

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR
CLARIFICADA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

NATHASKIA SILVA PEREIRA NUNES

Dourados/MS – 2021

**CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR
CLARIFICADA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

NATHASKIA SILVA PEREIRA NUNES

Tese de doutorado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Dr. Gustavo Graciano Fonseca
Coorientador: Dr. Marcelo Fossa da Paz

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N972c Nunes, Nathaskia Silva Pereira
CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR
CLARIFICADA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS [recurso eletrônico] / Nathaskia
Silva Pereira Nunes. -- 2021.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Gustavo Graciano Fonseca.

Coorientador: Marcelo Fossa da Paz.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande
Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. biocombustível. 2. resíduo agroindustrial. 3. microalgas. 4. transesterificação etílica. 5.
casting. I. Fonseca, Gustavo Graciano. II. Paz, Marcelo Fossa Da. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADA, para a TESE intitulada: Cultivo de *Chlorella sorokiniana* em vinhaça de cana-de-açúcar clarificada e suas aplicações biotecnológicas, de autoria de Nathaskia Silva Pereira Nunes, apresentada ao Programa de Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca - (Participação Remota Síncrona)
Presidente da banca examinadora



Prof.^a Dr.^a Carmem Cícera Maria da Silva - (Participação Remota Síncrona)
Membro Examinador (UFES)



Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho - (Participação Remota Síncrona)
Membro Examinador (UFSC)



Prof.^a Dr.^a Silvia Maria Martelli - (Participação Remota Síncrona)
Membro Examinador (UFGD)



Prof.^a Dr.^a Mariana Lara Menegazzo - (Participação Remota Síncrona)
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 29 de Abril de 2021.

AGRADECIMENTOS

Alcançada mais uma vitória, meu coração se enche de alegria! Não apenas por mais um triunfo, e sim por saber que Deus esteve comigo em todos os momentos. Com lágrimas nos olhos escrevo: obrigada, meu Deus!

Aos meus pais Aldo Pereira e Eures da Silva Pereira que desde sempre abdicaram de si, por mim. Me incentivaram e apoiaram a seguir esta longa jornada de conhecimento e a minha irmã Nicolle Silva Pereira, que me deu força e sempre esteve ao meu lado, minha gratidão.

Ao meu esposo Ed William Nunes Filho não tenho palavras que possam demonstrar minha gratidão por tudo o que fez por mim durante esses anos, muito obrigada, por entender as ausências, ser meu apoio, por não deixar eu perder o foco, por ser amigo, esposo e pai maravilhoso, meu braço direito e esquerdo na execução de tantos experimentos.

Ao meu bebezão, Micaela, por me mostrar o quanto sou forte e capaz. Desde a barriga me acompanhando nas idas e vindas do campo universitário. Conseguimos, obrigada por me tornar quem sou hoje!

Não poderia deixar de agradecer a toda a equipe do Centro de Educação Infantil Maria Alice Silvestre na UFGD, que durante esses quatro anos cuidaram tão bem da minha pequena, contribuindo para o seu desenvolvimento e tornando possível que eu me dedicasse à pesquisa. Assim como minha sogra Dona Gladis Maria Miranda de Almeida, que junto com todos citados anteriormente fizeram parte da rede de apoio dessa mãe pesquisadora.

A minha cunhada Dra. Glaucia Almeida Nunes, que me ajudou em tantas dúvidas de química, que não foram poucas...rsrs, obrigada também por me auxiliar na escrita e formatação da tese e pelos bons papos.

Aos amigos que me emprestaram seus ombros nos momentos difíceis e me deram força, e que também se alegraram comigo em tantos bons momentos, agradeço e celebro com vocês mais essa conquista! A amiga que o doutorado me deu, Mônica Ansilago, obrigada pela parceria, foram muitas caronas, almoços de marmitta, cochilos na mesa, séries, risos, choros, conversas e conselhos, muitas tentativas e erros na experimentação, obrigada minha desorientadora rsrs!

