esta alga foi submetida a 2,5 % de CO<sub>2</sub>, foi alcançada uma  $P_{LT}$  quase 8 vezes maior (140 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). CONVERTI *et al.* (2009) apresentaram valores de 20,4 e 16,4 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para *C. vulgaris* e *N. oculata*, respectivamente. XIN *et al.* (2010) alcançou uma  $P_{LT}$  de 20,3 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> cultivando *Scenedesmus* sp., entretanto sua taxa de acúmulo de lipídeos ainda foi menor que aquela alcançada por SCIB-01.

Os resultados alcançados neste trabalho estão de acordo com os reportados por HO *et al.* (2012), JI *et al.* (2014) e YEH & CHANG (2012), os quais mostraram que a microalga pode acumular lipídeos sob condições pobres de nutrientes, CO<sub>2</sub> atmosférico e energia solar, respondendo ao estresse de acordo com a espécie estudada. Isto ficou evidenciado quando o inóculo de *Scenedesmus* sp. SCIB-01, cultivado sob condições normais, foi transferido para meios pobres e apresentou aumento no acúmulo de lipídeos.

Todavia, SCIB-01 foi capaz de acumular lipídeos reduzindo pouco em biomassa seca. Tais resultados foram muito similares aos reportados por PRAVEENKUMAR *et al.* (2012).

Este fato poderia ser explicado a partir da perspectiva que em meios de cultura pobres, a célula obteria nitrogênio dos pigmentos fotossintéticos e o utilizaria nos processos metabólicos, reduzindo a taxa fotossintética e promovendo o acúmulo de NADH. Com isso, a enzima citrato sintase seria inibida e a entrada de acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs) seria bloqueada. O aumento dos níveis de acetil-CoA ativaria a acetil-CoA carboxilase, promovendo sua conversão em malonil-CoA, a partir do qual as cadeias de ácidos graxos são alongadas. Com isso, a síntese de lipídeos aumentaria resultando num acúmulo acentuado deste produto (MANDAL & MALLICK, 2009).

A partir da perspectiva econômica, o emprego de meios pobres poderia ser considerado uma estratégia viável desde que envolva nutrientes com alto custo benefício. Por exemplo, a utilização de águas residuais contendo as concentrações de nutrientes indicadas como as melhores no presente trabalho, poderia ser utilizada com este propósito. É bem conhecido que as espécies de *Scenedesmus* sp. têm características desejáveis para o tratamento de águas residuais e síntese de lipídeos visando a produção de biodiesel (BLERSCH *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2011; XIN *et al.*, 2010).

A aplicação do planejamento superfície de resposta ou DCCR para otimização de condições do cultivo de microalgas é pouco utilizada. Raramente os trabalhos que reportam o uso desta estratégia alcançam um ponto de máximo na superfície de resposta, o que comprova a otimização das variáveis independentes e a maximização da variável de resposta.

CHELLAMBOLI & PERUMALSAMY (2014) utilizaram a técnica superfície de resposta no cultivo de *Scenedesmus abundans* com o objetivo de otimizar a porcentagem do inóculo (2 a 10 %), a concentração de bicarbonato de sódio (0 a 10 g L<sup>-1</sup>) e o tempo de cultivo (2 a 30 dias) para maximizar a produção de biomassa e o teor de lipídeos. Reportaram que a biomassa final só não foi influenciada pelo inóculo, porém não mensuraram sua significância estatística. E um grande aumento do TLT foi verificado quando aumentaram os valores de todas variáveis. Entretanto, em nenhuma das superfícies de resposta visualizou-se um ponto máximo. E os melhores resultados foram P<sub>x</sub> de 39,1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e TLT de 26,28 %. Com isto, não alcançaram a otimização das condições para as respostas selecionadas (biomassa e lipídeos).

LI *et al.* (2011) realizaram um planejamento superfície de resposta variando as concentrações de glicerina (3,12 - 25,0 g L<sup>-1</sup>), caseína (0,78 - 3,12 g L<sup>-1</sup>) e fosfato (0,03 - 0,52 g L<sup>-1</sup>) do meio BBM no cultivo fotoheterotrófico de *Chlorella minutíssima*, com o objetivo de maximizar a produtividade em biomassa. Verificaram que: o fósforo não teve efeito significativo; a glicerina conferiu o máximo de resposta em seu nível máximo, não tendo indentificado uma concentração ideal dentro da faixa estudada; e para a caseína, observou-se um pico de resposta entre 1,56 - 2,34 g L<sup>-1</sup>, mostrando que somente esta variável foi otimizada. As condições ótimas apontadas pelo modelo matemático (R<sup>2</sup> 0,966) foram 26,4 g L<sup>-1</sup> para a fonte de carbono, 2,61 g L<sup>-1</sup> para a fonte de nitrogênio e 0,03 g L<sup>-1</sup> para a fonte de fósforo, que conferiram uma P<sub>x</sub> de 1,83 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Entretanto, LI *et al.* (2011) não alcançaram a otimização de todas as variáveis, a qual poderia ter sido atingida através da função *Desirability*.

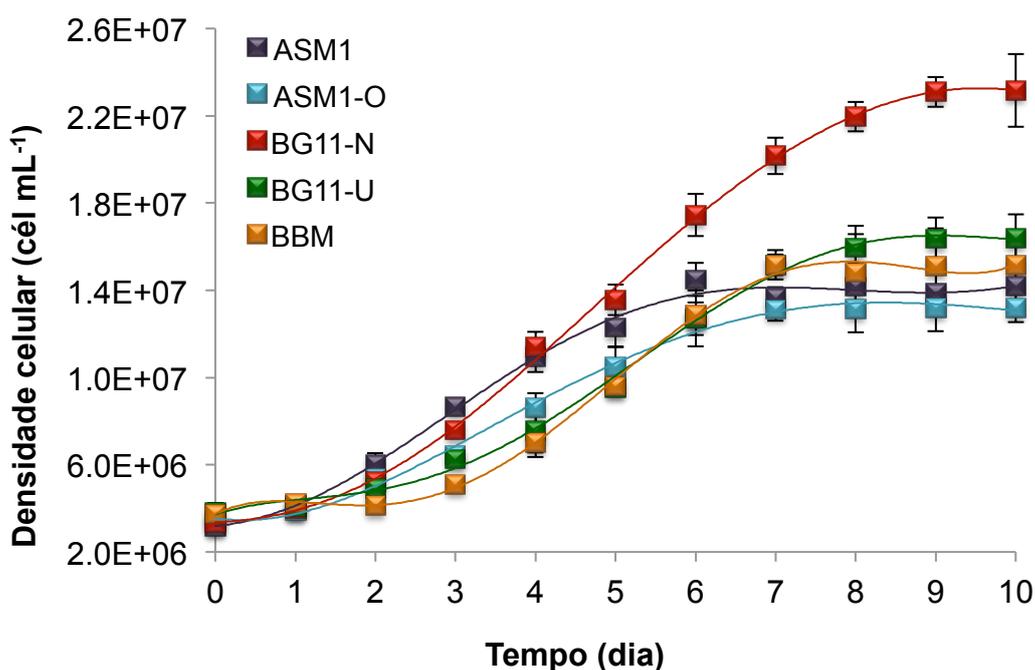
O uso da função *Desirability* para maximizar a síntese de biomoléculas microalgáceas ainda não foi reportada na literatura, constituindo um caráter inovador do presente trabalho.

#### **5.4. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NO CULTIVO FOTOTRÓFICO DE *Scenedesmus* sp.**

Com o propósito de analisar o efeito de diferentes meios de cultura sobre a produção de biomassa, acúmulo de lipídeos totais e produtividades em biomassa e

lipídeos, a microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada em ASM1 original, ASM1-O (otimizado), BG11-N (com nitrato), BG11-U (com ureia) e BBM.

Na Figura 5.23, encontram-se os perfis cinéticos de *Scenedesmus* sp. construídos com os valores de densidade celular. Claramente, visualizou-se que a máxima foi alcançada com o meio BG11-N ( $2,4 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup>).

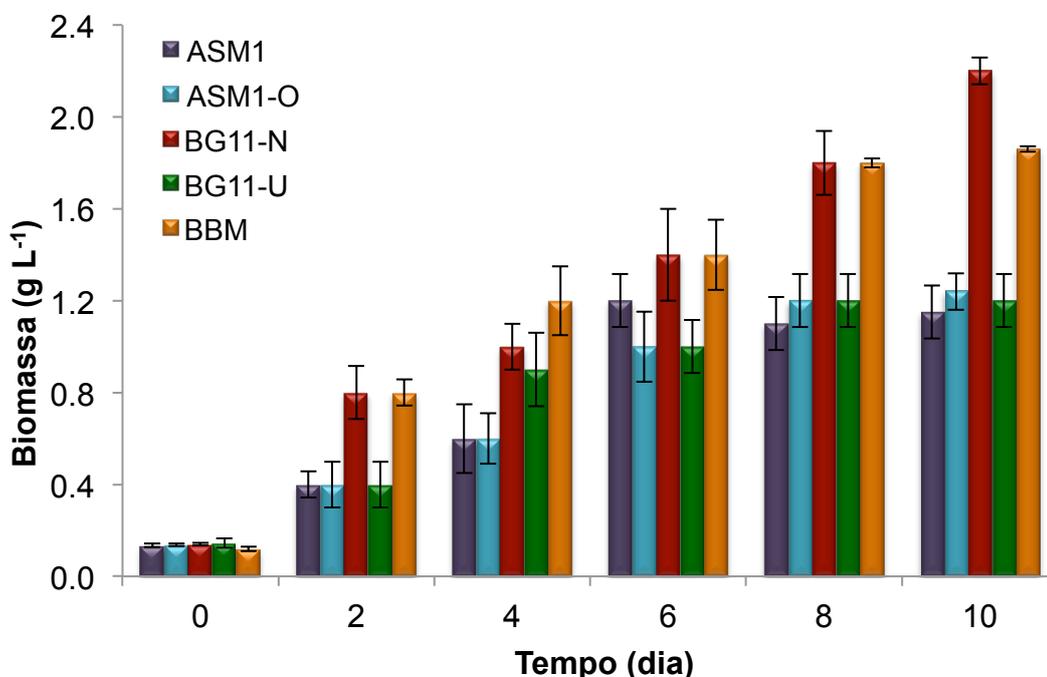


**Figura 5.23.** Perfis cinéticos *Scenedesmus* sp. cultivada em meio ASM1, ASM1-O, BG11-N, BG11-U e BBM, sistema de 1 L sob  $400 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 L ar  $\text{min}^{-1}$  e  $23^\circ\text{C}$ . Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Com o emprego de meios com maiores concentrações de nitrato (vide item 4.2), verificou-se o aumento da densidade celular final, confirmando o efeito significativo deste nutriente sobre o crescimento, o qual foi mensurado e selecionado como o mais importante para a maximização desta variável na otimização do meio ASM1, como pode ser visualizado no gráfico de Pareto da Figura 5.8.

Através da Figura 5.24, verificou-se que com o meio BG11-N também se alcançou a máxima produção de biomassa seca ( $2,2 \text{ g L}^{-1}$ ), com  $P_x$  ( $210 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) 20 % maior que aquela obtida em BBM ( $178 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e aproximadamente o dobro

daquelas obtidas em BG11-U, ASM1 e ASM1-O (110, 105 e 114 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente).



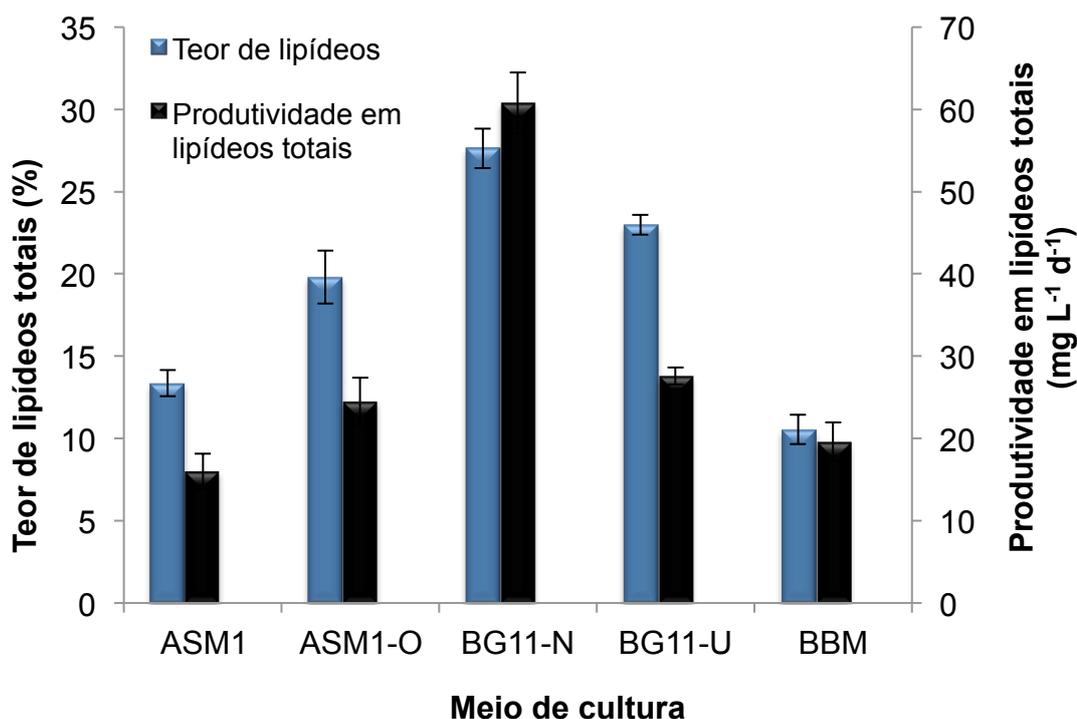
**Figura 5.24.** Produção de biomassa de *Scenedesmus* sp. cultivada em meio ASM1, ASM1-O, BG11-N, BG11-U e BBM, sistema de 1 L sob 400  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 L  $\text{ar min}^{-1}$  e 23 °C. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Ao analisar a velocidade de crescimento ( $\mu$ ) de *Scenedesmus* sp., constatou-se que o meio BBM proporcionou a mais alta (0,79), alcançada durante os 4 dias de fase exponencial. Em BG11-U, determinou-se o segundo maior  $\mu$  (0,72), superior aquele alcançado com o BG11-N (0,50). Em ASM1 e ASM1-O, *Scenedesmus* sp. mostrou-se com  $\mu$  (0,50 e 0,47, respectivamente) similares aquele em BG11-N.

Os  $\mu$  de SCIB-01 obtidos em BBM e BG11-U foram superiores àqueles reportados para linhagens de *Scenedesmus* sp. (0,10 – 0,64 d<sup>-1</sup>) (ARAVANTINO *et al.*, 2013; ANDRULEVICIUTE *et al.*, 2014; BASU *et al.*, 2014; CHELLAMBOLI & PERUMALSAMY, 2014), *Chlorella* sp. (0,16 d<sup>-1</sup>), *Haematococcus* sp. (0,13 d<sup>-1</sup>) e *Nannochloropsis* sp. (0,13 d<sup>-1</sup>) (ANDRULEVICIUTE *et al.*, 2014).

O teor de lipídeos máximo foi verificado quando se cultivou *Scenedesmus* sp. em meio BG11-N (27,8 %), seguido pelo TLT em BG11-U (22,9 %), mostrando que

nitrito foi melhor fonte de nitrogênio que ureia para se acumular mais lipídeos (Figura 5.25). Apesar do meio BBM ter conferido alta produção em biomassa, não permitiu *Scenedesmus* sp. atingir alto TLT (10,5 %), que foi apenas 50 % do alcançado com ASM1-O (19,8 %).



**Figura 5.25.** Teor de lipídeos totais e produtividade em lipídeos totais obtidos com *Scenedesmus* sp. cultivada por 10 dias em meio ASM1, ASM1-O, BG11-N, BG11-U e BBM, sistema de 1 L sob 400  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1 L ar  $\text{min}^{-1}$  e 23 °C. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Na avaliação de diferentes meios, o presente trabalho atingiu  $P_{LT}$  ainda maior quando se empregou o BG11-N ( $60,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), o qual permitiu duplicar a  $P_{LT}$  obtida com o ASM1-O.

O cultivo de microalgas em diferentes meios de culturas usualmente apresenta respostas variadas devido às distintas composições, principalmente em concentrações de nitrito e fosfato, dentre outros importantes elementos como o ferro. Baseando-se neste fato, RUANGSOMBOON (2012) cultivou *Botryococcus braunii* em meio Chlorella, sistema de 1 L, 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  contínuo e 25 °C, variando separadamente a concentração de  $\text{KNO}_3$  (16,5 – 344  $\text{mg L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (25 – 444  $\text{mg L}^{-1}$ ) e  $\text{FeSO}_4$  (9 – 45  $\text{mg L}^{-1}$ ). Como resultado, obtiveram valor máximo de 1,91  $\text{g L}^{-1}$

para biomassa com 444 mg L<sup>-1</sup> de fosfato e mantendo constantes nitrato (1,15 g L<sup>-1</sup>) e ferro (50 mg L<sup>-1</sup>) de acordo com o meio original. E o teor de lipídeos máximo de 54,7 % foi alcançado utilizando 222 mg L<sup>-1</sup> de fosfato, mantendo constantes as concentrações originais de nitrato e ferro.

Analisando os resultados obtidos com *Scenedesmus* sp. SCIB-01, cultivada em BG11-N (1,5 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, 40 mg L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 mg L<sup>-1</sup> citrato de ferro) e com *B. braunii*, foi obtida com a primeira 15 % de biomassa a mais (2,2 g L<sup>-1</sup>) que com a segunda (1,91 g L<sup>-1</sup>). Porém, com um teor de lipídeos em SCIB-01 2 vezes menor que na microalga cultivada por RUANGSOMBOON (2012) (27,8 e 54,7 %, respectivamente).

PRAVEENKUMAR *et al.* (2012) cultivaram *Chlorella* sp. primeiramente em meio Chu10 original e, em seguida, a inocularam neste meio sem nitrato, fosfato, ferro ou sem todos estes nutrientes. Foram obtidos um máximo de 2,41 g L<sup>-1</sup> e 41 % de biomassa e lipídeos, respectivamente, na ausência dos três nutrientes (nitrato, fosfato e ferro), porém com uma P<sub>LT</sub> de 49 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Em Chu10 sem nitrato, *Chlorella* sp. atingiu a máxima P<sub>LT</sub> de 53,96 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, menor que a máxima de SCIB-01 em BG11-N (60,8 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

BAKY *et al.* (2012) cultivaram *S. obliquus* sob diferentes concentrações de ferro (2,5 – 20 mg L<sup>-1</sup>) e CO<sub>2</sub> (0,03 – 3,9 %) separadamente, utilizando meio N-9 em sistemas de 4 L, 200 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 25±3 °C. Em 20 mg L<sup>-1</sup> de ferro, alcançaram os seguintes resultados: TLT máximo de 28,1 %, similar ao máximo obtido com SCIB-01 (27,8 %); máxima densidade celular de 3,0E+07 céls mL<sup>-1</sup> em 14 dias, pouco maior que a máxima obtida por SCIB-01 em 10 dias (2,4 E+07 céls mL<sup>-1</sup>); e pouca produção de biomassa (1,25 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), porém com P<sub>LT</sub> 50 % maior (95,3 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) que a da SCIB-01 (60,8 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Todavia, SCIB-01 apresentou uma máxima P<sub>LT</sub> próxima a de *S. obliquus* cultivada com 12 % de CO<sub>2</sub> (64,2 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), mostrando a eficiência do cultivo em BG11-N mesmo sem suplementação de CO<sub>2</sub>.

CHAICHALERM *et al.* (2012) cultivaram *Scenedesmus actus* nos meios 3NBBM e BG11 (0,75 e 1,5 g L<sup>-1</sup> nitrato, respectivamente). Em meio BG11, *S. actus* alcançou 0,8 g L<sup>-1</sup>, 25 % e 30 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de biomassa, TLT e P<sub>LT</sub>, respectivamente. No cultivo com 3NBBM, *S. actus* alcançou 0,4 g L<sup>-1</sup>, 25 % e 13 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de biomassa, TLT e P<sub>LT</sub>, respectivamente.

Analisando os resultados de *S. actus*, esta cresceu melhor em BG11 que em BBM, ocorrendo o mesmo no crescimento de SCIB-01, sendo que esta produziu 2,8 vezes mais biomassa que aquela. Entretanto, *S. actus* apresentou o mesmo acúmulo de lipídeos em ambos meios (25 %), diferentemente do ocorrido com SCIB-01, que apresentou em BG11-N um TLT (27,8 %) 2,6 vezes maior que em BBM (10,5 %). Contudo, SCIB-01 atingiu uma produtividade em lipídeos 2 vezes maior que *S. actus*, quando cultivadas em BG11 (60,8 e 30 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente).

*Monoraphidium contortum* cultivada em BG11 alcançou um teor de lipídeos de 35 % mas com baixa produção de biomassa (0,3 g L<sup>-1</sup>), logrando-se uma P<sub>LT</sub> de apenas 11 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, 6 vezes menor que a da SCIB-01 cultivada em BG11-N (CHAICHALERM *et al.*, 2012).

LI *et al.* (2011) cultivaram *C. minutissima* UTEX2341 em BBM, sistemas de 0,5 L, 200 rpm, 25 °C e 50 μmol fótons PAR m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e alcançaram P<sub>X</sub> e P<sub>LT</sub> de 30 e 2,61 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes valores de P<sub>X</sub> e P<sub>LT</sub> obtidos com UTEX2341 foram 6 e 8 vezes menores que P<sub>X</sub> e P<sub>LT</sub> obtidos com SCIB-01 quando cultivada em BBM.

No trabalho reportado por LI *et al.* (2011) foram avaliadas diferentes fontes de nitrogênio (nitrato, caseína, sulfato de amônio e ureia) em cultivo fotoheterotrófico, com adição de glicerina. Com uréia, os valores de P<sub>X</sub> e P<sub>LT</sub> foram de 98 e 28 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente, comparado com P<sub>X</sub> de 110 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e P<sub>LT</sub> de 19,6 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> obtidos neste trabalho ao se cultivar *Scenedesmus* sp. em BG11-U, porém fototroficamente. As máximas P<sub>X</sub> e P<sub>LT</sub> de 220 e 34,8 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente, foram obtidas quando cultivaram *C. minutissima* com caseína. Apesar da máxima produtividade em biomassa de UTEX2341 ter sido um pouco maior que a de SCIB-01 cultivada em BG11-N (210 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), a P<sub>LT</sub> desta (60,8 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) foi 2 vezes maior que a daquela.

Em LIN&LIN (2011), *Scenedesmus rubescens*, cultivada em f/2 e contínuo 300 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, foi submetida à quatro diferentes tratamentos: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Tr-1), ureia (Tr-2), NaNO<sub>3</sub> (Tr-3) e mistura de ureia com NaNO<sub>3</sub> (Tr-4). No Tr-2, a P<sub>X</sub> (510 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) foi 5 vezes maior que a da SCIB-01 quando tratada com uréia (BG11-U). Mas o TLT em Tr-2 (18,1 %) foi 20 % menor que o da SCIB-01 em BG11-U (23 %). Já em Tr-3, *S. rubescens* apresentou P<sub>X</sub> (440 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) 2 vezes maior e TLT 25 % menor

que  $P_X$  e TLT de SCIB-01 em BG11-N, respectivamente. Entretanto, foi em Tr-4 que *S. rubescens* apresentou a máxima  $P_X$  ( $540 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), alcançando nesta condição uma  $P_{LT}$  de  $69 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , um pouco maior que a de SCIB-01 em BG11-N ( $60,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ).

Contudo, dentre os meios avaliados na presente seção, o BG11-N conferiu as maiores biomassa,  $P_X$ , TLT e  $P_{LT}$  ( $2,2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $210 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ,  $27,8 \%$  e  $60,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente) e foi utilizado, por isso, na avaliação de diferentes cultivos realizados com *Scenedesmus sp.*.

#### **5.5. OBTENÇÃO DE GLICOSE A PARTIR DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE CELULOSE VISANDO SUA APLICAÇÃO NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Scenedesmus sp.***

Nesta etapa do trabalho, objetivou-se realizar um estudo sobre a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual da indústria de celulose, bem como avaliar seu potencial como fonte de glicose para ser empregada no cultivo heterotrófico de *Scenedesmus sp.*. Para isso, realizou-se uma caracterização do resíduo seguida da realização de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), no qual foram avaliados os efeitos da relação sólido:líquido (S:L) e da carga enzimática sobre a concentração de glicose, selecionada como variável de resposta.

O resultado da caracterização da biomassa residual apresentou um teor de  $80,9 \%$  de celulose,  $16,2 \%$  de hemicelulose e  $1,7 \%$  de lignina. Verificou-se que o balanço de massas não totalizou em  $100 \%$ , ficando em  $98,8 \%$ . Dados citados na literatura também mostraram fato semelhante para o bagaço de cana ( $91 \%$ ), palha de trigo ( $95 \%$ ), sabugo de milho ( $95 \%$ ) e grama ( $88,4 \%$ ) (PANDEY *et al.*, 2000; SUN & CHENG, 2002). Possivelmente, o não fechamento do balanço em  $100 \%$  deve-se aos domínios protéicos existentes na parede celular e às resinas extrativas e compostos inorgânicos, os quais não foram quantificados (McCANN & ROBERTS, 1991; CARPITA & GILBEAULT, 1993).

O teor de celulose da biomassa residual foi muito acima do comumente encontrado em bagaço de cana (GAO *et al.*, 2013), bagaço de sorgo (QUIANG *et al.*,

2012), sabugo de milho (ZHANG *et al.*, 2009), palha de trigo (QIU & CHENG, 2012), fibra de banana (SHENG *et al.*, 2014) e cavacos residuais (SILVA *et al.*, 2011), cujos valores não ultrapassaram 55 %.

Desta forma, o teor de celulose (80,9 %) do resíduo foi o dobro daquele registrado para a madeira (40,2 %), enquanto o teor de lignina daquele (1,7 %) foi 16 vezes menor que o desta (26,9 %) (VIVEKANAND *et al.*, 2013). Isso é explicável pelo fato da madeira ser processada na produção de celulose (Figura 4.7), a qual visa reduzir seu conteúdo de lignina e hemicelulose e, conseqüentemente, aumenta o teor relativo de celulose no resíduo coletado neste processo.

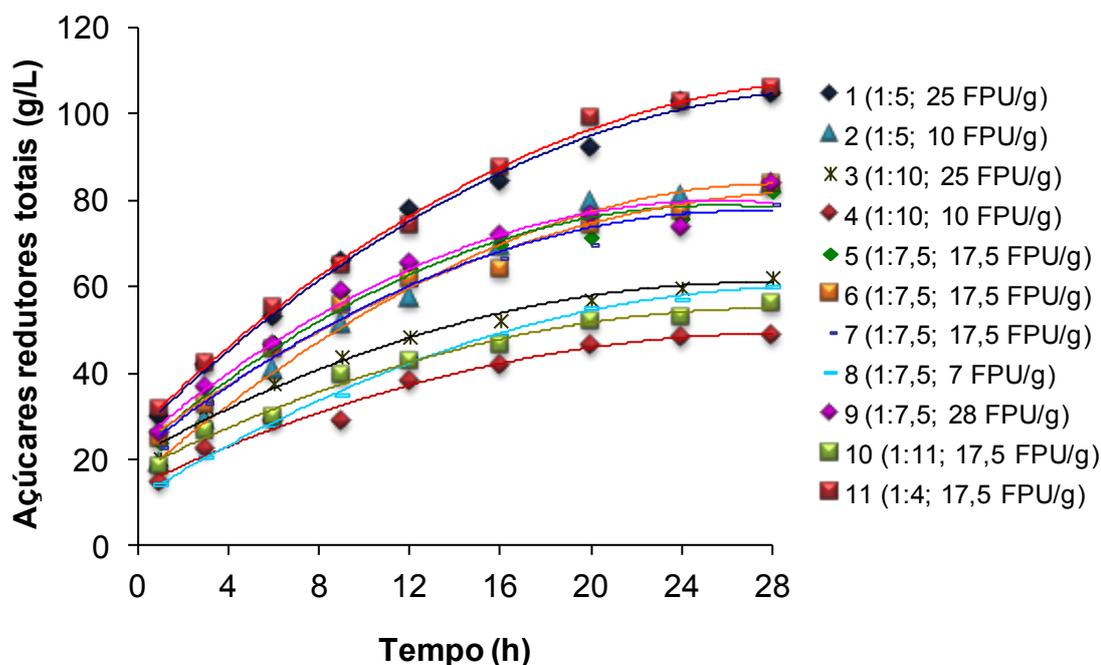
Considerando a caracterização do resíduo e visando sua aplicação em processos biotecnológicos, o mesmo se mostrou mais interessante que os resíduos agroindustriais comumente utilizados (por exemplo, bagaço de cana). Além disso, o resíduo avaliado no presente trabalho ainda não foi utilizado na produção de nenhum produto de interesse biotecnológico, podendo diversificar a matriz de matérias-primas de diversos processos.

Para o aproveitamento dos monômeros de glicose deste resíduo, fez-se necessário realizar um estudo de hidrólise enzimática do mesmo. A Figura 5.26 mostra os perfis cinéticos da hidrólise enzimática. As concentrações de açúcares obtidas ao final do tratamento enzimático podem ser visualizadas na Tabela 5.4.

Os resultados mostraram que as maiores concentrações de açúcares foram obtidas nos experimentos com as maiores relações S:L. A maior concentração de glicose foi de 80,6 g L<sup>-1</sup> (experimento 1), correspondendo a 53,5 % de eficiência de hidrólise. A maior conversão foi obtida com o experimento 10 (56,9 %), o qual resultou em apenas 42,6 g L<sup>-1</sup> de glicose. Enquanto no experimento 11, atingiu-se 76,9 g L<sup>-1</sup> de glicose e 42,3 % de conversão. No 11, a obtenção de glicose foi apenas 5 % menor que a alcançada com o experimento 1, porém neste empregou-se 30 % a mais de carga enzima que naquele.

De uma maneira geral, verificou-se que um aumento no teor de sólido diminuiu a conversão de celulose à glicose, corroborando os dados relatados na literatura (BERLIN *et al.*, 2006; KHANG *et al.*, 2010; PAN *et al.*, 2005). É fato conhecido que as enzimas do complexo celulásico sofrem inibição pelos seus produtos finais de hidrólise e as menores eficiências de hidrólise enzimática obtidas

em sistemas reacionais com altas relações S:L estão relacionadas aos problemas de transferência de massa que dificultam a ação catalítica das enzimas (SILVA *et al.*, 2011).



**Figura 5.26.** Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual da indústria de celulose, realizada em frascos de 0,5 L sob 47 °C e a 200 rpm.

A partir da análise do gráfico de Pareto (Figura 5.27) para a hidrólise da biomassa residual, é possível visualizar que o efeito linear da relação S:L foi o único que apresentou influência estatisticamente significativa. O efeito linear gerado pela carga enzimática foi considerado marginalmente significativo, uma vez que seu *p*-valor (0,068) estava muito próximo do valor considerado (0,05), e, por isso, esta variável não foi descartada. Os efeitos quadráticos da carga enzimática e da relação S:L não foram estatisticamente significativos, mostrando que dentro da faixa estudada, não houve presença de curvatura.

Através da superfície de resposta (Figura 5.28) gerada pelo modelo a partir dos resultados, verificou-se que o aumento da relação S:L e da carga enzimática, do nível inferior (-1) para o superior (+1), conduziram a maiores valores finais da concentração de glicose. Através dessa superfície, foi possível verificar que a hidrólise enzimática não foi otimizada, uma vez que o ponto máximo da curvatura da

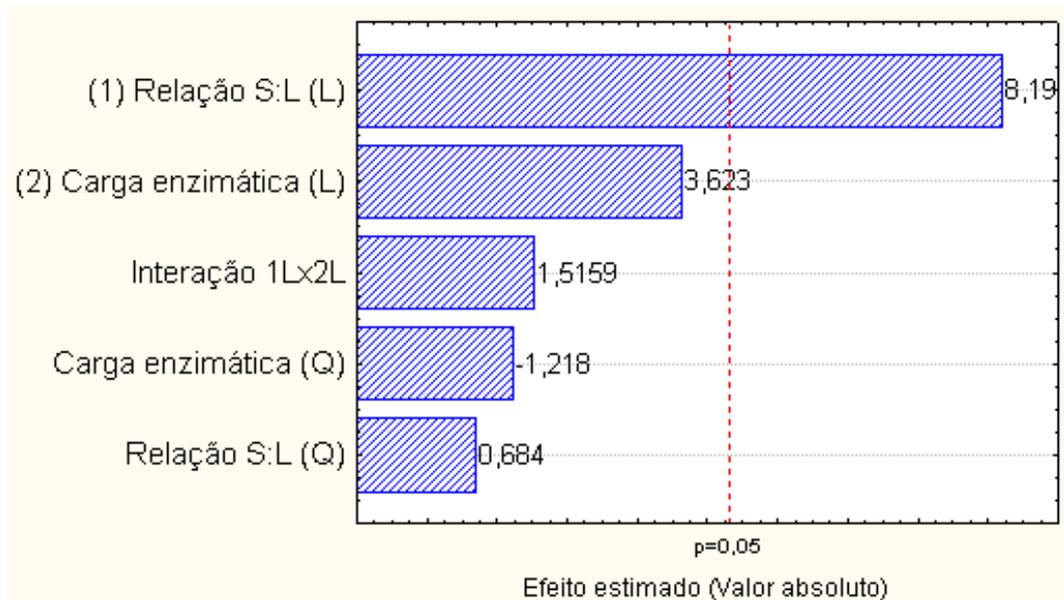
superfície não foi alcançado. Isto poderia ter sido obtido se aumentasse o teor de sólidos, porém existe uma restrição operacional causada pelo pequeno volume de meio reacional em relação à quantidade de sólidos, o que dificulta a mistura mecânica e implica numa transferência de massa insuficiente (WU & LEE, 1997).

**Tabela 5.4.** Concentrações de açúcares obtidas após 28 h de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual da indústria de celulose.

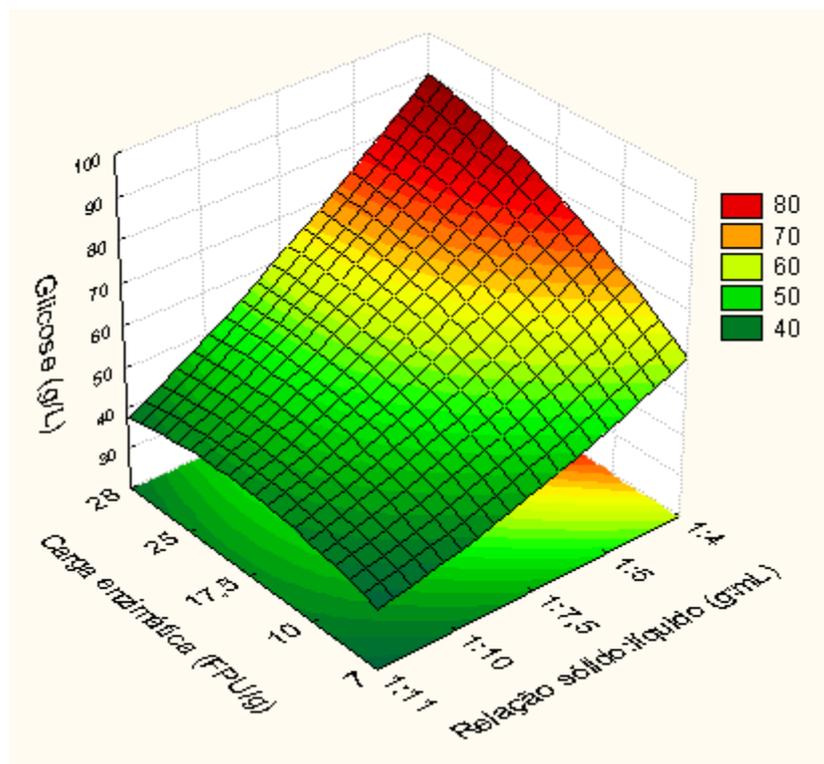
Condição S:L; CE	ART (g L <sup>-1</sup> )	Glicose (g L <sup>-1</sup> )	Celobiose (g L <sup>-1</sup> )	Xilose (g L <sup>-1</sup> )	Eficiência HE (%)
1 - 1:5; 25 FPU g <sup>-1</sup>	104,3	80,6	2,8	13,3	53,5
2 - 1:5; 10 FPU g <sup>-1</sup>	84,0	62,6	2,9	9,7	41,5
3 - 1:10; 25 FPU g <sup>-1</sup>	62,2	43,4	0,0	6,2	53,3
4 - 1:10; 10 FPU g <sup>-1</sup>	49,1	39,6	0,0	5,2	48,5
5 (PC) - 1:7,5; 17,5 FPU g <sup>-1</sup>	82,5	53,2	1,5	8,1	45,2
6 (PC) - 1:7,5; 17,5 FPU g <sup>-1</sup>	84,0	62,4	2,6	9,6	53,1
7 (PC) - 1:7,5; 17,5 FPU g <sup>-1</sup>	79,5	56,4	2,6	8,8	48,0
8 - 1:7,5; 7 FPU g <sup>-1</sup>	60,4	43,0	1,3	5,5	36,6
9 - 1:7,5; 28 FPU g <sup>-1</sup>	83,9	61,5	0,0	9,5	52,4
10 - 1:11; 17,5 FPU g <sup>-1</sup>	56,0	42,6	1,9	6,0	56,9
11 - 1:4; 17,5 FPU g <sup>-1</sup>	105,3	76,9	3,0	12,7	42,3

S:L – Relação sólido:líquido; CE – Carga enzimática; ART – Açúcares Redutores Totais; (PC) – Ponto Central; HE – Hidrólise enzimática.

Baseando-se nos resultados e em todas as análises estatísticas realizadas, determinou-se que as melhores condições para a máxima obtenção de glicose, empregando-se a menor carga enzimática dentro da faixa estudada, foram a relação S:L 1:4 (teor de sólidos 25 %) e a carga enzimática de 17,5 FPU g<sup>-1</sup> de sólido. Por isso, estas condições foram utilizadas na validação do melhor resultado de hidrólise enzimática, realizada em quatro réplicas.

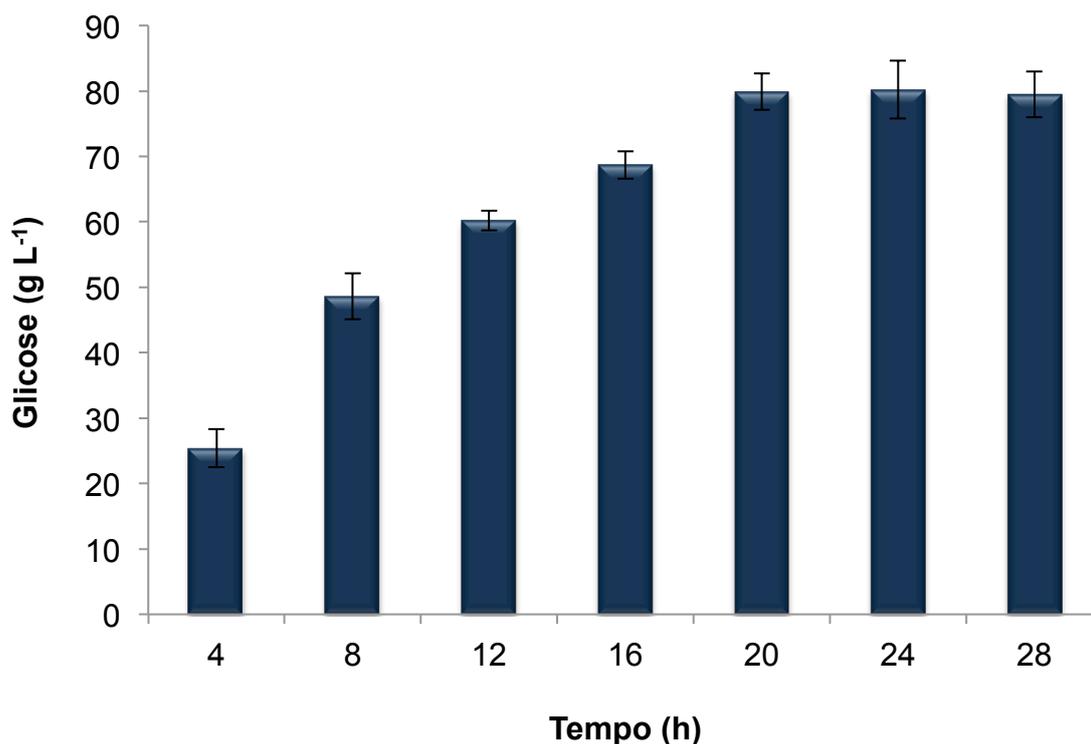


**Figura 5.27.** Gráfico de Pareto para a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) como variável de resposta do DCCR para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual da indústria de celulose.



**Figura 5.28.** Superfície de resposta para a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) como variável de resposta do DCCR para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica residual da indústria de celulose.