Ao Dr. Gustavo Graciano Fonseca, Dr. Marcelo Fossa da Paz e Dr. Emerson Machado de Carvalho, professores que estiveram envolvidos diretamente no desenvolvimento desta tese, meus orientadores durante esses anos de pesquisa, meu muito obrigada, por acreditarem e confiarem em mim, pelas correções, conversas, oportunidades e por serem pesquisadores excepcionais.

Aos alunos de iniciação científica Igor, Jackson, Gleice e Viviane que estiveram envolvidos na execução dos experimentos e as técnicas do laboratório multidisciplinar da UFGD, que fizeram além do que a função lhes cabia, muito obrigada. A Dra. Alessandra Oliveira da Silva, na produção dos biofilmes e a Dra. Mariana Lara Menegazzo na produção do biodiesel, a Dra. Rosenira Serpa da Cruz e ao Dr. José Faustino Filho, obrigada por realizarem as análises da composição de ácidos graxos do biodiesel, teria sido muito difícil concluir este trabalho sem todos vocês.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pela bolsa concedida. À Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD e a todos os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambientais pelos ensinamentos e apoio.

À banca examinadora da qualificação e defesa pelas contribuições de melhoria desta tese, muito obrigada, e a todos que de alguma forma contribuíram para que fosse possível a conclusão desse trabalho.

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT.....	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGMI.....	ácidos graxos monoinsaturados
AGPI.....	ácidos graxos poli-insaturados
Al ₂ (SO ₄).....	sulfato de alumínio
ANOVA.....	análise de variância
ANP.....	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOAC.....	<i>Official Methods of Analysis</i>
ASG.....	ácidos graxos saturados
ASTM.....	“ <i>American Society of Testing and Materials</i> ”
b*.....	cromaticidade azul-amarela
BOD.....	estufa incubadora com demanda bioquímica de oxigênio
BS.....	biomassa seca
C 14:0.....	ácido mirístico
C 16:0.....	ácido palmítico
C 16:1.....	ácido palmitoléico
C 17:0.....	ácido heptadecenóico
C 18:0.....	ácido esteárico
C 18:1n9c.....	ácido oleico
C 18:3n3.....	ácido linolênico
C 20:4n6.....	ácido araquidônico
C 22:0.....	ácido behênico
C 22:6n3.....	ácido docosa-hexaenóico
C 24:0.....	ácido lignocérico
C 24:1.....	ácido nervônico
C.....	continuidade
C18:2n6c.....	ácido linoleico
Ca (OH) ₂	hidróxido de cálcio
CEN.....	“ <i>Comité Européen de Normalisation</i> ”
CETESB.....	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CO ₂	dióxido de carbono
CONAMA.....	Conselho Nacional do Meio Ambiente
D.....	densidade (g cm ⁻³)
DC.....	densidade celular
DO.....	densidade óptica
EM.....	União Europeia
EPA.....	Environmental Protection Agency
FeCl ₃	cloreto de ferro III
FAME.....	éster metílico de ácido graxo
FSCL.....	fator saturado de cadeia longa
GE.....	gelatina
GI.....	grau de insaturação
GL.....	glicerol
H.....	homogeneidade
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
II.....	índice de iodo (g I ₂ /100g)
IS.....	índice de saponificação (mg g ⁻¹)

ISO.....	“International Organization for Standardization”
L*.....	luminosidade
M.....	microalga
M.....	manuseabilidade
NC.....	número de cetano
NI.....	não identificado
nm.....	nanômetros
NPK.....	nitrogênio, fósforo e potássio
PC.....	poder calorífico (MJ kg ⁻¹)
PEFF.....	ponto de entupimento do filtro à frio (°C)
PN.....	ponto de nuvem (°C)
RML.....	rotação de mistura lenta
RMR.....	rotação de mistura rápida
TAG.....	triacilglicerol
V.....	viscosidade (mm ² s ⁻¹)
x.....	deficiente
xx.....	bom
xxx.....	ótimo
Y.....	opacidade
ΔH.....	entalpia de fusão (J g ⁻¹)
ΔP.....	diferença de pressão parcial (kPa)
ΔW.....	ganho de massa pela célula (g)