Baseado na Figura 5.29, verificou-se que a validação dos resultados foi realizada. Além disso, selecionou-se o tempo de 20 h como o melhor, com o qual foi alcançada a máxima concentração de glicose ( $79,9 \pm 2,8 \text{ g L}^{-1}$ ). Sendo assim, as obtenções de glicose seguintes foram realizadas com relação S:L 1:4, carga enzimática de  $17,5 \text{ FPU g}^{-1}$  e 20 h de duração.



**Figura 5.29.** Validação da melhor condição (S:L 1:4 e carga enzimática  $17,5 \text{ FPU g}^{-1}$ ) da hidrólise enzimática da biomassa residual da indústria de celulose, realizada em frascos de 0,5 L sob  $47 \text{ }^\circ\text{C}$  e a 200 rpm. Os valores são a média de quatro réplicas  $\pm$  desvio padrão.

Por este trabalho apresentar um alto grau de originalidade, uma vez que não se encontra na literatura trabalhos que reportem a utilização do resíduo do sistema de decantação da indústria de celulose, fez-se necessário comparar o potencial deste resíduo com o de outros industriais.

Com o tempo de 12 h de hidrólise enzimática, logrou-se uma concentração de glicose similar àquela reportada por VÁSQUEZ *et al.* (2007), que obtiveram  $58,4 \text{ g L}^{-1}$  de glicose após 12 h de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado, empregando carga enzimática muito superior ( $26 \text{ FPU g}^{-1}$ ).

Já SANTOS *et al.* (2010) alcançaram  $76 \text{ g L}^{-1}$  de glicose após 12 h de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com NaOH e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , porém com uma carga enzimática 43 % maior ( $25 \text{ FPU g}^{-1}$ ). Vale ressaltar que se a carga enzimática utilizada é menor e não se faz necessário realizar pré-tratamentos, menor será o custo total do processo.

AGUIAR *et al.* (2013) hidrolisaram enzimaticamente ( $23 \text{ FPU g}^{-1}$ ) o bagaço de cana após realizar pré-tratamento ácido ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) combinado com *steam explosion* ( $210 \text{ }^\circ\text{C}$  e 4 min) e alcançaram  $56 \text{ g L}^{-1}$  de glicose.

ZHANG *et al.* (2009) realizaram uma hidrólise de 48 h com sabugo de milho, empregando  $8,0 \text{ FPU g}^{-1}$  de carga enzimática e 12,5 % de teor de sólidos, e alcançaram uma média de 0,205 g de açúcares redutores totais para cada grama de sabugo hidrolisado, duas vezes menor daquela alcançada com o resíduo processado por 12 h no presente trabalho (0,43 g de ART para cada grama).

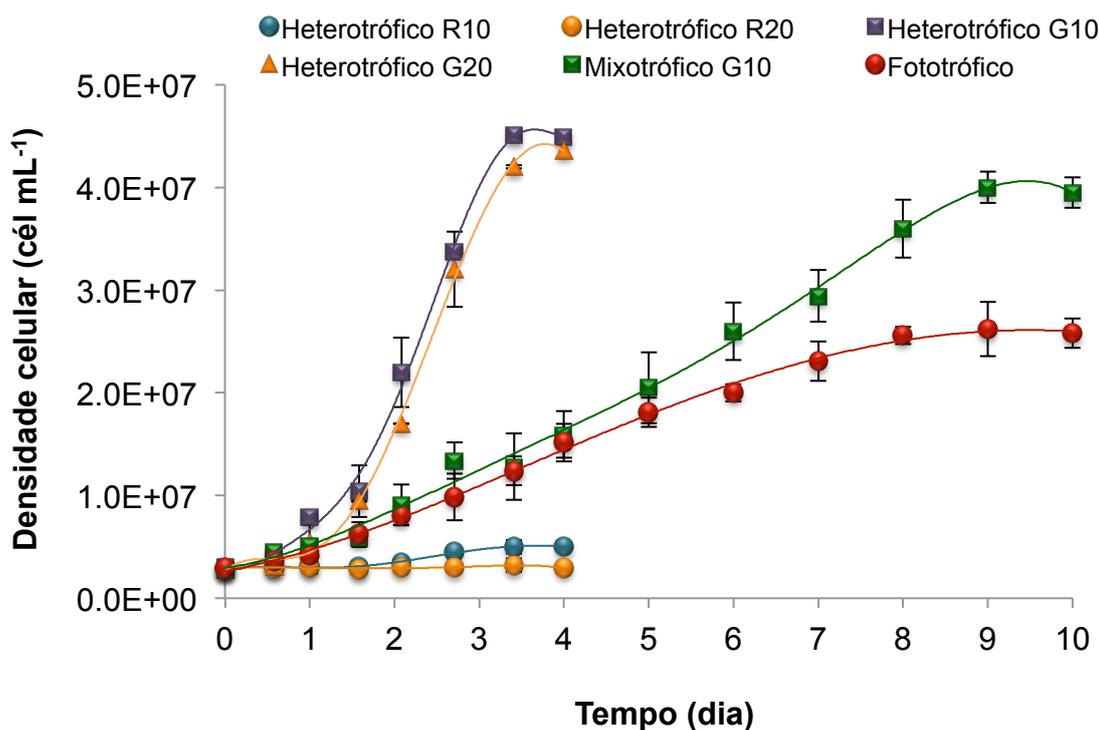
Estes resultados mostraram o grande potencial da biomassa residual da indústria de celulose como fonte de glicose quando comparado com as biomassas utilizadas nos trabalhos apresentados anteriormente. Ressalta-se que o resíduo da indústria de celulose não passou por pré-tratamentos, o que o coloca em uma posição econômica muito favorável.

Todavia, decidiu-se dar continuidade com a utilização da glicose da biomassa residual no cultivo heterotrófico da microalga *Scenedesmus* sp.

## **5.6. AVALIAÇÃO DO CULTIVO FOTOTRÓFICO, MIXOTRÓFICO E HETEROTRÓFICO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. VISANDO MAXIMIZAR SUA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS**

Na avaliação da performance de *Scenedesmus* sp. em diferentes tipos de cultivo, foram realizados os seguintes: fototrófico; mixotrófico com  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicose comercial – G10; heterotrófico com 10 e  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose comercial – G10 e G20; e heterotrófico com 10 e  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose oriunda do hidrolisado enzimático da biomassa residual da indústria de celulose – R10 e R20.

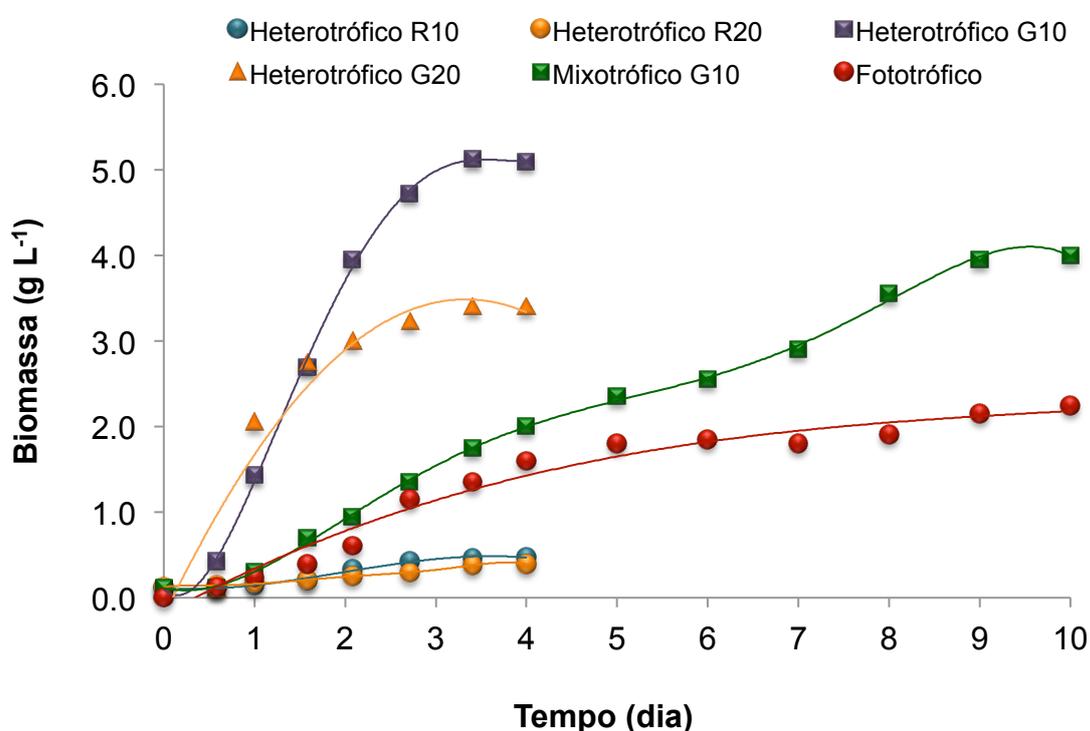
Através da Figura 5.30, visualizou-se que *Scenedesmus* sp. SCIB-01 foi capaz de crescer sob os três tipos de cultivos, apresentando respostas bastante discrepantes entre eles. Em heterotrofia G10, a microalga aumentou a densidade celular rapidamente, alcançando o maior  $\mu$ , de  $1,42 \text{ d}^{-1}$ , seguido do  $\mu$  de G20 ( $1,06 \text{ d}^{-1}$ ). As densidades celulares alcançadas em cultivo heterotrófico G10 ( $4,49 \times 10^7 \text{ céls mL}^{-1}$ ) e G20 ( $4,36 \times 10^7 \text{ céls mL}^{-1}$ ) foram superiores àquelas alcançadas em fototrofia ( $2,58 \times 10^7 \text{ céls mL}^{-1}$ ), mixotrofia ( $3,95 \times 10^7 \text{ céls mL}^{-1}$ ) e heterotrofia R10 ( $5,05 \times 10^6 \text{ céls mL}^{-1}$ ) e R20 ( $2,90 \times 10^6 \text{ céls mL}^{-1}$ ). Ainda que a densidade celular em R10 tenha sido baixa, a microalga apresentou  $\mu$  ( $0,46 \text{ d}^{-1}$ ) próximo ao obtido em fototrofia ( $0,45 \text{ d}^{-1}$ ) e mixotrofia ( $0,42 \text{ d}^{-1}$ ). Sendo registrada a menor taxa de crescimento em R20 ( $0,29 \text{ d}^{-1}$ ).



**Figura 5.30.** Perfis cinéticos de *Scenedesmus* sp. cultivada em fototrofia, mixotrofia e heterotrofia com meio BG11-N. G10 e G20 – 10 e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose comercial. R10 e R20 – 10 e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose do resíduo da indústria de celulose. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

A microalga apresentou em heterotrofia G10 a máxima produção de biomassa ( $5,12 \text{ g L}^{-1}$ ) (Figura 5.31). Sendo assim, o cultivo heterotrófico mostrou-se como melhor alternativa que o cultivo fototrófico para a obtenção de biomassa, tendo em

vista que sua  $P_x$  ( $1250 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) foi 6 vezes maior. ZHENG *et al.* (2012) também verificaram que a produção de biomassa e a taxa de crescimento de *Chlorella sorokiniana* cultivada heterotroficamente foram muito maiores que em fototrofia. O mesmo foi reportado por RATTANAPOLTEE *et al.* (2008), que realizaram cultivo heterotrófico de *C. vulgaris* em meio contendo  $10 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e alcançaram a máxima biomassa em 12 dias, enquanto em fototrófico alcançaram o pico de biomassa com 36 dias.



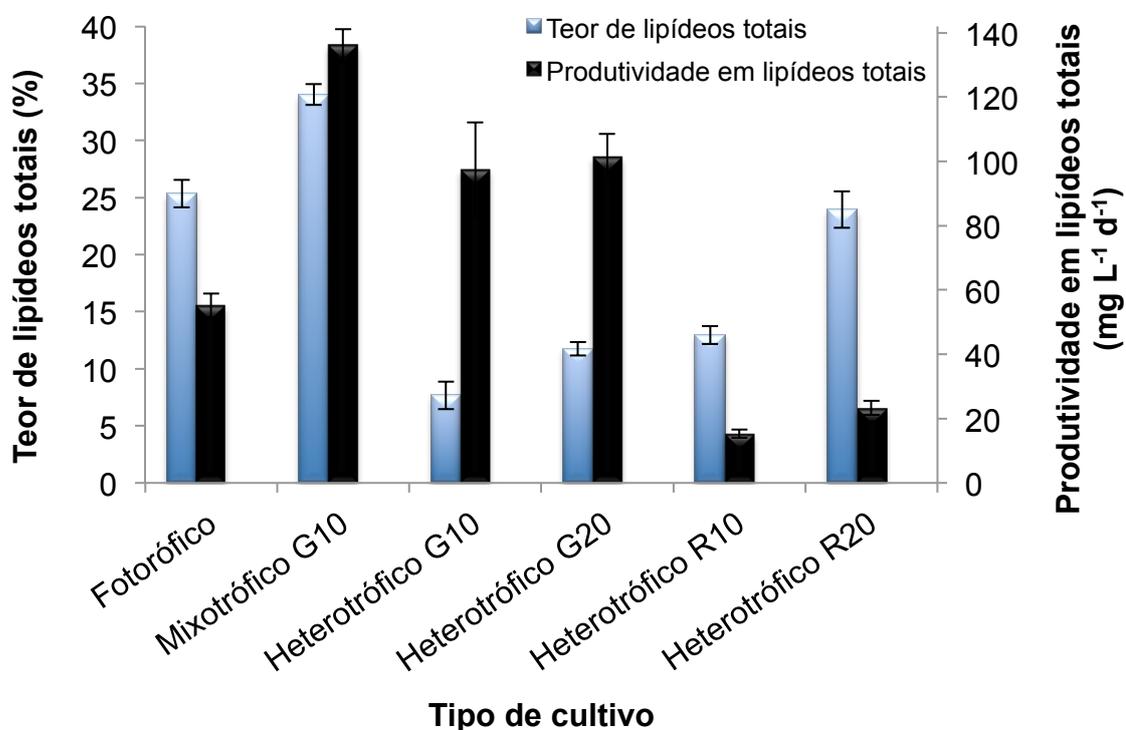
**Figura 5.31.** Produção de biomassa de *Scenedesmus sp.* cultivada em fototrofia, mixotrofia e heterotrofia com meio BG11-N. G10 e G20 – 10 e 20  $\text{g L}^{-1}$  de glicose comercial. R10 e R20 – 10 e 20  $\text{g L}^{-1}$  de glicose do resíduo da indústria de celulose. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

O emprego de glicose proveniente de resíduo levou em consideração seu custo quase zero, uma vez que o mesmo não é aproveitado na indústria de celulose ou em qualquer outro setor. Com o propósito de reduzir o custo do cultivo, vários outros trabalhos empregaram fontes orgânicas baratas. GAO *et al.* (2010) utilizaram hidrolisado enzimático de sorgo no cultivo de *C. protothecoides*. XU *et al.* (2006) utilizaram hidrolisado de milho para cultivar a mesma alga. E LI *et al.* (2011)

cultivaram *C. minutissima* usando glicerina. Sendo assim, é fato conhecido que o emprego de resíduos contendo carbono orgânico é importante não somente por conferir alta  $P_x$  mas também por ter um custo baixo (MATA *et al.*, 2010).

A performance de SCIB-01 em heterotrofia com hidrolisado de resíduo foi pior que em heterotrofia com glicose comercial, pois em R10 e R20 produziram-se apenas 0,47 e 0,39 g L<sup>-1</sup> de biomassa, respectivamente, enquanto em G10 e G20 foram produzidas 5,1 e 3,4 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Verificou-se que o uso de concentrações maiores de glicose em ambos cultivos levou à obtenção de menos biomassa (Figura 5.31).

Entretanto, o emprego do resíduo no cultivo heterotrófico conferiu teores de lipídeos maiores (13 % em R10 e 24 % em R20) que o uso de glicose comercial (7,6 % em G10 e 11,8 % em G20). Mas devido à baixa produção de biomassa, R10 e R20 apresentaram  $P_{LT}$  5 vezes menores (15,3 e 23,3 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente) (Figura 5.32).



**Figura 5.32.** Teor de lipídeos totais e produtividade em lipídeos totais obtidos com *Scenedesmus* sp. cultivada em fototrofia, mixotrofia e heterotrofia com meio BG11-N. G10 e G20 – 10 e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose comercial. R10 e R20 – 10 e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose do resíduo da indústria de celulose. Os valores são a média de três réplicas ± desvio padrão.

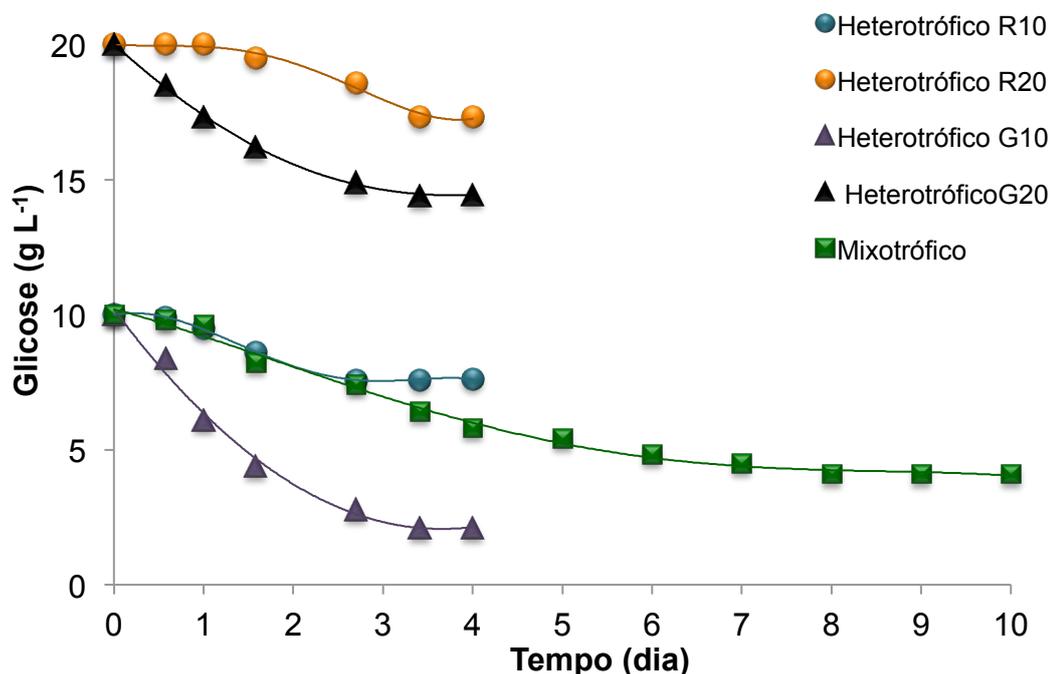
LI *et al.* (2011) cultivaram *Chlorella minutíssima* em heterotrofia usando diferentes fontes de carbono (glicose, ácido oxálico, amido, sacarose, glicina, acetate de sódio e glicerina) e alcançou as maiores  $P_X$  e  $P_{LT}$  com glicerina (110 e 17,9 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente). Utilizando glicose, *C. minutíssima* apresentou  $P_X$  e  $P_{LT}$  de 80,4 e 10,9 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente, 16 e 10 vezes menores que as  $P_X$  e  $P_{LT}$  de SCIB-01 (1250 e 97,5 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente) cultivada também em glicose. Todavia, após LI *et al.* (2011) otimizarem as concentrações de glicerina (26,4 g L<sup>-1</sup>), caseína (2,6 g L<sup>-1</sup>) e fósforo (0,03 g L<sup>-1</sup>), aumentaram drasticamente  $P_X$  e  $P_{LT}$  para 1780 e 286,7 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente.

Em heterotrofia com 5 g L<sup>-1</sup> de glicose, *S. quadricauda* cultivada por ZHAO *et al.* (2012) apresentou velocidade de crescimento (0,57 d<sup>-1</sup>) e biomassa (3,39 g L<sup>-1</sup>) 60 % e 35 % menores, respectivamente, que as máximas de SCIB-01 em heterotrofia (1,41 e 5,12 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). *S. quadricauda* atingiu rendimento em lipídeos de 0,75 g L<sup>-1</sup> em 8 dias, enquanto o de SCIB-01 foi de 0,37 g L<sup>-1</sup> em 4 dias.

*S. quadricauda* também utilizou água residual de amido contendo 3 g L<sup>-1</sup> de glicose em cultivo heterotrófico e esgotou esta fonte de carbono em 2 dias, promovendo a produção de 3,36 g L<sup>-1</sup> de biomassa e 27,8 % de lipídeos em 3 dias (ZHAO *et al.*, 2012). SCIB-01 também se mostrou capaz de consumir quase 3 g L<sup>-1</sup> de glicose de resíduo (Figura 5.33), apresentando alto TLT (23 %) mas com pouca produção de biomassa (0,47 g L<sup>-1</sup>).

Na Figura 5.33, verificou-se que SCIB-01 assimilou mais glicose quando sua concentração inicial foi menor e metabolizou mais rápido o carbono orgânico comercial que o do resíduo. Nos cultivos com hidrolisado de resíduo, a microalga demorou pelo menos 12 horas para iniciar sua assimilação. Em mixotrofia, a estabilização do consumo de glicose demandou mais tempo (7 dias). SCIB-01 não esgotou a glicose em nenhum dos cultivos, consumindo até 8 g L<sup>-1</sup> em apenas 4 dias quando cultivada em heterotrófico G10.

OCTAVIO *et al.* (2011) reportaram que existe um número limitado de espécies de microalgas que podem conduzir metabolismo heterotrófico, devido à ausência de enzimas que catalisam e utilizam substratos orgânicos (HELBUST & LEWIN, 1977). TAMARYS *et al.* (2011) reportaram que, dentre as poucas espécies mixotróficas, encontram-se *Spirulina platensis*, *Chlamydomonas reinhardtii* e *Chlorella vulgaris*.



**Figura 5.33.** Consumo de glicose por *Scenedesmus* sp. durante os cultivos mixotróficos e heterotróficos com meio BG11-N. G10 e G20 – 10 e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose comercial. R10 e R20 – 10 e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose do resíduo da indústria de celulose. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

YEH & CHANG (2012) avaliaram a performance de *C. vulgaris* em cultivo fototrófico, mixotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico (10 g L<sup>-1</sup> glicose). Com meio pobre (MBL 0,085 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>), *C. vulgaris* produziu em heterotrofia 7,7 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de lipídeos, 13 vezes menor que *Scenedesmus* sp. alcançou em cultivo heterotrófico G10 (97,6 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Enquanto em mixotrofia, *C. vulgaris* apresentou sua máxima produtividade em lipídeos (143,9 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), comparável com a de SCIB-01 em mixotrofia (138,1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

ZHAO *et al.* (2012) reportaram que *S. quadricauda* cresceu tanto em heterotrofia como em mixotrofia, quando alcançou 2,8 g L<sup>-1</sup> de biomassa e 33,1 % de TLT, obtendo uma P<sub>LT</sub> (110 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) 20 % menor que a de SCIB-01 em mixotrofia (138 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

ANDRULEVICIUTE *et al.* (2014) avaliaram a performance de microalgas em cultivo mixotrófico com glicerol e obtiveram P<sub>X</sub> de 227 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e TLT de 17,8 % com *Chlorella* sp., P<sub>X</sub> de 229 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e TLT de 22,3 % com *Scenedesmus* sp., P<sub>X</sub>

de 271 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e TLT de 27,5 % com *Haematococcus* sp. e P<sub>X</sub> de 191 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e TLT de 34,2 % com *Nannochloropsis* sp..

Todavia, foi em cultivo mixotrófico que o presente trabalho atingiu o máximo teor de lipídeos (34 %), resultando na máxima produtividade lipídica (138,1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), seguida pela do heterotrófico G10 e G20 e fototrófico (Figura 5.32).

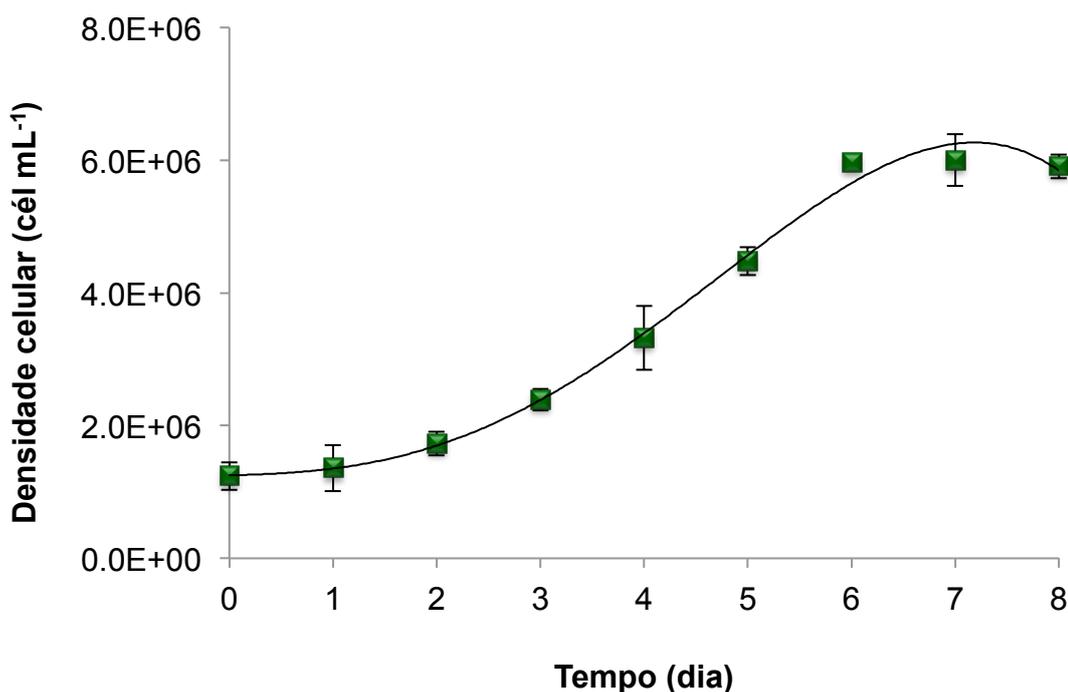
DARZINS *et al.* (2008) avaliaram a via de síntese de ácido graxo no cloroplasto e confirmou que a formação de malonil-CoA, catalisada pela acetil-CoA carboxilase a partir de acetil-CoA e CO<sub>2</sub>, é um passo primordial. Quando a microalga assimila glicose como fonte de carbono, ela esgota a fonte de nitrogênio mais rápido e, com CO<sub>2</sub> sob condições mixotróficas, a taxa de acúmulo de lipídeos seria estimulada. Isto explica porque culturas mixotróficas resultam maiores produtividades em lipídeos com microalga. Embora o uso de glicose para o crescimento resulte em maior produtividade lipídica, a conversão de CO<sub>2</sub> em lipídeos é mais promissora sob a perspectiva de mitigação deste gás (CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010). Com isso, em cultivo mixotrófico têm-se tanto vantagem econômica, ao aumentar a P<sub>LT</sub>, quanto ambiental, por contribuir na redução de CO<sub>2</sub> atmosférico.

ZHAO *et al.* (2012) demonstraram que a fixação de CO<sub>2</sub> em mixotrofia reduz com o aumento da concentração de glicose, pois quando esta é alta fornece mais carbono orgânico e se torna a fonte de carbono principal da microalga. De acordo com SFORZA *et al.* (2012), CO<sub>2</sub> e glicose são cruciais para a microalga alcançar a máxima densidade celular e rendimento em lipídeos. Entretanto, o excesso de CO<sub>2</sub> poderia bloquear o metabolismo de glicose e resultar na inibição do cultivo mixotrófico. Contudo, inferiu-se que a concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico (0,03 %) foi ótima para a produtividade lipídica de *Scenedesmus* sp. SCIB-01 cultivada em condições mixotróficas.

### **5.7. CULTIVO DE *Scenedesmus* sp. EM GARRAFÃO E SUA PROPAGAÇÃO PARA INOCULAÇÃO EM FOTOBIOREACTORES**

O cultivo em garrafão e sua propagação foram realizados visando o escalonamento da produção de biomassa de *Scenedesmus* sp. em fotobiorreatores de 1.100 L.

Na Figura 5.34 pode ser visualizada a cinética do cultivo de garrafão. No final da fase exponencial obteve-se uma densidade celular de  $5,97\text{E}+06$  céls  $\text{mL}^{-1}$  e com isso alcançou-se uma produtividade ( $P_x$ ) de  $7,88\text{E}+05$  céls  $\text{mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ . A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) foi de  $0,31 \text{d}^{-1}$  na fase exponencial. E o tempo de duplicação foi de 2,2 d.

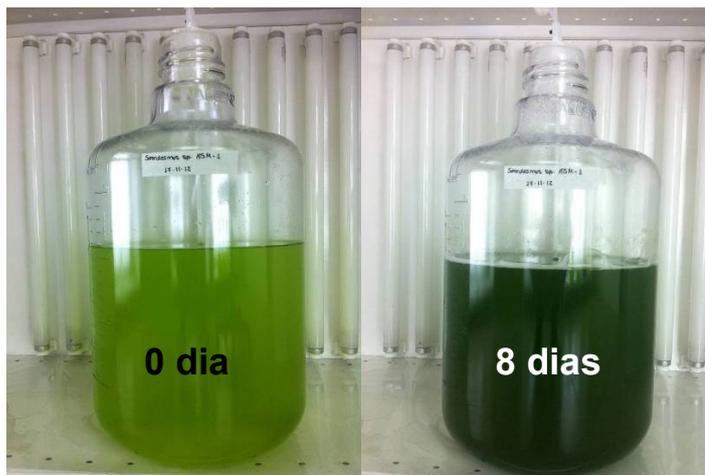


**Figura 5.34.** Cultivo de garrafão de *Scenedesmus* sp. conduzido em sistema de 20 L sob  $400 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $8 \text{L ar min}^{-1}$  e  $23 \text{°C}$ . Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

A análise de biomassa seca determinou que as réplicas do cultivo em garrafão iniciaram com  $53,4 \pm 3,1 \text{ mg L}^{-1}$  e finalizou com  $320,1 \pm 23,04 \text{ mg L}^{-1}$ , conferindo um rendimento médio de biomassa algácea seca de  $266,6 \text{ mg L}^{-1}$ .

Na Figura 5.35 pode ser visualizada a diferença de coloração da cultura entre o seu primeiro dia (verde claro) e o último dia de cultivo (verde escuro), mostrando claramente o grande aumento da densidade celular em sistema de 20 L.

Considerando que em 6 dias obteve-se a máxima densidade celular, este tempo foi aplicado para desenvolver os cultivos de garrafão posteriores, cujas culturas foram inoculadas no cultivo de propagação após aferição da densidade celular.

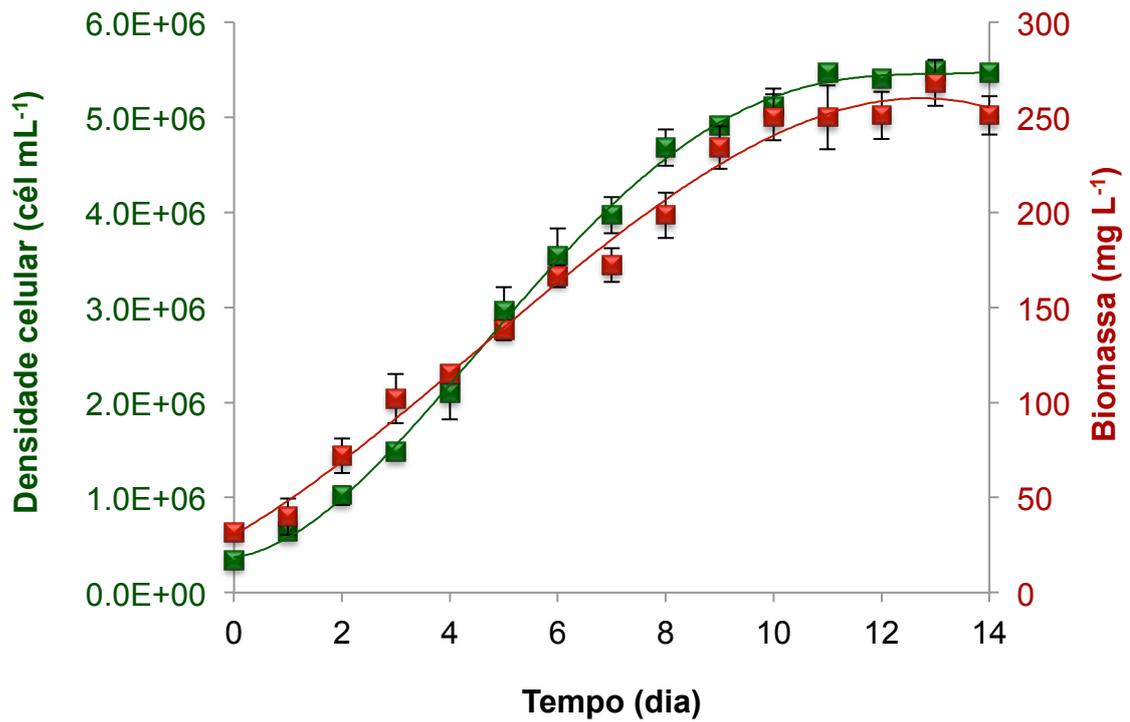


**Figura 5.35.** Cultivo de garrafão de *Scenedesmus* sp. com 0 e 8 dias de crescimento sob  $400 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $8 \text{ L ar min}^{-1}$  e  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ .

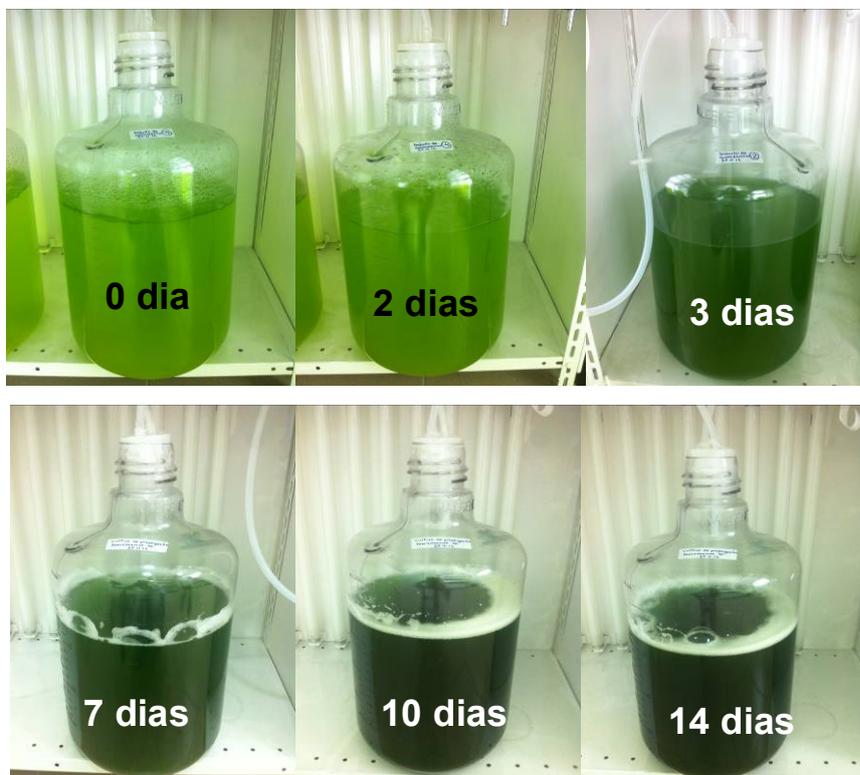
Desta forma, levantou-se o perfil cinético do cultivo de propagação ilustrado na Figura 5.36. Este perfil apresenta uma fase de crescimento com duração de 11 dias quando se analisa a densidade celular e de 10 dias quando se considera a biomassa seca. De fato, a análise de biomassa seca não detectou o pequeno aumento do número de células ocorrido entre os dias 10 e 11, demonstrando que a análise de densidade celular foi mais minuciosa e realista e que, por isso, conferem dados mais confiáveis. Desta forma, a análise dos perfis cinéticos baseou-se primeiramente na densidade celular, utilizando a biomassa seca como uma análise secundária para a delimitação das fases de crescimento e determinação do tempo ideal de cultivo.

A densidade celular estabilizou-se em  $5,46\text{E}+06$  céls  $\text{mL}^{-1}$  ( $\mu$   $0,27 \text{ d}^{-1}$ ) e a máxima biomassa alcançada foi  $268 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , obtendo-se  $P_x$  de  $22 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Analisando os resultados obtidos, ao selecionar o dia 8 como o melhor tempo, ao invés do dia 11, reduziria a densidade celular em 16 % mas diminuiria a duração do processo em 30 % (3 dias). Além disso, os cultivos de propagação, ao serem coletados em plena fase exponencial, constituiriam um inóculo de melhor qualidade para as produções de biomassa em fotobiorreatores.

A Figura 5.37 apresenta imagens do cultivo de propagação, percebendo-se visualmente o aumento da densidade celular a partir do dia 3.



**Figura 5.36.** Cultivo de propagação de *Scenedesmus* sp. conduzido em sistema de 20 L sob 400  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 9 L ar  $\text{min}^{-1}$  e 23 °C. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 5.37.** Imagens do cultivo de propagação de *Scenedesmus* sp. nos dias 0, 2, 3, 7, 10 e 14.

## 5.8. PRODUÇÃO DE *Scenedesmus* sp. EM FOTOBIOREATORES DE 1.100 L

Para realizar as produções de microalga em fotobiorreatores de 1.100 L, primeiramente obtiveram-se os inóculos através da repetição de toda sequência de escalonamento (Figura 4.7): cultivo de ativação, inóculo, cultivo de garrafão e cultivos de propagação, crescidos até atingir a densidade celular desejável de acordo com os resultados obtidos até esta etapa da pesquisa.

Os resultados alcançados nas produções de microalgas realizadas nos fotobiorreatores, conduzidas em bateladas simples, alimentada e semicontínua, encontram-se nas seguintes seções.

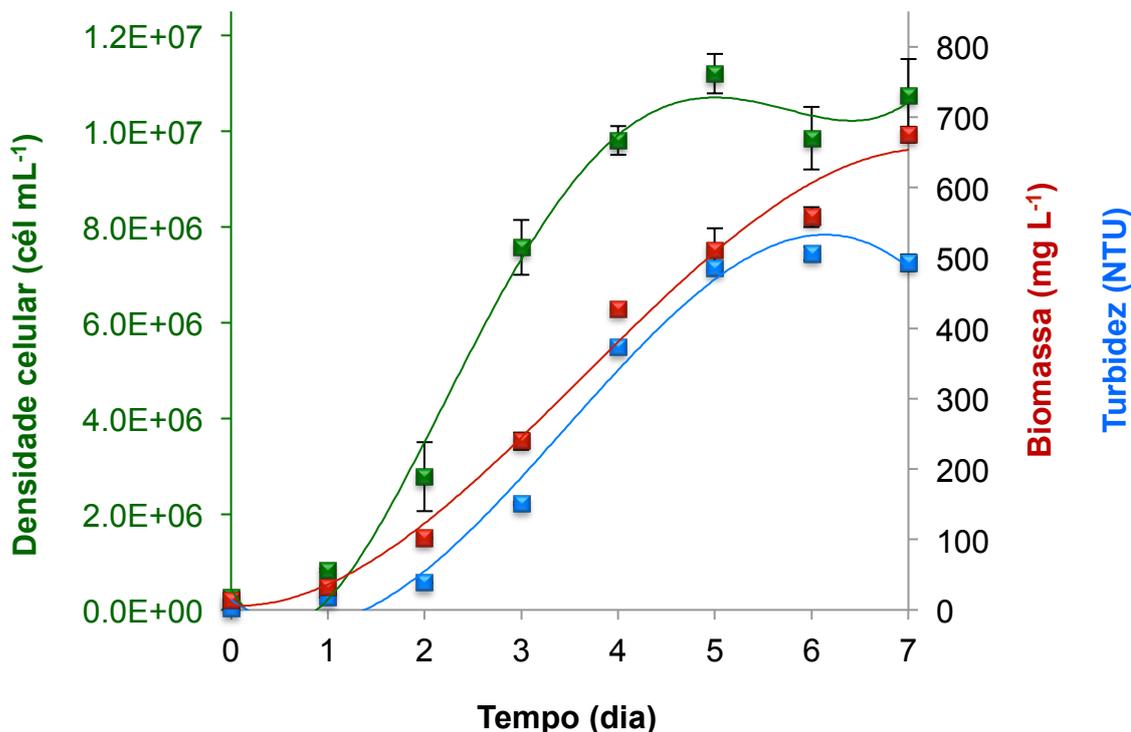
### 5.8.1. PRODUÇÃO DE *Scenedesmus* sp. EM BATELADA SIMPLES

A Figura 5.38 apresenta o perfil cinético da batelada simples. Nesta batelada, o início foi marcado por um intenso crescimento das microalgas, indicando a rápida adaptação do inóculo à nova e tão distinta condição de cultivo. A fase de crescimento constituiu um pequeno intervalo de 4 dias, quando a densidade celular começa a se estabilizar precedendo a fase estacionária. Os valores de biomassa seca e turbidez também acompanham o aumento da densidade de células, confirmando em outras unidades o rápido crescimento de *Scenedesmus* sp. em fotobiorreatores e demonstrando a eficiência do novo sistema de cultivo empregado.