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1 Comparação do rendimento FAME gerado na transesterificação convencional e na transesterificação direta.	29
Tabela 2. 2 Propriedades do biodiesel de microalgas.....	34
Tabela 2. 3 Influência da cepa, do método de hidrólise e o tipo de fermentação na produtividade final de etanol obtida.....	39
Tabela 2. 4 Produtividade de biohidrogênio por diferentes espécies de microalgas.....	43
Tabela 3. 1 Produtos utilizados no processo de clarificação da vinhaça de cana-de-açúcar.	67
Tabela 4. 1 Curva programada para digestão das amostras.	82
Tabela 4. 2 Composição e quantificação dos micro e macronutrientes da vinhaça, NPK e os meios comerciais CHU12, BBM e Sueoka (mg L ⁻¹).	85
Tabela 4. 3 Densidade celular da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> cultivada em vinhaça durante 35 dias.	86
Tabela 4. 4 Variação dos valores de potencial hidrogeniônico do meio de cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i> ao longo dos 35 dias de cultivo.....	90
Tabela 6. 1 Composição de ácidos graxos obtidos a partir da transesterificação etílica in situ da biomassa seca da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	113
Tabela 6. 2 Propriedades dos ésteres etílicos obtidos a partir da transesterificação etílica in situ da biomassa seca da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	116
Tabela 7. 1 Variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário para o desenvolvimento dos filmes de <i>Chlorella sorokiniana</i> . (g 100 mL ⁻¹ solução).	125
Tabela 7. 2 Matriz do planejamento fatorial, com os valores codificados e reais para o desenvolvimento dos filmes de <i>Chlorella sorokiniana</i>	126
Tabela 7. 3 Resultados da avaliação subjetiva dos filmes de <i>Chlorella sorokiniana</i> . .	131
Tabela 7. 4 Parâmetros de cor e opacidade de filmes obtidos em função da concentração de <i>Chlorella sorokiniana</i> , gelatina e glicerol.....	132
Tabela 7. 5 Valores obtidos pelos filmes de <i>Chlorella sorokiniana</i> , em relação as variáveis dependentes analisadas.	134
Tabela 7. 6 Valores obtidos pelos filmes de <i>Chlorella sorokiniana</i> , em relação as variáveis dependentes analisadas.	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1 Produção bicomcombustíveis por meio de diferentes fontes de recursos.	24
Figura 2. 2 Esquema de biocombustíveis produzidos a partir de microalgas.....	25
Figura 2.3. Fluxograma dos métodos de produção de biodiesel.....	28
Figura 2.4. Fluxograma das variáveis do processo produtivo do bioetanol.	35
Figura 2.5. Metodologias para a produção de biohidrogênio por meio de microrganismos incluindo processos bioquímicos e processos termoquímicos de produção.	41
Figura 2.6. Esquematização das reações químicas envolvidas na produção de biohidrogênio a partir da presença e a da ausência de energia luminosa.	42
Figura 3. 1 Esquema do processo de clarificação com os compostos comerciais, químicos e alternativos.	68
Figura 3.2 Percentual de redução de cor e turbidez da vinhaça após processo utilizando A) tanfloc MT; B) hidróxido de cálcio; C) vinhaça diluída; D) vinhaça diluída+NPK; E) <i>Moringa oleifera</i> + filtro de vidro e F) <i>Moringa oleifera</i> + carvão ativado+ filtro de vidro.	70
Figura 3.3 Percentual de redução de cor e turbidez da vinhaça após processo utilizando A) sulfato de alumínio; B) cloreto de ferro III; C) Praestol Solenis 2530; D) carvão ativado; E) <i>Moringa oleifera</i> + papel filtro e F) <i>Moringa oleifera</i> + carvão ativado + papel filtro.	73
Figura 3.4 Valores médios do potencial hidrogeniônico (pH) da vinhaça após processo de clarificação com cada produto e concentração avaliada.	75
Figura 4. 1 Delineamento determinando os tratamentos/ meios de cultivo para a microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> em vinhaça.....	84
Figura 5.1 Padrão de absorção de luz para as diluições com <i>Chlorella sorokiniana</i> rastreada entre 200 e 800 nm.	99
Figura 5.2 Correlação entre as variáveis. A) densidade óptica (absorbância 686nm) x densidade celular (nº células x 10 ⁵ m L-1); B) densidade celular x densidade óptica; C) biomassa seca (g. L-1) x densidade celular; D) densidade celular x biomassa seca; E) densidade óptica x biomassa seca; F) biomassa seca x densidade óptica.....	101
Figura 6. 1 Etapas da produção do biodiesel. A) biomassa de microalgas em tubo de ensaio; B) suspensões submetidas ao ultrassom; C) amostras em aquecimento sob temperaturas de 70 ° C em dry block; D) amostras sendo centrifugadas para acelerar a separação de fases; E) separação de fases; F) filtração da amostra e G) armazenamento das amostras em vials.....	110
Figura 6. 2 Fluxograma metodológico da transesterificação <i>in situ</i> etílica a partir da biomassa da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	111
Figura 7. 1 A) Gelatina hidratada por 1h; B) Glicerina; C) Microalga; D) Gelatina+ glicerina+ microalga; E) Solução em banho-quente 80°C; F) Solução homogeneizada; G) Solução nas placas; H) Biofilmes após 48h; I) Biofilmes no dessecador por 24h; J) Biofilmes produzidos.....	126
Figura 7. 2 Ilustração das nove formulações de filmes a base de biomassa microalgal incorporados com gelatina e glicerol.....	131

Figura 7. 3 Resultado do teste de difusão em ágar dos filmes de *Chlorella sorokiniana*.
F4- microalga 1,5 g 100 mL⁻¹ gelatina 2,5 g 100 mL⁻¹ e glicerol 1,5 g 100 mL⁻¹ 1; F7-
microalga 0,5 g 100 mL⁻¹ gelatina 2,5 g 100 mL⁻¹ e glicerol 2,5 g 100 mL⁻¹ e F9-
microalga 1,0 g 100 mL⁻¹ gelatina 2,0 g 100 mL⁻¹ e glicerol 2,0 g 100 mL⁻¹.137

RESUMO

As microalgas representam uma das mais promissoras fontes de novos produtos e aplicações, possuindo vantagens consideráveis sobre matérias-primas tradicionais. Isso reforça a relevância de realizar estudos que avaliem meios de cultivo alternativos para produção de microalgas, pois com o aumento da produção de microalgas, aumenta-se também a prospecção de seus produtos para aplicações biotecnológicas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o desenvolvimento de *Chlorella sorokiniana* em meio alternativo à base de vinhaça de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) clarificada e a produção de biodiesel e filmes biopoliméricos a partir da biomassa microalgal. Para realizar o cultivo microalgal em vinhaça foi necessária a sua clarificação, para redução de cor e de turbidez. Como produto alternativo, a semente de *Moringa oleifera* + filtro de vidro foi eficiente na clarificação da vinhaça com maior percentual de redução de cor e turbidez obtido utilizando 30 g.L⁻¹ de semente, com 68, 92% e 78,78% de redução, respectivamente. Os valores ótimos de densidade foram verificados para microalgas cultivadas em vinhaça diluída e suplementada com fertilizante NPK. Também foi possível obter uma relação funcional por regressão linear, para as três técnicas de quantificação microalgal: densidade celular, densidade óptica e biomassa seca, tornando plausível quantificar as microalgas através de uma técnica e transformar tais valores através das equações geradas pela regressão linear. Quanto as aplicações da biomassa microalgal, os ésteres etílicos produzidos através da transesterificação etílica *in situ* da biomassa de *Chlorella sorokiniana* atenderam a maioria dos padrões de controle de qualidade. A produção de filmes pelo método de *casting* com a microalga *C. sorokiniana*, gelatina e glicerol, demonstrou excelentes características para embalagens de alimentos. Os filmes demonstraram ser uma barreira, em todas as concentrações de biomassa microalgal avaliadas para o desenvolvimento dos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*.

Palavras-chave: biocombustível, resíduo agroindustrial, microalgas, transesterificação etílica; *casting*.