No final da fase de crescimento, foram alcançadas  $1,12 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup> e 675 mg L<sup>-1</sup> de biomassa seca, obtendo  $P_x$  de 94,5 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> no final do processo.

A turbidez do cultivo iniciou em 2,4 NTU, aumentou até o quinto dia (486 NTU) e depois se manteve estabilizado até o sétimo e último dia.

Nos primeiros quatro dias, a microalga cresceu muito rápido e sua população foi duplicada em aproximadamente 5 vezes, alcançando na fase exponencial  $\mu$  de 0,75 d<sup>-1</sup> e Td de 0,96 dia.



**Figura 5.38.** Produção de *Scenedesmus* sp. em batelada simples em fotobiorreatores de 1.100 L sob radiação solar, 10 L ar min<sup>-1</sup>, temperatura máxima de 30 °C e pH 8,0. Os valores são a média de três réplicas  $\pm$  desvio padrão.

As análises de determinação de lipídeos totais mostraram que no final do cultivo foi alcançado um teor de  $14,23 \pm 0,51$  %. Considerando a biomassa seca máxima obtida ( $675 \text{ mg L}^{-1}$ ), obtiveram-se 96,2 mg de lipídeos por litro de cultivo. Assim, o rendimento total da batelada simples foi de 1.100 L de cultura algácea, contendo  $1,20 \times 10^{13}$  células, 721,7 g de microalga seca e 106 g de lipídeos totais.

Na Figura 5.39 podem ser visualizadas imagens do cultivo em diferentes dias, verificando o aumento rápido da intensidade da cor verde que está relacionada ao aumento da população algácea durante a batelada simples.

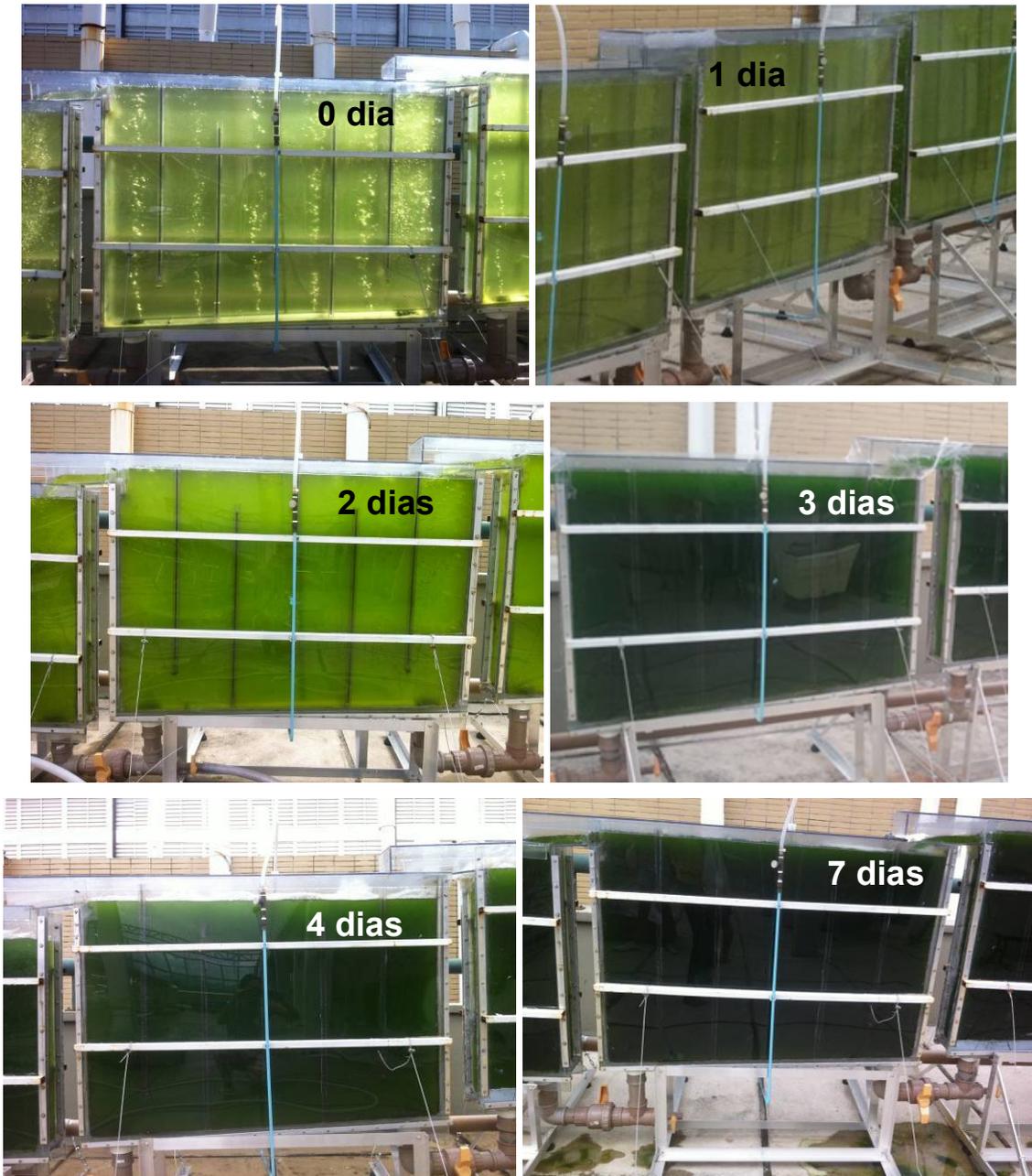


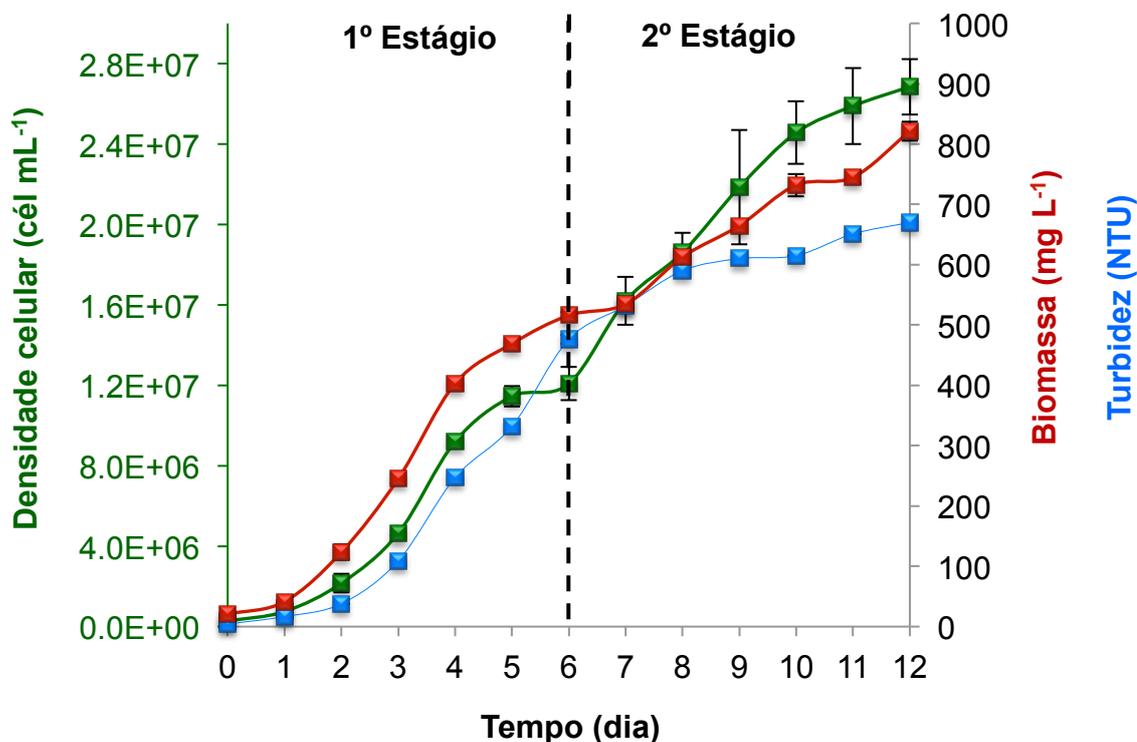
Figura 5.39. Imagens da produção de *Scenedesmus* sp. em batelada simples com diferentes dias.

### 5.8.2. PRODUÇÃO DE *Scenedesmus* sp. EM BATELADA ALIMENTADA

Na Figura 5.40 está o perfil cinético da batelada alimentada realizada em fotobiorreatores, que foi dividida em dois estágios sequenciais por meio de uma alimentação com todos os nutrientes do meio ASM1 concentrados para 1.100 L.

No primeiro estágio, a fase de crescimento termina após 5 dias de acordo com a densidade de células, enquanto a biomassa seca e turbidez continuam

aumentando. Após a alimentação com 6 dias de cultivo, a densidade celular voltou a aumentar, assim como a biomassa e a turbidez. Entretanto, o aumento da biomassa no segundo estágio foi menor que o obtido no primeiro estágio.



**Figura 5.40.** Produção de *Scenedesmus* sp. em batelada alimentada em fotobiorreatores de 1.100 L sob radiação solar, 10 L ar min<sup>-1</sup>, temperatura máxima de 30 °C e pH 8,0. Os valores são a média de três réplicas ± desvio padrão.

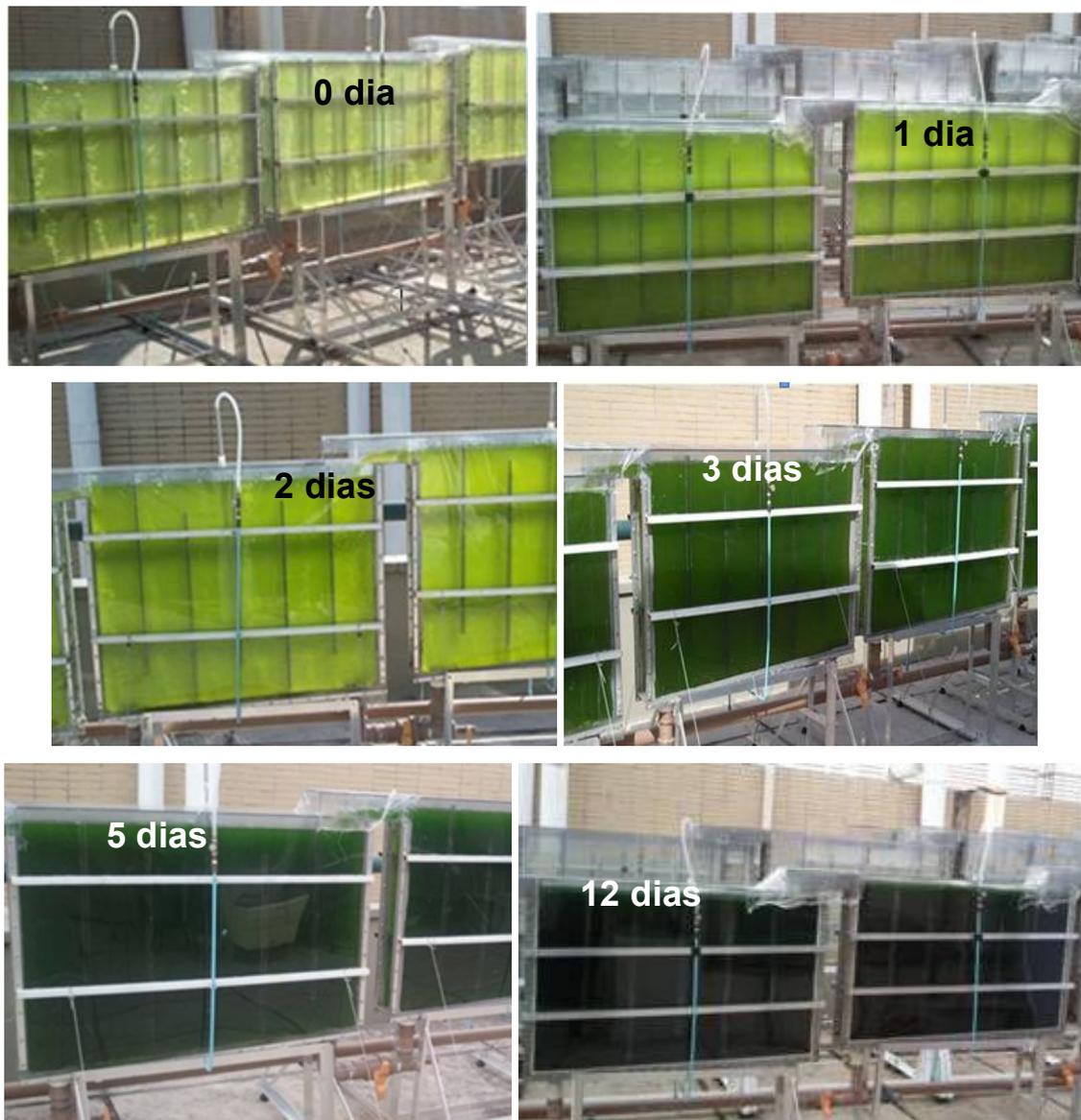
No final do sexto dia, foram obtidas 1,21E+07 céls mL<sup>-1</sup> e 516 mg L<sup>-1</sup> de biomassa, correspondendo a uma produtividade de 82,6 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> no primeiro estágio. A produtividade em biomassa no segundo estágio caiu para 50,9 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. No final de todo o processo, 12 dias, foram alcançadas 2,07E+07 céls mL<sup>-1</sup> e 821 mg L<sup>-1</sup> de biomassa ( $P_x$  66,8 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

No primeiro estágio verificou um  $\mu$  (0,75 d<sup>-1</sup>) 6 vezes maior que o do segundo estágio (0,12 d<sup>-1</sup>), confirmando que a alimentação com nutrientes não manteve a alta velocidade de crescimento da microalga.

No final da batelada, foi alcançado um teor de 12,94±0,50 % de lipídeos totais. O total do rendimento da batelada alimentada com dois estágios foi de 1.100

L de cultura algácea, contendo  $2,28E+13$  células, 903,1 g de alga seca e 116 g de lipídeos totais.

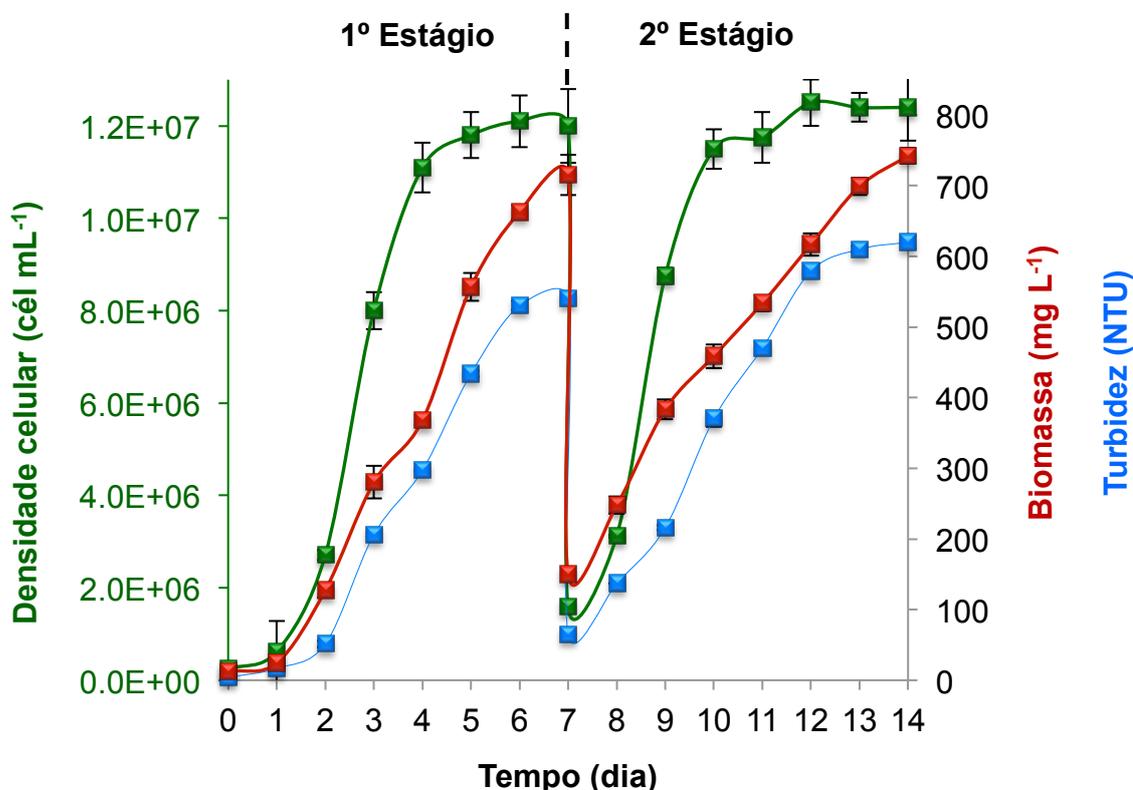
Na Figura 5.41, encontram-se imagens do cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. conduzido em fotobiorreatores de 1.100 L em batelada alimentada.



**Figura 5.41.** Imagens da produção de *Scenedesmus* sp. em batelada alimentada.

### 5.8.3. PRODUÇÃO DE *Scenedesmus* sp. EM BATELADA SEMICONTÍNUA

A Figura 5.42 apresenta o perfil cinético da batelada semicontínua realizada em fotobiorreatores de 1.100 L. Esta batelada foi realizada em dois estágios sequenciais, finalizando o primeiro com a coleta de 85 % da cultura e iniciando o segundo com os 15 % restantes.



**Figura 5.42.** Produção de *Scenedesmus* sp. em batelada semicontínua em fotobiorreatores de 1.100 L sob radiação solar, 10 L ar min<sup>-1</sup>, temperatura máxima de 30 °C e pH 8,0. Os valores são a média de três réplicas ± desvio padrão.

No início do primeiro estágio, ocorreu um rápido crescimento das microalgas e a fase de crescimento durou quatro dias, quando a densidade celular começou a se estabilizar. Os valores de biomassa seca e turbidez acompanharam o aumento da densidade celular nos primeiros quatro dias.

Alcançaram-se no final do primeiro estágio 1,21E+07 céls mL<sup>-1</sup>, 715,7 mg L<sup>-1</sup> de biomassa (P<sub>x</sub> 102,14 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e 540 NTU. No segundo estágio, alcançaram-se

$1,15E+07$  céls  $mL^{-1}$  e  $742$  mg de massa seca  $L^{-1}$  no final do crescimento (dia 14), quando se alcançou as máximas turbidez ( $620$  NTU) e  $P_x$  de  $106,14$  mg  $L^{-1} d^{-1}$ .

A velocidade de crescimento no primeiro estágio foi  $0,78 d^{-1}$ , enquanto no segundo foi  $0,66 d^{-1}$ , correspondendo a tempos de duplicação de  $0,90$  e  $1,05$  dia, respectivamente.

As análises de determinação de lipídeos totais mostraram que no final do primeiro e segundo estágios foram alcançados teores de  $15,04 \pm 0,42$  e  $17,07 \pm 0,36$  %, respectivamente. No primeiro estágio, ao considerar a biomassa máxima obtida ( $715$  mg  $L^{-1}$ ) e o volume coletado ( $950$  L), produziram-se  $102,2$  g de lipídeos totais. E no segundo estágio, com  $742$  mg  $L^{-1}$  de biomassa e  $1.100$  L de cultura coletados, produziram-se  $139,3$  g de lipídeos.

O total do rendimento da batelada semicontínua com dois estágios foi de  $2.050$  L de cultura algácea, contendo  $2,33E+13$  células,  $1.496$  g de alga seca e  $241,5$  g de lipídeos totais.

Na Figura 5.43, encontram-se imagens do cultivo em batelada semicontínua.



**Figura 5.43.** Imagens da produção de *Scenedesmus* sp. em batelada semicontínua.

Ao comparar os rendimentos e as produtividades médias em biomassa seca ( $P_x$ ) e em lipídeos totais ( $P_{LT}$ ) alcançados nas bateladas simples, semicontínua e alimentada (Tabela 5.5), verificou-se que a forma de condução menos eficiente foi a alimentada.

**Tabela 5.5.** Rendimentos médios em volume de cultura, número de células, biomassa seca e lipídeos totais e produtividades médias em biomassa seca ( $P_x$ ) e lipídeos totais ( $P_{LT}$ ) alcançados nas bateladas simples, alimentada e semicontínua conduzidas em fotobiorreatores de 1.100 L.

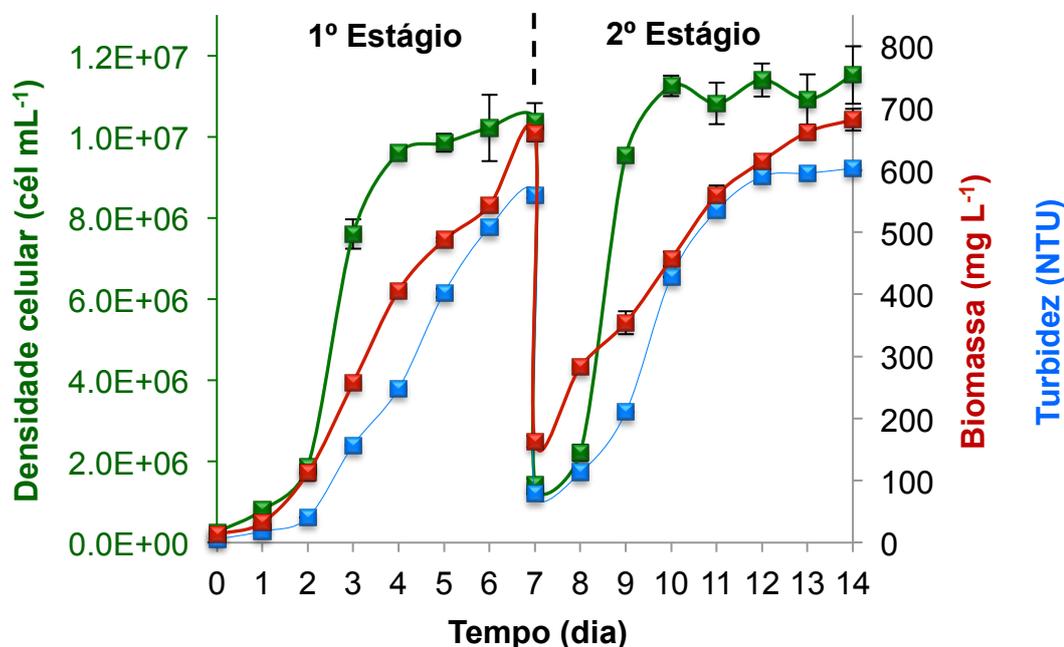
Forma de condução	Tempo (dia)	Volume (L)	Nº de células	Biomassa seca (g)	Lipídeos totais (g)	$P_x$ (g d <sup>-1</sup> )	$P_{LT}$ (g d <sup>-1</sup> )
<b>Batelada simples</b>	7	1.100	1,20E+13	721,7	106,0	103,1	15,1
<b>Batelada alimentada</b>	12	1.100	2,28E+13	903,1	116,0	75,3	9,7
<b>Batelada semicontínua</b>	14	2.050	2,33E+13	1.496,0	241,5	106,9	17,3

Os rendimentos da semicontínua foram melhores que os da simples. Entretanto, as produtividades em biomassa seca e em lipídeos totais destas duas bateladas foram muito similares. Desta forma, poderia optar por produzir microalgas em bateladas simples repetidas ou em semicontínua com vários estágios. Todavia, o inóculo da batelada simples é obtido através dos cultivos sequencias em escala laboratorial, assim como o inóculo do primeiro estágio da semicontínua. Já o inóculo do segundo estágio da semicontínua é produzido a partir do primeiro estágio, sendo desnecessária a produção de um novo inóculo em escala laboratorial.

Contudo, as bateladas simples repetidas demandariam muito mais tempo, materiais e mão-de-obra para produzir o inóculo. Baseando-se nisto, concluiu-se que a batelada semicontínua confere um custo benefício muito maior que a simples e por isso foi selecionada como a melhor forma de condução dentre aquelas estudadas nesta presente pesquisa.

Desta forma, a fim de validar os melhores resultados atingidos, realizou-se duas bateladas semicontínua. A Figura 5.44 apresenta o perfil cinético da validação,

que se mostrou muito similar àquele construído na primeira batelada semicontínua (Figura 5.42).



**Figura 5.44.** Perfil cinético da produção de *Scenedesmus* sp. na validação da batelada semicontínua em fotobiorreatores de 1.100 L sob radiação solar, 10 L ar min<sup>-1</sup>, temperatura máxima de 30 °C e pH 8,0. Os valores são a média de duas réplicas ± desvio padrão.

O total do rendimento na validação da batelada semicontínua com dois estágios foi de 2.050 L de cultura algácea, contendo 2,45E+13 células, 1.474 g de alga seca e 252,6 g de lipídeos totais. As produtividades em biomassa seca foi de 105,3 g d<sup>-1</sup> e em lipídeos totais foi de 18,4 g d<sup>-1</sup>. Comparando as produtividades da batelada semicontínua com as de sua validação (Tabela 5.5), houve uma discrepância de 6,3 %.

Tais resultados mostraram claramente que a produção em batelada semicontínua foi validada, corroborando a reprodutibilidade do processo em fotobiorreatores de 1.100 L.

FENG *et al.* (2011<sup>b</sup>) cultivaram *Chlorella zofingiensis* em fotobiorreator de 60 L (90 cm de largura, 17 cm de espessura e 40 cm de altura) utilizando meio BG11 e em batelada semicontínua. A maior produtividade em biomassa alcançada com *C.*

*zofigiensis* foi  $58,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , cerca de duas vezes menor que a obtida com *Scenedesmus* sp. SCIB-01 ( $106,14 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) cultivada em fotobiorreator de 1.100 L (120 cm de largura, 11 cm de espessura e 80 cm de altura) em batelada semicontínua. Porém, SCIB-01 apresentou  $\mu$  ( $0,78 \text{ d}^{-1}$ ) e produtividade em lipídeos ( $18,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) pouco menores que as máximas obtidas com *C. zofigiensis*,  $0,99 \text{ d}^{-1}$  e  $23 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente.

A  $P_x$  de SCIB-01 alcançada no presente trabalho foi muito maior que a de *C. vulgaris* ( $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e *C. emersonii* ( $41 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) cultivada em fotobiorreator tubular de 230 L por SCRAGG *et al.* (2002).

Entretanto, a  $P_x$  de *Spirulina platensis* ( $4300 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) cultivada por HU *et al.* (1996) foi muito superior que a de SCIB-01. A alta  $P_x$  de *S. platensis* foi obtida em fotobiorreator com apenas 2,6 cm de espessura, 4,2 vezes menor que a espessura do fotobiorreator utilizado no presente trabalho (11 cm), a qual poderia reduzir significativamente a penetração de luz na cultura e, conseqüentemente, reduziria a viabilidade de luz dentro do sistema de cultivo. De acordo com RICHMOND *et al.* (2003) e ERIKSEN (2008), fotobiorreatores com maior espessura conferem uma eficiência fotossintética muito menor.

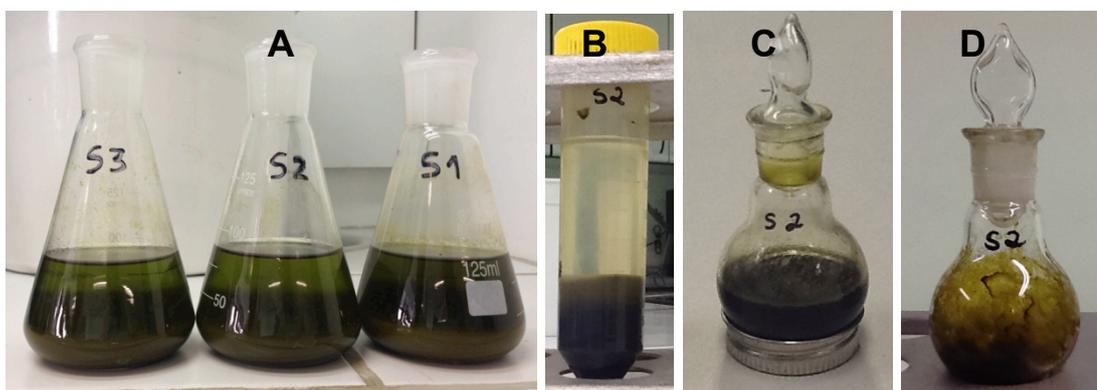
RICHMOND *et al.* (2003) conseguiram dobrar a eficiência fotossintética de *Nannochloropsis* sp. quando reduziram a espessura do fotobiorreator de 9 cm para 1 cm, aumentando a biomassa de 3,9 para  $43,5 \text{ g L}^{-1}$ .

ERIKSEN (2008) sugeriu que curtas trajetórias de luz podem manter o mínimo de zonas escuras, especialmente se utilizar altas densidades celulares. Com isto, pode-se inferir que a produtividade de SCIB-01 poderia aumentar significativamente se a trajetória da luz nos fotobiorreatores fosse menor que 11 cm. Além disso, a contaminação por bactérias, fungos e outras algas em fotobiorreatores semiabertos pode afetar negativamente o crescimento da microalga, conferindo baixas  $P_x$  (SING *et al.*, 2010).

Segundo HUERLIMANN *et al.* (2010) uma produção de microalgas que atinja  $500 \text{ mg}$  de biomassa seca  $\text{L}^{-1}$  contendo em média 15 % de lipídeos atenderia à produção de microalgas para a produção de biodiesel. Sendo assim, os resultados alcançados em ambas formas de condução mostraram que o presente trabalho oferece uma alternativa de produção de biomassa algácea muito promissora.

### 5.9. PRODUÇÃO DE BODIESEL A PARTIR DA MICROALGA CULTIVADA EM FOTOBIORREATORES DE 1.100 L

A biomassa proveniente da validação do cultivo em batelada semicontínua foi submetida à extração de óleo de acordo com a metodologia do item 4.16.6, avaliando-se diferentes molaridades de HCl (3, 5 e 8 mol L<sup>-1</sup>). Foram alcançados teores de óleo de 9,48±1,17, 9,41±0,87 e 10,41±0,47 com 3, 5 e 8 mol L<sup>-1</sup> de HCl, respectivamente. Desta forma, o óleo microalgáceo foi extraído com HCl a 3 mol L<sup>-1</sup> e utilizado na produção de biodiesel por transesterificação. A Figura 5.45 apresenta imagens do processo de extração de óleo com HCl a 3 mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 5.45.** Imagens do processo de extração de óleo de *Scenedesmus* sp. (A) - Biomassa e solventes; (B) - Fase etérea contendo óleo (inferior), biomassa (intermediária) e mistura etanol - ácido - água (superior) após centrifugação; (C) - Fase etérea contendo óleo; (D) - óleo seco.

A mesma biomassa empregada no processo de transesterificação também foi utilizada para a produção de biodiesel por hidroesterificação e saponificação/esterificação.

O produto final de cada reação foi submetido às análises cromatográficas, a qual determinou uma percentagem de ésteres metílicos totais de 99,27 %, 92,54 % e 94,34 % após transesterificação, hidroesterificação e saponificação/esterificação, respectivamente. As percentagens de ésteres alcançadas foram maiores que àquelas encontradas por VELJKOVIC & LAKICEVIC (2006) e CHEN *et al.* (2012), que alcançaram uma conversão de lipídeos microalgáceos em ésteres metílicos de 91,7 e 91-92,2 %, respectivamente.

A Tabela 5.6 apresenta a composição de FAME obtida em cada produção de biodiesel realizada. Segundo os resultados, a microalga estudada apresentou a seguinte distribuição de ácidos graxos: teor de SAFA (ácidos graxos saturados) > MUFA (ácidos graxos monoinsaturados) > PUFA (ácidos graxos poliinsaturados). Dentre os PUFA's, destacaram-se 18:2 (linoleico) e 18:3 (linolênico). Em relação aos SAFA's, o 16:0 (palmítico) se destacou. Quanto aos MUFA's, 18:1 (oleico) se mostrou majoritário.

**Tabela 5.6.** Composição de FAME (%) de *Scenedesmus* sp. produzido por transesterificação, hidroesterificação e saponificação seguida de esterificação.

FAME			Transesterificação (%)	Hidroesterificação (%)	Saponificação (%)
Capróico	6:0	SAFA	-	-	13,55
Láurico	12:0	SAFA	-	-	0,15
Mirístico	14:0	SAFA	5,33	0,36	1,70
Palmítico	16:0	SAFA	42,12	49,59	45,07
Palmitoléico	16:1	MUFA	4,18	0,82	4,31
Estearico	18:0	SAFA	1,50	1,52	-
Oleico	18:1	MUFA	25,45	22,73	25,25
Linoleico	18:2	PUFA	7,26	7,90	3,75
Linolênico	18:3	PUFA	6,10	4,00	3,52
Araquídico	20:0	SAFA	6,04	11,61	0,13
Eicosanóico	20:3	PUFA	-	-	1,32
Eicosapentanóico	20:5	PUFA	-	-	0,98
Behenico	22:0	SAFA	0,41	0,28	0,27
Lignocérico	24:0	SAFA	1,61	1,19	-

Em todos os perfis de ácidos graxos de *Scenedesmus* sp., os ácidos palmítico (16:0) e oleico (18:1) foram os principais obtidos (Table 5.6). Com isso, os perfis foram dominados pelos SAFA e MUFA, constituindo 86,64 %, 88,08 % e 90,43 % do

biodiesel obtido por transesterificação, hidroesterificação e saponificação/esterificação, respectivamente. Enquanto os poliinsaturados constituíram menos que 14 % em ambos biodieseis.

Esses resultados foram compatíveis aos encontrados em trabalhos anteriores, onde os ácidos palmítico e oleicos foram determinados como predominantes na maioria das espécies de microalgas cultivadas em água doce (COLLA *et al.*, 2004).

MAKULLA *et al.* (2000) apresentaram concentrações de ácido palmítico (16:0) entre 35,86 e 43,06 % na microalga *Scenedesmus obliquus*.

A principal composição de ácidos graxos de *S. obliquus* cultivada com 2,5 % de CO<sub>2</sub> por HO *et al.* (2012) foram C16 e C18 (76 – 84 % do total).

YOO *et al.* (2010) também obtiveram concentrações majoritárias de 16:0 quando estudaram o perfil lipídico das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *Botryococcus braunii*.

YEH & CHANG (2012) reportaram que o teor de C16 e C18 em *S. rubescens* na fase estacionária foi de 62 % (do total de FAME), menor que aqueles obtidos neste trabalho, com similar predominância dos ácidos graxos 16:0 e 18:1.

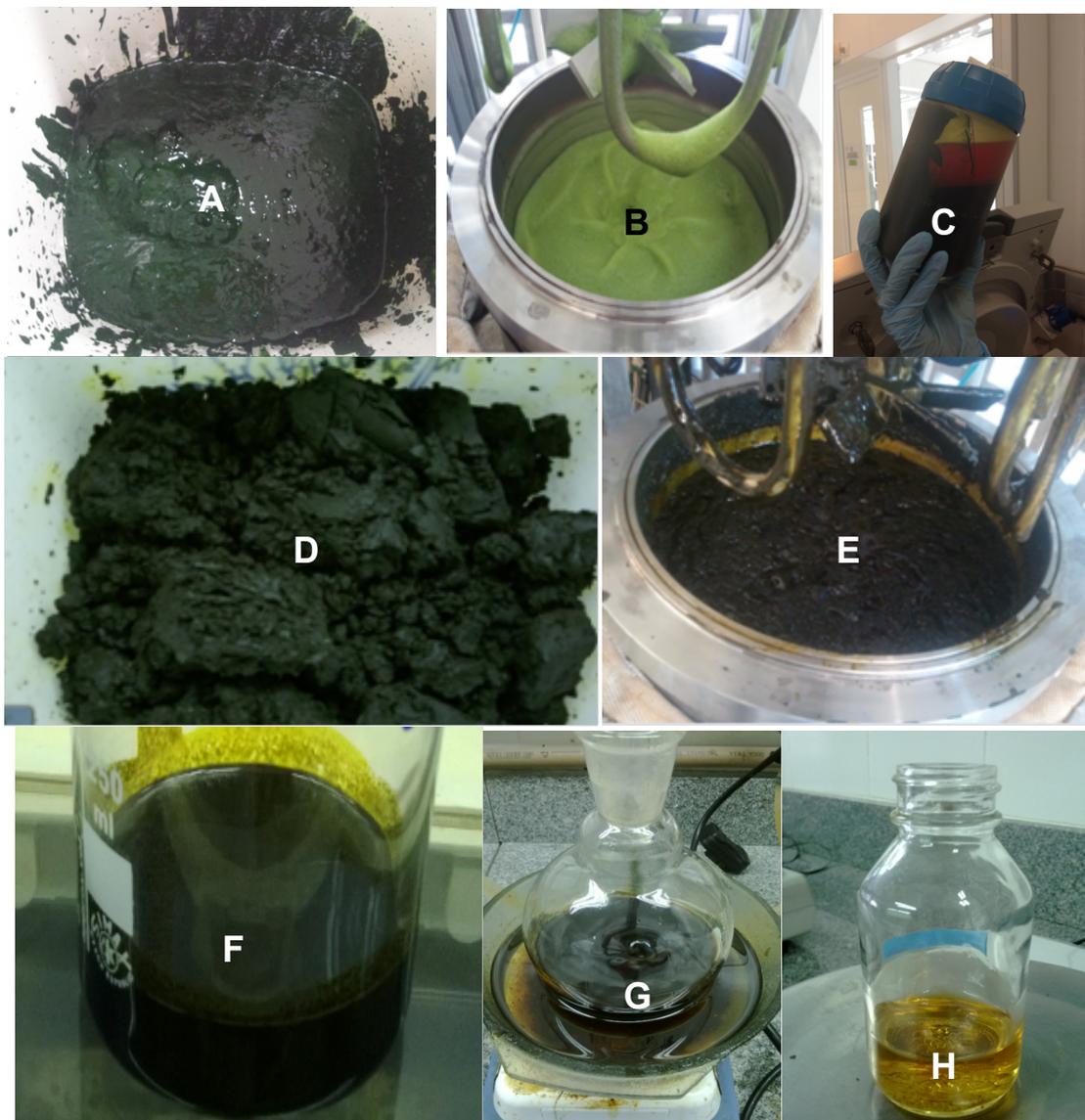
PRAVEENKUMAR *et al.* (2012) reportaram que o maior teor de C16 e C18 em *Chlorella* sp. foi 64,1 % mas o teor de C16 foi apenas 1,1 % do total de FAME e MUFA mais SAFA representaram menos que 76 %.

O trabalho de ANDRULEVICIUTE *et al.* (2014) apresentou teores muito altos de C16 e C18 em *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Haematococcus* sp., e *Nannochloropsis* sp., 97,5 %, 95 %, 89,5% e 83 %, respectivamente.

A composição do perfil de FAME confere características importantes ao biodiesel. Por exemplo, a presença de ácidos graxos poliinsaturados confere maior propensão à oxidação, que pode afetar a lubricidade do biocombustível. Sendo essencial que o biodiesel tenha altos níveis de ácidos graxos saturados e monoinsaturados com baixo nível de poliinsaturados (PRAVEENKUMAR *et al.*, 2012).

Contudo, ficou evidente que o perfil de FAME obtido com *Scenedesmus* sp. SCIB-01 neste trabalho apresentou potencial por estar de acordo com as propriedades desejáveis do biodiesel.

Na Figura 5.46 encontram-se imagens de algumas etapas da produção de biodiesel por saponificação/esterificação.



**Figura 5.46.** Produção de biodiesel de *Scenedesmus* sp. por saponificação/esterificação. (A) – Biomassa úmida antes da saponificação; (B) – Biomassa saponificada; (C) – Fase saponificável (inferior) separada da insaponificável (superior) por centrifugação; (D) – Biomassa residual da saponificação; (E) – Produto da acidulação do sabão; (F) – Ácidos graxos; (G) – Esterificação dos ácidos graxos; (H) – Biodiesel de *Scenedesmus* sp.

Na Tabela 5.7 encontram-se outras características determinadas para o biodiesel obtido por saponificação/esterificação de SCIB-01, as quais foram comparáveis, em sua maioria, com aquelas determinadas para o biodiesel B100.