ABSTRACT

Microalgae represent one of the most promising sources of new products and applications, with considerable advantages over traditional raw materials. This reinforces the relevance of carrying out studies that evaluate alternative means of cultivation for the production of microalgae, since with the increase in the production of microalgae, the prospecting of their products for biotechnological applications also increases. Thus, the objective of the present work was to evaluate the development of *Chlorella sorokiniana* in an alternative medium based on clarified sugarcane vinasse (*Saccharum officinarum*) and the production of biodiesel and biopolymer films from microalgal biomass. In order to carry out microalgal cultivation in vinasse, clarification was necessary to reduce color and turbidity. As an alternative product, *Moringa oleifera* seed + glass filter was efficient in clarifying the vinasse with a higher percentage of color and turbidity reduction obtained using 30 gL⁻¹ of seed, with 68.92% and 78.78% reduction, respectively. The optimal density values were verified for microalgae grown in diluted vinasse and supplemented with NPK fertilizer. It was also possible to obtain a functional relationship by linear regression, for the three microalgal quantification techniques: cell density, optical density and dry biomass, making it plausible to quantify the microalgae through a technique and transform such values through the equations generated by linear regression. As for the applications of microalgal biomass, the ethyl esters produced through ethyl transesterification in situ of the *Chlorella sorokiniana* biomass met most quality control standards. The production of films by the casting method with microalgae *C. sorokiniana*, gelatin and glycerol, demonstrated excellent characteristics for food packaging. The films proved to be a barrier at all concentrations of microalgal biomass evaluated for the development of microorganisms *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*

Keywords: biofuel, agro-industrial residue, microalgae, ethyl transesterification; casting.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
CAPÍTULO 1.....	18
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.2 REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2.....	22
PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DA BIOMASSA DE MICROALGAS: UMA REVISÃO.....	22
2.1 INTRODUÇÃO	23
2.2. PRINCIPAIS BIOCOMBUSTÍVEIS PRODUZIDOS A PARTIR DE MICROALGAS.....	25
2.2.1. Biodiesel	25
2.2.1.2 Métodos de produção	27
2.2.1.3 Características relevantes.....	30
2.2.2 Bioetanol.....	33
2.2.2.1 Métodos de produção	35
2.2.2.2 Características relevantes	37
2.2.3 Biohidrogênio.....	38
2.2.3.1 Métodos de produção	40
2.2.3.2 Características relevantes	43
2.2.4 Outros biocombustíveis	44
2.2.4.1 Bio-óleo	44
2.2.4.2 Gás de combustão.....	44
2.2.4.3 Biometano.....	45
2.2.4.4 Bioeletricidade.....	45
2.2.4.5 Biocarvão	45
2.2.4.6 Biogás.....	46
2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	46
2.3.1 Metabolismo microalgal	46
2.3.2 Sistemas de cultivo microalgal	49
2.4 APLICAÇÃO COMERCIAL DESTAS TECNOLOGIAS.....	51

2.5 PERSPECTIVAS.....	52
2.6 REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO 3.....	63
CLARIFICAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR (<i>Saccharum officinarum</i>)	63
3.1 INTRODUÇÃO	64
3.2. OBJETIVO GERAL	67
3.2.1. Objetivos Específicos.....	67
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
3.3.1 Avaliação	67
3.3.2 Análise dos dados	69
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.5 REFERÊNCIAS	76
CAPÍTULO 4.....	80
CULTIVO DE <i>Chlorella sorokiniana</i> EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR (<i>Saccharum officinarum</i>) CLARIFICADA.....	80
4.1 INTRODUÇÃO	81
4.2 OBJETIVO GERAL	82
4.2.1 Objetivos Específicos.....	82
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
4.3.1 Digestão de amostras no micro-ondas para análises de micros e macronutrientes da vinhaça de cana-de-açúcar	82
4.3.2 Obtenção da biomassa microalgal	83
4.3.3 Cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i> em vinhaça de cana-de-açúcar	83
4.3.4 Avaliação e Análise dos dados	83
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4.6 REFERÊNCIAS.....	91
CAPÍTULO 5.....	95
ANÁLISE DA RELAÇÃO FUNCIONAL ENTRE AS VARIÁVEIS DE QUANTIFICAÇÃO CELULAR DA MICROALGA <i>Chlorella sorokiniana</i>	95
5.1 INTRODUÇÃO	96
5.2 OBJETIVO GERAL	97
5.2.1 Objetivos específicos	97
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
5.3.1 Quantificação em câmara de Neubauer	98