**Tabela 5.7.** Características do biodiesel de *Scenedesmus* sp. produzido por saponificação/esterificação.

Características	Método	Especificação Biodiesel B-100	Biodiesel SCIB-01
Aspecto	-	Límpido e isento de impurezas	Límpido e isento de impurezas
Densidade a 20 °C, kg/m <sup>3</sup>	ASTM-D 1298 EN 3675	850 – 900	896,07
Viscosidade Cinemática a 40 °C, mm <sup>2</sup> /s	ASTM-D 445 EN 3104	3,0 – 6,0	5,88
Teor de éster, % m/m	EN 14103	96,5	94,34
Índice de acidez, mg KOH/g	ASTM-D 664 NBR 14448	0,5 máx.	1,75
Glicerol livre, % m/m	ASTM-D 6584 EN 14105 EN 14106	0,02 máx.	0,0068
Glicerol total, % m/m	ASTM-D 6584 EN 14105	0,25 máx.	0,026
Monoacilglicerol, % m/m	ASTM-D 6584 EN 14105	0,8 máx.	0,075
Diacilglicerol, % m/m	ASTM-D 6584 EN 14105	0,2 máx.	0,0003
Triacilglicerol, % m/m	ASTM-D 6584 EN 14105	0,2 máx.	0,0
Estabilidade oxidativa a 110 °C, h	EN 14112	6 h	3,33

Dentre as características analisadas, o teor de éster (94,3 %) ficou um pouco abaixo do valor requerido (96,5 %). Enquanto a estabilidade oxidativa (3,33 h) ficou muito abaixo da requerida (6 h). Estes resultados foram similares aos obtidos por CHEN *et al.* (2012), cujo biodiesel produzido a partir de *Scenedesmus* sp. e *Nannochloropsis* sp. também apresentaram teores de éster (91 e 92,2 %, respectivamente) e estabilidades oxidativa (5,4 e 1,93 h, respectivamente) fora das normas. Sabe-se que a característica molecular dos ácidos graxos, como o comprimento da cadeia de carbono e o grau de insaturação, afetam fortemente a estabilidade oxidativa do biodiesel (CHEN *et al.*, 2012).

O teor de ésteres obtido após a transesterificação (99,27 %) ficou acima daqueles obtidos após hidroesterificação (92,54 %) e saponificação/esterificação (94,34 %). No que concerne ao teor de éster, a transesterificação mostrou-se melhor que os outros processos realizados no presente trabalho.

Vale ressaltar que a hidroesterificação e saponificação/esterificação apresentam muitas vantagens quando comparadas com a transesterificação, como:

podem empregar matérias-primas com qualquer teor de acidez e umidade; nestas obtém-se uma glicerina mais pura que a da advinda da transesterificação, pois na esterificação não há formação de glicerol; seus biodieseis são gerados com elevada pureza, sem necessidade de etapas de lavagem que geram efluentes e elevado consumo de compostos químicos; e a água, subproduto, pode ser reutilizada no processo de hidrólise ou saponificação (ARCEO, 2012; SANCHEZ *et al.*, 2011).

É fato conhecido que o custo do biodiesel produzido a partir de biomassa úmida reduz consideravelmente em comparação com o daquele advindo de biomassa seca. BOER *et al.* (2012) reportaram que na produção de biodiesel via transesterificação direta de biomassa seca, 50 % da energia total foi consumida na etapa de secagem da microalga. Com isso, infere-se a grande vantagem das produções de biodiesel do presente trabalho, ambas realizadas com microalga úmida.

O processo de saponificação ainda permitiu a separação de outras frações da microalga, além dos lipídeos, como a biomassa residual e a fração insaponificável. Segundo HALIM *et al.* (2012), a biomassa residual da saponificação contém proteínas e carboidratos que podem ser aplicados no consumo humano e na produção de bioetanol, respectivamente. A biomassa residual também pode ser submetida à digestão anaeróbica para a produção de metano (CHISTI, 2007). Enquanto a fração insaponificável contém carotenóides de alto valor agregado, como a astaxantina, que apresenta alta atividade antioxidante (DONG *et al.*, 2014). Fica evidente as possibilidades de aproveitamento de todas as frações da microalga dentro do contexto de biorrefinaria, a fim de valorar a biomassa microalgácea.

Desta forma, a produção de biodiesel por saponificação/esterificação mostrou-se bastante interessante mas suas condições (por exemplo, quantidade de reagentes, temperatura, pressão e agitação) devem ser otimizadas para conferir um biodiesel de melhor qualidade e resíduos com máximo potencial de aproveitamento.

## 5.10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na Tabela 5.8 pode ser visualizada de maneira sumarizada a evolução do presente trabalho, relatando as produções de biomassa e lipídeos obtidas com *Scenedesmus* sp. SCIB-01 nas etapas de estudo do cultivo.

Ficou claro que ao longo da pesquisa foi possível aumentar consideravelmente as produtividades em lipídeos. Desta forma, mensurou-se um aumento de 55 % na  $P_{LT}$  quando se empregou o meio ASM1-O (otimizado), ao invés do ASM1 (original). A  $P_{LT}$  foi duplicada quando substituiu o ASM1-O por BG11-N. E na avaliação de diferentes tipos de cultivo, a  $P_{LT}$  em mixotrofia foi aumentada em, aproximadamente, 240 % em relação a fototrofia. Contudo, verificou-se ao longo do trabalho um aumento da  $P_{LT}$  de 860 % no cultivo mixotrófico com BG11-N ( $138,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), tendo como referência o primeiro cultivo fototrófico com ASM1 ( $16 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ).

**Tabela 5.8.** Resultados obtidos em cada etapa do cultivo de *Scenedesmus* sp. no presente trabalho.

Etapa	Condições	Biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ )	$P_X$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )	TLT (%)	$P_{LT}$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )
Avaliação de meios de cultura (sistema de 1 L)	ASM1	1,15	105	13,4	16,0
	ASM1-O	1,24	114	19,8	24,6
	BG11-N	2,20	210	27,8	60,8
	BG11-U	1,20	110	22,9	27,6
	BBM	1,86	178	10,5	19,6
Avaliação de tipos de cultivo (sistema de 1 L)	Fototrófico	2,25	218	25,3	55,2
	Heterotrófico G10	5,12	1.250	7,6	97,5
	Heterotrófico G20	3,40	863	11,8	101,3
	Heterotrófico R10	0,47	118	13,0	15,3
	Heterotrófico R20	0,39	98	24,0	23,3
	Mixotrófico	4,0	400	34,0	138,1
Avaliação de diferentes bateladas (sistema de 1.100 L)	Simplex	0,68	94,5	14,2	13,4
	Alimentada	0,82	66,8	12,9	8,6
	Semicontínua	0,74	106,1	17,1	18,1

$P_X$  – produtividade em biomassa;  $P_{LT}$  – produtividade em lipídeos totais; TLT – teor de lipídeos totais; ASM1-O – ASM1 com concentrações de nitrato, fosfato e vitaminas otimizadas no presente trabalho para a produção de biomassa e lipídeos; BG11-N e BG11-U – meio BG11 com nitrato e ureia, respectivamente; Heterotrófico G10 e G20 – com 10 e 20  $\text{g L}^{-1}$  de glicose comercial, respectivamente; Heterotrófico R10 e R20 – com 10 e 20  $\text{g L}^{-1}$  de glicose proveniente do resíduo lignocelulósico da indústria de celulose, respectivamente.

Embora o cultivo heterotrófico com hidrolisado de resíduo lignocelulósico da indústria de celulose não tenha conferido a máxima produtividade lipídica, é importante destacar a necessidade de translocar esta biomassa residual de sua posição de resíduo para a de matéria-prima, principalmente mediante a magnitude de sua geração.

Estima-se que para cada 100 toneladas de celulose produzida, 48 toneladas de resíduos sejam geradas (PEDRAZI, 2005). Considerando que a produção de celulose em 2013 foi 15,1 milhões de toneladas (BRACELPA, 2014), foram geradas neste ano cerca de 8 milhões de toneladas de resíduos, sendo 20 % destes constituídos por resíduo lignocelulósico do sistema de decantação (ARACRUZ, 2010), aquele empregado no presente trabalho. Sendo assim, faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre o emprego deste resíduo no cultivo de microalgas visando não somente aumentar sua produtividade lipídica mas também um crescimento econômico sustentável baseado em fontes renováveis.

Ao comparar o cultivo fototrófico realizada em fotobiorreatores de escala piloto (1.100 L), em batelada semicontínua, com o cultivo fototrófico conduzido em sistema de 1 L empregando ASM1, verificou-se a obtenção de  $P_X$  e  $P_{LT}$  similares. Podendo-se inferir, com isso, que o escalonamento se mostrou eficiente. Entretanto, baseando-se nos resultados obtidos, julga-se necessário o estudo de outras condições, como diferentes meios de cultura e tipos de cultivo, visando a obtenção de maiores  $P_X$  e  $P_{LT}$  também em escala piloto.

Através da Tabela 5.9 é possível comparar os melhores resultados do presente trabalho obtidos nos cultivos fototrófico, heterotrófico e mixotrófico com aqueles reportados por outros trabalhos que realizaram cultivos de microalgas visando a produção de biodiesel.

A performance de *Scenedesmus* sp. SCIB-01 na produção de biomassa e lipídeos foi melhor que a de muitas outras estirpes de microalgas. Entretanto, não foi tão boa quanto a de *S. quadricauda*, cultivada heterotroficamente com água residual por ZHAO *et al.* (2012), e a de *Chlorella minutíssima*, cultivada por LI *et al.* (2011) em condições fotoheterotróficas com concentrações de glicerina, caseína e fósforo otimizadas.

**Tabela 5.9.** Comparação dos melhores resultados do presente trabalho obtidos nos cultivos fototrófico, heterotrófico e mixotrófico de *Scenedesmus* sp. com aqueles reportados por outros trabalhos que realizaram cultivos de microalgas visando a produção de biodiesel.

Referência	Microalga	Tipo de cultivo	X (g L <sup>-1</sup> )	P <sub>x</sub> (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	TLT (%)	P <sub>LT</sub> (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Presente trabalho	<i>Scenedesmus</i> sp. SCIB-01	Fototrófico	2,25	218	25,3	55,2
		Heterotrófico <sup>a</sup>	5,12	1.250	7,6	97,5
		Mixotrófico	4,0	400	34,0	138,1
BASU <i>et al.</i> (2014)	<i>Scenedesmus</i> sp.	Fototrófico	-	139,4	-	-
ANDRULEVICIUTE <i>et al.</i> (2014)	<i>Scenedesmus</i> sp	Mixotrófico	-	229	22,3	51,1
	<i>Haematococcus</i>		-	271	27,5	74,5
	<i>Chlorella</i> sp.		-	227	17,8	40,4
	<i>Nannochloropsis</i> sp.		-	191	34,2	65,32
TANG <i>et al.</i> (2014)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Fototrófico	1,03	81	-	-
CHELLAMBOLI & PERUMALSAMY (2014)	<i>Scenedesmus abundans</i>	Fototrófico	-	39,1	26,3	10,3
BAKY <i>et al.</i> (2012)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Fototrófico	1,25	339	28,1	95,3
CHAICHALERM <i>et al.</i> (2012)	<i>Scenedesmus actus</i> <i>Monoraphidium contortum</i>	Fototrófico	0,8	44	25	11
			0,3	85,7	35	30
ZHAO <i>et al.</i> (2012)	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Fototrófico	-	-	28,1	140
		Heterotrófico <sup>b</sup>	3,39	-	-	93,8
		Heterotrófico <sup>c</sup>	3,36	1.100	27,8	311
		Mixotrófico	2,8	-	33,1	110
HO <i>et al.</i> (2012)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Fototrófico	1,34	-	-	21,2 - 45
LIN & LIN (2011)	<i>Scenedesmus rubescens</i>	Fototrófico	-	540	12,7	69
XIN <i>et al.</i> (2010)	<i>Scenedesmus</i> sp.	Fototrófico	-	-	-	20,3
Jl <i>et al.</i> (2014)	<i>Desmosdesmus</i> sp.	Fototrófico	0,41	29,3	-	-
YEH & CHANG (2012)	<i>Chlorella vulgaris</i>	Mixotrófico	3,2	271,5	53	143,9

Referência	Microalga	Tipo de cultivo	X (g L <sup>-1</sup> )	P <sub>X</sub> (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	TLT (%)	P <sub>LT</sub> (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
PRAVEENKUMAR et al. (2012)	<i>Chlorella sp.</i>	Fototrófico	2,52	125	42,8	53,96
LI et al. (2011)	<i>Chlorella minutissima</i>	Foto-heterotrófico	12,5	1780	16,1	286,8
FENG et al. (2011 <sup>b</sup> )	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Fototrófico	-	58,4	-	23
CONVERTI et al. (2009)	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Nannochloropsis oculata</i>	Fototrófico	-	-	15	20,4
			-	-	15	16,4
RUANGSOMBON (2012)	<i>Botryococcus braunii</i>	Fototrófico	1,91	95,5	54,7	42,2

X – biomassa; P<sub>X</sub> – produtividade em biomassa; P<sub>LT</sub> – produtividade em lipídeos totais; TLT – teor de lipídeos totais; a- Heterotrófico com 10 g L<sup>-1</sup> de glicose comercial; b- Heterotrófico com 5 g L<sup>-1</sup> de glicose comercial; c- Heterotrófico com 3 g L<sup>-1</sup> de glicose proveniente de água residual de amido.

Todavia, baseando-se nos resultados, a microalga *Scenedesmus sp.* SCIB-01 mostrou-se ser uma matéria-prima com grande potencial para ser utilizada na produção de biodiesel, devendo-se realizar mais estudos a fim de melhorar a qualidade deste biocombustível.

Segundo BOER et al. (2012), o interesse no desenvolvimento de tecnologias que transformam o óleo de microalgas em biodiesel, biocombustível de terceira geração, é devido às dificuldades de escalonamento da produção do biodiesel de primeira geração (a partir de soja, palma, girassol e colza, por exemplo) e de segunda geração (a partir de resíduos agroflorestais e urbanos). Considerando a produção de óleo vegetal e gordura em todo o mundo, o biodiesel produzido a partir desta matéria-prima não forneceria 10 % da demanda mundial de diesel (BOER et al., 2012).

As microalgas parecem ser a única fonte renovável para produção de biodiesel com capacidade de suprir a demanda global de combustíveis no setor de transporte. No caso do Brasil, é estimada a produção de 29,5 milhões de toneladas

de biodiesel para a substituição de todo o diesel utilizado em transporte por ano (FERRÉS, 2012). Considerando a soja como matéria-prima, seria necessária a ampliação do cultivo em 63 milhões de ha para atender esta necessidade, enquanto utilizando-se microalgas cultivadas em fotobiorreatores, poderia utilizar apenas 55 mil ha para a mesma produção (PÉREZ, 2007).

Contudo, vale ainda ressaltar que além do óleo de microalgas ser semelhante aos óleos vegetais, a sua estimada produção (1 milhão de litros/ha/ano) pode superar a do óleo de soja (450 litros/ha/ano) e ainda ser produzido a custo competitivo (US\$ 0,50/L) (CHISTI, 2007).

## CAPÍTULO 6

### 6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

As conclusões inferidas com base nos resultados obtidos e análises dos dados realizadas são as seguintes:

- ✓ Baseando-se nos resultados do DCCR para a otimização do meio ASM1 no cultivo fototrófico de *Scenedesmus* sp. SCIB-01, concluiu-se que o fosfato e nitrato têm efeitos estatisticamente significativos sobre a densidade de células, teor de lipídeos totais e produtividade em lipídeos, sendo que estas duas últimas respostas também sofrem efeito significativo de vitaminas;
- ✓ Verificou-se ainda que as condições que maximizam a densidade celular ( $1,60E+07$  céls mL<sup>-1</sup>) não maximizam o teor lipídico (30 %) e a produtividade em lipídeos ( $32,4$  mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), e que para atingir ambos objetivos simultaneamente é necessário empregar  $159$  mg L<sup>-1</sup> de nitrato,  $49$  mg L<sup>-1</sup> de fosfatos e  $0,31$  mg L<sup>-1</sup> de vitaminas, com as quais foram produzidas  $1,3+07$  céls mL<sup>-1</sup>, 20 % de teor lipídico e produtividade em lipídeos de  $25$  mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>;

- ✓ Com a validação das melhores condições do cultivo fototrófico de SCIB-01 com ASM1 otimizado, corroborou-se a reprodutibilidade do processo em sistemas de cultivos de 1 L;
- ✓ Na avaliação de diferentes meios de cultura no cultivo fototrófico, o BG11-N conferiu as maiores biomassa,  $P_X$ , TLT e  $P_{LT}$  (2,2 g L<sup>-1</sup>, 210 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, 27,8 % e 60,8 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente) e por isso foi selecionado como o melhor meio, dentre os avaliados;
- ✓ Baseando-se nos resultados do DCCR para a hidrólise enzimática da biomassa residual da indústria de celulose, determinaram-se as melhores condições dentre aquelas avaliadas: relação S:L 1:4, carga enzimática de 17,5 FPU g<sup>-1</sup> de sólido e 20 h de duração, as quais permitiram a obtenção de 80 g de glicose L<sup>-1</sup>;
- ✓ Por conseguinte, conclui-se que a biomassa residual do sistema de decantação da indústria de celulose constituiu uma excelente matéria-prima para a obtenção de glicose;
- ✓ Entre os diferentes tipos de cultivos, foi em heterotrofia com 10 g L<sup>-1</sup> de glicose comercial (G10) que SCIB-01 apresentou a máxima produção de biomassa (5,1 g L<sup>-1</sup>), atingindo altas  $P_X$  (1250 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e velocidade de crescimento ( $\mu$  1,42 d<sup>-1</sup>);
- ✓ Em cultivo heterotrófico utilizando glicose da biomassa residual foi alcançada apenas 0,5 g L<sup>-1</sup> de biomassa, porém em R10 obteve-se  $\mu$  similar ao obtido em fototrófico (0,46 e 0,45 d<sup>-1</sup>, respectivamente);
- ✓ De uma maneira geral, os cultivos heterotróficos (G10, G20, R10 e R20) proporcionaram mais biomassa quando se empregou menor concentração de glicose (10 g L<sup>-1</sup>), enquanto que o emprego de mais glicose (20 g L<sup>-1</sup>) conferiu maior teor de lipídeos;
- ✓ Todavia, foi em cultivo mixotrófico que o presente trabalho atingiu o máximo teor de lipídeos (34 %), resultando na máxima produtividade lipídica (138,1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), mostrando-se como o melhor tipo para se cultivar *Scenedesmus* sp;

- ✓ A estratégia de crescimento em fotobiorreatores de janela de 1.100 L mostrou-se extremamente eficaz no que concerne na obtenção de muita biomassa e lipídeos de *Scenedesmus* sp. em um curto período de tempo;
- ✓ Ao comparar a performance da microalga *Scenedesmus* sp. nos cultivos conduzidos em batelada simples, semicontínua e alimentada, a semicontínua mostrou-se como a melhor forma de condução, produzindo-se 1,5 Kg de biomassa seca e cerca de 250 g de lipídeos num volume de 2.050 L de cultura obtido após 14 dias de cultivo;
- ✓ Com a produção de biodiesel por transesterificação, hidroesterificação e saponificação/esterificação foram alcançadas eficiências de 99,27, 92,54 e 94,34 %, respectivamente. Em ambas, os ésteres metílicos palmitato (16:0) foram produzidos em maior percentagem (42,12, 49,59 e 45,07 %, respectivamente), seguido do oleato (18:1) (25,45, 22,73 e 25,25 %, respectivamente);
- ✓ O biodiesel produzido por transesterificação, hidroesterificação e saponificação/esterificação a partir de biomassa de SCIB-01 foram constituídos por altos teores de SAFA e MUFA (86,64, 88,08 e 90,43 %, respectivamente), apresentando-se como um biocombustível com excelente perfil de FAME;
- ✓ Baseando-se nos resultados do presente trabalho, é possível concluir que a microalga *Scenedesmus* sp. constitui uma matéria-prima oleaginosa bastante promissora para a produção de biodiesel.

A fim de se dar continuidade à linha de pesquisa realizada neste trabalho, são feitas as seguintes sugestões:

- ✓ Otimizar as concentrações de nutrientes do meio BG11-N para maximizar a produtividade em lipídeos de *Scenedesmus* sp. em cultivo mixotrófico;
- ✓ Otimizar outras variáveis da hidrólise enzimática da biomassa residual da indústria de celulose, como temperatura, pH e agitação, com o propósito de

se determinar as condições que confirmam as máximas concentração de glicose e eficiência de hidrólise;

- ✓ Estudar o emprego do hidrolisado da biomassa residual no cultivo mixotrófico de *Scenedesmus* sp. visando sua assimilação para o acúmulo de lipídeos;
- ✓ Estudar o emprego de outras fontes residuais de carbono orgânico no cultivo fototrófico, a fim de selecionar aquela com melhor custo benefício para a produção de biodiesel;
- ✓ Estudar o emprego de nutrientes provenientes de águas residuais e da biomassa algácea residual da produção de biodiesel a fim de se reduzir o custo total do cultivo;
- ✓ Avaliar as melhores condições de cultivo nos fotobiorreatores de 1.100 L, analisando o resultado do escalonamento do mesmo;
- ✓ Produzir um volume de biodiesel necessário para a sua total caracterização segundo as normas nacionais e internacionais;
- ✓ Realizar uma análise financeira da produção de biodiesel a partir da biomassa de *Scenedesmus* sp. cultivada sob as melhores condições.

## CAPÍTULO 7

### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. (2014). Disponível em [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). Acesso em Agosto de 2014.

AGUIAR, R.S.; SILVEIRA, M.H.L.; PITARELO, A.P.; CORAZZA, M.L.; RAMOS, L.P. (2013). Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 147, p. 416-423.

AHMAD, A.L.; YASIN, N.H.M; DEREK, C.J.C.; LIM, J.K. (2011). Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 584–593.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2010). *Biologia molecular da célula*. Ed. Artmed, Porto Alegre, RS, 5ª ed. 1396 p.

ALLEN, M.M. & STANIER, R.Y. (1968). Growth and division of some unicellular blue-green algae on plates. *Journal Gen. Microbiology*, v. 51, p. 1999-2002.

AMARO, H.M.; GUEDES, A.C.; MALCATA, F.X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, v. 88, p. 3402–3410.

ANDERSEN, R. A. (2005). Algal culturing techniques. Ed. Elsevier Academic Press, USA, 578 p.

ANDRULEVICIUTE, V.; MAKAREVICIENE, V.; SKORUPSKAITE, V; GUMBYTE, M. (2014). Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloopsis* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. *Journal Applied Phycology*, v. 26, p. 83-90.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2014). Resolução ANP nº 14 de 11/05/2012, D.O.U. de 18.05.2012. Disponível em [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). Acesso em Agosto de 2014.

ARACRUZ. (2010). Produção de celulose. Disponível em [www.aracruz.com.br](http://www.aracruz.com.br). Acesso em junho de 2010.

ARANTES, V. & SADDLER, J.N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, n. 4.

ARAVANTINOU, A. F.; THEODORAKOPOULOS, M. A.; MANARIOTIS, I. D. (2013). Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production. *Bioresource Technology*, v. 147, p. 130-134.

ARCEO, A.A. (2012). Produção de biodiesel mediante o processo de hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata*. Tese de doutorado, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

AUBRIOT, L.; BONILLA, S.; FALKNER, G. (2011). Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations. *Microbiology Ecology*, 1-16.

AZMA, M.; MOHAMED, M.S.; MOHAMAD, R.; RAHIM, R.A.; ARIFF, A.B. (2011). Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface. *Biochemical Engineering Journal*, v. 53, p. 187-195.

BARBOSA, M.J.; HOOGAKKER, J.; WIFFELS, R.H. (2003). Optimization of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using A-stat technique. *Biomolecular Engineering*, v. 20, p. 115-123.

BAKY, H.H.A.; BATORY, G.S.; BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. (2012). Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by optimizing CO<sub>2</sub> and Fe<sup>3+</sup> levels for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 119, p. 429-432.

BARCLAY, W. R.; MEAGER, K. M.; ABRIL, J. R. (1994). Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, v. 6, p. 123.

BASU, S.; ROY, A.S.; MOHANTY, K.; GHOSHAL, A.K. (2014). CO<sub>2</sub> Biofixation and carbonic anhydrase activity in *Scenedesmus obliquus* SA1 cultivated in large scale open system. *Bioresource Technology*, v. 164, p. 323-330.

BEN-AMOTZ, A. (1995). New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for beta-carotene production. *Journal of Applied Phycology*, v. 7, p. 65–68.

BENEMAN, J. R. (1990). Microalgae products and production: an overview. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 31, n. 5, p. 247-256.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; MAXIMENKO, V.; BURA, R.; MARCOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEY, O.; SOLOVIERA, I.; SADDLER, J.N. (2006). Evaluation of cellulase preparation for hydrolysis of hardwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129-132, p. 528-545.

BLERSCH, D.M.; KANGAS, P.C.; MULBRY, W.W. (2013). Turbulance and nutrient interactions that control benthic algal production in an engineered cultivation raceway. *Algal Research*, v. 2, p. 107-112.

BLIGH E.G. & DYER W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, v. 37, p. 911-917.

BOER, K.; MOHEIMANI, N.R.; BOROWITZKA, M.A.; BAHRI, P.A. (2012). Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption. *Journal Applied Phycology*, v. 24, p. 1681-1698.

BOLD, H.C. (1949). The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov *Bull. Torrey Bot. Club.*, v. 76, p. 101-108.

BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel. (2014) Disponível em [www.bracelpa.com.br](http://www.bracelpa.com.br). Acesso em Setembro de 2014.

BRENNAN, L. & OWENDE, P. (2010). Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557–77.

CARPITA, N.G. & GILBEAULT, D.M. (1993). Structural models os primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Physiology*, v. 3, p. 1-3.

CHAICHALERM, S.; POKETHITIYOOK, P.; YUAN, W.; MEETAM, M.; SRITONG, K.; PUGKAEW, W.; KUNGVANSAICHOL. K.; KRUATRACHEU, M.; DAMRONGPHOL, P. (2012). Culture of microalgal strain isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Applied Energy*, v. 89, p. 296-302.

CHELLAMBOLI, C. & PERUMALSAMY, M. (2014). Application of response surface methodology for optimization of growth and lipids in *Scenedemsus abundans* using bacth culture system. *Royal Society of Chemistry Advances*, v. 4, p. 22129-22140.

CHEN, L.; LIU, T.; ZHANG, W.; CHEN, X.; WANG, J. (2012). Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 208-214.

CHENG, Y.; ZHOU, W.G.; GAO, C.F.; LAN, K.; GAO, Y.; WU, Q.Y. (2009). Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by

heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*, v. 84, p. 777-781.

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

CONVERTI, A.; CASAZZA, A.A.; ORTIZ, E.Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, v. 48, p. 1146-1151.

COLLA, L.M.; BERTOLINI, T.E.; COSTA, J.A. (2004). Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift fur Naturforschung, Tübingen*, v. 59, p. 55-59.

DARZINS, A.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARD, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, v. 54, p. 621-639.

DEMIRBAS A. & DEMIRBAS M. F. (2010). Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 163-170.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. (2006). Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, p. 1959-1967.

D'OCA, M.G.M.; VIÊGAS, C.V.; LEMÕES, J.S.; MIYASAKI, E.K.; MORÓN-VILLARREYES, J.A.; PRIMEL, E.G.; ABREU, P.C. (2011). Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 1533-1538.

DONG, S.; HUANG, Y.; ZHANG, R.; WANG, S.; LIU, Y. (2014). Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 7p.

EGAN, P.F. & TRAINOR, F.R. (1989). The role of unicells in the polymorphic *Scenedesmus armatus* (Chlorophyceae). *Journal Phycology*, v. 25, p. 65-70.

ERIKSEN, N.T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 1525 – 1536.

FACCIOTTI, M.C.R. & SCHMIDELL, W. (1995). The new concept of minimum cell viability and its consequences on bioprocess design and operation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 12, n. 1, p. 22-31.

FAPRI – Food and Agricultural Policy Research Institute (2014). US and world agricultural outlook. Disponível em [www.fapri.iastate.edu](http://www.fapri.iastate.edu). Acesso em agosto de 2014.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. (2011)<sup>a</sup>. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 101-105.

FENG, P.; DENG, Z.; HU, Z.; FAN, L. (2011)<sup>b</sup>. Lipid accumulation and growth of

*Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 10577 – 10584.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABINO, A. (2005). Estabilidade oxidativa dos ésteres de ácido graxo do biodiesel de óleo de soja. *Ciência Agrícola*, v. 62, p. 291-295.

FERRÉS, J.D. (2012). Biodiesel – desafios e oportunidades. In *Combustíveis no Brasil, Desafios e Perspectivas*, Ed. Synergia, Rio de Janeiro, 298 p.

GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; YU, Q.; YUAN, Z.; LIU, Y. (2013). Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 396-401.

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

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, J. R.; HAMMER, V. T.; KIM, W. K. (1964). Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh. Internat. Verein. Theor. Angew. Limnology*, v. 15, p. 796-804.

GHOSE, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268.

GREENWELL, H.C.; LAURENS, L.M.L.; SHIELDS, R.J.; LOVITT, R.W.; FLYNN, K.J. (2010) Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 7, p. 703–26.

HALIM, R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M.K.; WEBLEY, P.A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 178-185.

HALIM, R.; DANQUASH, M.K.; WEBLEY, P.A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 709-732.

HARWOOD, J.L. & GUSCHINA, I.A. (2009). Review: The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochemistry*, v. 91, p. 679 -684.

HARDWOOD, J.L. & JONES, A.L. (1989). Lipid metabolism in algae. *Advances Botanic Resource*, v. 16, p. 1–53.

HELBUST, J.A. & LEWIN, J. (1977). Heterotrophic nutrition. In: *Werne, D. (Ed.), The Biology of the Diatoms*. University of California Press, Berkeley, pp. 169– 197.

HO, S.H.; CHEN, C.Y.; CHANG, J.S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, v. 113, p. 244–252.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERG, M.; DARZINS, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, v. 54, p. 621–639.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D. ZHANG, X.; CHEN, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*. v. 87, n. 1, p. 38-46.

HUERLIMANN, R.; NYS, R.; HEIMANN, K. (2010). Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 107, p. 245-257.

IDF (International Dairy Federation). (1986). Cheese and processed cheese product. Determination of fat content-gravimetric method (Reference method). Standard FIL-IDF 5B:1986. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

ISHIDA, Y.; HIRAGUSHI, N.; KITAGUCHI, H.; MITSUTANI, A.; NAGAI, S.; YOSHIMURA, M. (2000). A highly CO<sub>2</sub>-tolerant diatom *Thalassiosira weissflogii* H1 enriched from coastal sea and its fatty acid composition. *Fish. Science*, v. 66, p. 655-659.

JI, F.; LIU, Y.; HAO, R.; LI, G.; ZHOU, Y.; DONG, R. (2014). Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresource Technology*, v. 161, p. 200-207.

KHANG, L.; WANG, W.; LEE, Y. (2010). Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 53-66.

KING, L.M.; LIANG, X.; RUSCH, K.A. (2002). Nutritional properties of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* fed the freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 33, n. 4, p. 478-488.

LAM, M.K. & LEE, K.T. (2012). Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 673-690.

LEE, R.E. (2008). Phycology. Ed. Cambridge University Press, New York, US, 4<sup>th</sup> edition, 547 p.

LEE, J.Y.; YOO, C.; JUN, S.Y.; AHN, C.Y.; OH, H.M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 75-77.

LIANG, Y. (2013). Production liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. *Applied Energy*, v. 104, p. 860–868.

LI, Z.; YUAN, H.; YANG, J.; LI, B. (2011). Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 9128-9134.

LIN, Q. & LIN, J. (2011). Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 1615 – 1621.

- LIU, J.; JUNCHAO, H.; KING, W.F.; YUE, J.; YUJUAN, Z.; ZHENG, S.; FENG, C. (2010). Production potential of *Chlorella zofingienesis* as a feedstock for biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8658-8663.
- LOURENÇO, S. O. (2006). Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. Ed. Roma, 1ª ed., São Paulo, 606 p.
- MA, F. & HANNA, M.A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 1-15.
- MAKULLA, A. (2000). Fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus*: correlation to dilution rates. *Limnology*, v. 30, p. 162-168.
- MANDAL, S. & MALLICK, N. (2009). Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiol Biotechnology*, v. 84, p. 281-91.
- MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). Departamento da cana-de-açúcar e agroenergia. Produção brasileira de etanol. Disponível em [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em Agosto de 2014.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.14, p. 217–232
- McCANN, M.C. & ROBERTS, K. (1991). Architecture of the primary cell wall. In: LOYD, C.W., (ed.). *The Cytoskeleta / Bass of plant Growth and Form*. London: Academic Press, p. 109-129.
- MEHER, L.C.; SAGAR, V.; NAIK, S.N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by Transesterification - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 10, n. 3, p. 248-268.
- MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428.
- MOLINA, G. E.; BELARBI E-H.; ACIÉN, F. F. G.; ROBLES, M. A.; CHISTI, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 491-515.
- MONTGOMERY, D. & CALADO, V. (2003). Planejamento de experimentos usando o Statistic. Editorial E-papers Serviços editoriais, Rio de Janeiro, Brasil.
- MURADYAN, E. A.; KLYACHKO-GURVICH, G. L.; TSOGLIN, L. N.; SERGEYENKO, T. V.; PRONINA, N. A. (2004). Changes in lipid metabolism during adaptation of the *Dunaliella salina* photosynthetic apparatus to high CO<sub>2</sub> concentration. *Russian Journal Plant Physiology*, v. 51, p. 53-62.
- NARENDRA, K. S. (2010). Nutrient removal, growth response and lipid enrichment by a phytoplankton community. *Journal Algal Biomass Utilization*, v. 3, p. 1-28.

NOGUEIRA, N.S. (2010). Análise Delphi e SWOT das matérias-primas de produção de Biodiesel: soja, mamona e microalga. Dissertação de mestrado, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

NOWAK, I. & ZIOLEK, M. (2005). Niobium compounds: preparation, characterization, and application in heterogeneous catalysis. *Chemical Reviews*, v. 99, n. 12, p. 3603-3624.

OCTAVIO, P.G.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Resource*, v. 45, p. 11– 36.

OLAIZOLA, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, v.20, p. 459-466.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D.J.; SADDLER, N.J. (2005). Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 1069-1079.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69-80.

PEDRAZZI, C. (2005). Qualidade de chapas de partículas de madeira aglomerada fabricadas com resíduos de uma indústria de celulose. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. (2008). Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital, UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p.

PÉREZ, H.E.B. (2007). Biodiesel de Microalgas. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, 1-19.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.; ANDRADE, J.B. (2005). Biodiesel: An Overview. *Journal Brazilian Chemistry Society*, v. 16, p. 1313-1330.

PIORRECK, M.; BAASCH, K. H.; POHL, P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, v. 23, n. 2 ,p. 207-216.

PRAVEENKUMAR, R.; SHAMEERA, K.; MAHALAKSHMI, G.; ARBARSHA, M.A.; THAJUDDIN, N. (2012). Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: evaluation for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p. 60-66.

QUIANG, Y.; ZHUANG, X.; WANG, Q.; QI, W.; TAN, X.; YUAN, Z. (2012). Hydrolysis of sweet sorghum bagasse and eucalyptus wood chips with liquid hot water. *Bioresource Technology*, v. 116, p. 220-225.

- QIU, W. & CHENG, H. (2012). Enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw after combined steam explosion and laccase pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 118, p. 8-12.
- RADMANN, M.E. & COSTA, J.A.U. (2008). Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1609-1612.
- RAWAT, R.; RANJITH KUMAR, T.; MUTANDA, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, v. 103, p. 444–467.
- REYNOLDS C. S. (2006). Ecology of Phytoplankton - Ecology, Biodiversity and Conservation. Cambridge.
- RICHMOND, A.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; KOPEL, R. (2003). A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoor. *Journal of Applied Phycology*, v. 5, p. 327 – 332.
- RÖSCH, C.; SKARKA, J.; WEGERER, N. (2012). Materials flow modeling of nutrient recycling in biodiesel production from microalgae. *Bioresource Technology*, v. 107, p. 191–199.
- ROSENBERG J.; OYLER G.; WILKINSON L.; BETENBAUGH M. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Biotechnology*, v. 19, p. 430-436.
- ROUND, F.E. (1973). Biology of the algae. Publishers Ltd, London, 263 p.
- RUANGSOMBOOM, S. (2012). Effect of light, nutriente, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga *Botryococcus braunii* KMITL2. *Bioresource Technology*, v. 109, p. 261-265.
- SÁNCHEZ, E.; OJEDA, K.; EL-HALWAGI, M.; KAFAROV, V. (2011). Biodiesel from microalgae oil production in two sequential esterification/transesterification reactors: Pichia analysis of heat integration. *Chemical Engineering Journal*, v. 171-177, p. 211-216.
- SANTOS, D.S.; CAMELO, A.C.; RODRIGUES, K.C.; CARLOS, L.C.; PEREIRA Jr., N. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 93-105.
- SANTOS, T.W.; VAIRO, M.L.R.; HISS, H.; BORZANI, W. (1992). Semicontinuous alcoholic fermentation of sugar cane blackstrap molasses by preces yeast. *Biotechnology Letters*, v. 14, p. 971-981.
- SCHENK, P. M; THOMAS-HALL, S. S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGNUG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O; HANKAMER, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Resource*, v. 1, p. 20–43.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (2001). *Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. Ed. Blucher, São Paulo, SP, 1ª edição, v. 2, 559 p.

SCRAGG, A.H.; ILLMAN, A.M.; CARDEN, A.; SHALES, S.W. (2002). Growth of microalgae with increased caloric values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, v. 23, p. 67 -73.

SFORZA, E.; CIPRIANI, R.; MOROSINOTTO, T.; BERTUCCO, A.; GIACOMETTI, G.M. (2012). Excess CO<sub>2</sub> supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 523–529.

SHENG, Z.; GAO, J.; JIN, Z.; DAI, H.; ZHENG, L.; WANG, B. (2014). Effect of steam explosion on degumming efficiency and physicochemical characteristics of banana fiber. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 131, p. 9.

SIEBURTH, J.M.C.N.; SMETACEK, V.; LENZ J. (1978). Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*, v. 23, p. 1256–63.

SILVA, N.L.C.; BETANCUR, G.J.V.; VASQUEZ, M.P.; GOMES, E.B.; PEREIRA Jr. (2011). Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation, and remaining solid fraction fermentation by SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.163, p. 928-936.

SING, S.F.; ISDEPSKY, A.; BOROWITZKA, M.; MOHEIMANI, N. (2010). Production of biofuels from microalgae. Mitigation and adaptation strategies for global change, p. 1-26.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E. (2006). Review: commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, n. 2, p. 87–96.

STUART, A. S.; DAVEY M. P; DENNIS, J.S.; HORST, IM. HOWE, C.J.; LEA-SMITH, D.J.; SMITH, A.G. (2011). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 277-286.

SUALI, E. & SARBATLY, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 4316– 4342. REYNOLDS C. S. (2006). *Ecology of phytoplankton: ecology, biodiversity and conservation*. Ed. Cambridge.

SUN, Y. & CHENG, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, n. 1, p. 1-11.

TAMARYS, H.A.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. (2011). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 2245–2253.

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. (2011). CO<sub>2</sub> Fixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chorella pyrenoidosa* in response to

different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3071-3076.

TRAINOR, F.R. (1992). Cyclomorphosis in *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta): an ordered sequence of ecomorph development. *Journal Phycology*, v. 28, p. 552-558.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA Jr., N. (2007). Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137-140.

VELJKOVIC, V.B. & LAKICEVIC, S.H. (2006). Biodiesel production from tobacco seed oil with a high content of free fatty acids. *Fuel*, p. 1-5.

VIVEKANAND, V.; OLSEN, E.F.; EIJSINK, V.G.H.; HORN, S.J. (2013) Effect of different steam explosion conditions on methane potential and enzymatic saccharification of birch. *Bioresource Technology*, v. 127, p. 343-349.

WU, A. & LEE, Y.Y. (1997). Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. *Biotechnology Letters*, v. 19, p. 977-979.

WU, L.F.; CHEN, P.C.; HUANG, A.P.; LEE, C.M. (2012). The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 113, p. 14–18.

XIONG, W.; LI, X.; XIANG, J.; WU, Q. (2008). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbiodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 78, p. 29–36.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YU-PING, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3098–3102.

XIN, L.; YING, H.H.; KE, G.; XUE, S.Y. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5494–5500.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal Biotechnology*, v. 126, p. 499–507.

YAMANE, T. & SHIMIZU, S. (1984). Fed-batch techniques in microbial processes. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 30, p.148-1984.

YAO, B.; XI, B. D.; HU, C. M.; HUO, S. L.; SU, J.; LIU, H. L. (2011). A model and experimental study of phosphate uptake kinetics in algae: considering surface adsorption and P-stress. *Journal of Environmental Sciences*, v. 23, n. 2, p. 189-198.

YEH, K.L. & CHANG, J.S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, v. 105, p. 120-127.

- YOO, C.; JUN, S.Y.; LEE, J.Y.; AHN, C.Y.; OH, H.M. (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 71-74.
- ZEMKE, P. E.; WOOD, B. D.; DYE, D. J. (2010). Considerations for the maximum production rates of triacylglycerol from microalgae. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, p. 145-151.
- ZHANG, J.; CHEN, S.; YANG, R.; YAN, Y. (2010). Biodiesel production from vegetable oil using heterogenous acid and alkali catalyst. *Fuel*, v. 89, n. 10, p. 2939-2944.
- ZHANG, M.; SHUKLA, P.; AYYACHAMY, M; PERMAUL, K; SINGH, S. (2009). Improved bioethanol production through Simultaneous Saccharification and Fermentation of lignocellulosic agricultural wastes by *Kluyveromyces marxianus* 6556. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 1041-1046.
- ZHAO, G.; YU, J.; JIANG, F.; ZHANG, X.; TAN, T. (2012). The effect of different trophic modes on lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda*. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 466-471.
- ZHENG, Y.; CHI, Z.; LUCKER, B.; CHEN, S. (2012). Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. *Bioresource Technology*, v. 103, p. 484-4889.