5.3.2	Quantificação em espectrofotometria	98
5.3.3	Quantificação da biomassa	98
5.3.4	Análise dos dados.....	98
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
5.5	REFERÊNCIAS.....	104
CAPÍTULO 6.....		106
6.1	INTRODUÇÃO	107
6.2	OBJETIVO GERAL.....	109
6.2.1	Objetivos específicos	109
6.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	109
6.3.1	Obtenção da biomassa microalgal	109
6.3.2	Transesterificação <i>in situ</i>	109
6.3.3	Derivatização	111
6.3.4	Análise cromatográfica.....	111
6.3.4.1	Equipamento	111
6.3.4.2	Preparo da amostra.....	112
6.3.5	Predição de propriedades do biodiesel.....	112
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112
6.4	REFERÊNCIAS.....	118
CAPÍTULO 7.....		122
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS A PARTIR DE BIOMASSA MICROALGAL		122
7.1	INTRODUÇÃO	123
7.2	OBJETIVO GERAL	124
7.2.1	Objetivos específicos	124
7.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	125
7.3.1	Obtenção da matéria-prima.....	125
7.3.2	Obtenção dos filmes biopoliméricos	125
7.3.3	Avaliação subjetiva dos filmes biopoliméricos	126
7.3.4	Caracterização dos filmes biopoliméricos	127
7.3.4.1	Cor e opacidade.....	127
7.3.4.2	Resistência à tração e alongação	127
7.3.4.3	Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	128
7.3.4.4	Espessura.....	128
7.3.4.5	Solubilidade em água	129

7.3.4.6 Solubilidade em ácido	129
7.3.4.7 Umidade.....	129
7.3.5 Atividade antimicrobiana dos filmes (teste de difusão em ágar)	130
7.3.6 Análise estatística	130
7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	130
7.4.1 Obtenção e avaliação subjetiva dos filmes biopoliméricos	130
7.4.2 Caracterização dos filmes biopoliméricos	132
7.4.3 Atividade antimicrobiana dos filmes	136
7.5 REFERÊNCIAS.....	138
CAPÍTULO 8.....	142
CONCLUSÃO GERAL	142

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas têm sido foco de inúmeras investigações biotecnológicas devido a sua importância econômica, nutricional e ecológica. Áreas como; medicina, matéria-prima animal, cosmética, e até mesmo a produção de biocombustíveis, têm sido as mais estudadas ultimamente (JUNIOR, 2020). Na indústria de alimentos elas estão sendo inseridas como aditivos alimentares, nas indústrias farmacêuticas como pigmentos ricos em vitaminas e antioxidantes, e em algumas indústrias com o objetivo de utilizá-las como energia renovável (KHAN et al, 2018).

Sob este aspecto, possuem vantagens consideráveis sobre as matérias-primas tradicionais, como: alta produtividade, geralmente de 10 a 100 vezes maior do que as culturas agrícolas tradicionais; captura de carbono altamente eficiente; elevado teor de lipídios ou amido, que podem ser utilizados para produção de biodiesel ou etanol, respectivamente; cultivo em água doce, água do mar, água salobra ou mesmo em águas residuais e produção sobre terras não agricultáveis (XU et al., 2011; CAZZANIGA et al., 2014).

Contudo existem algumas lacunas a serem preenchidas, como a necessidade da adequação metodológica das tecnologias de produção de biodiesel a partir da biomassa microalgal de forma sustentável, sem a utilização dos reagentes químicos convencionais. Outra oportunidade é o emprego das microalgas para a produção de filmes a partir de fontes renováveis, também chamados filmes biopoliméricos. Estes têm ganho aprovação para o armazenamento de alimentos, bebidas e medicamentos por causa de sua biodegradabilidade (MALATHI et al., 2014). Benefícios adicionais estão relacionados a sua utilização como matriz para a adição de aditivos e nutrientes.

Investir em estudos que avaliem meios de cultivo alternativos de baixo custo e de elevada eficiência para produção de microalgas, bem como sua aplicação para a produção de diferentes produtos biotecnológicos torna-se indispensável. Assim o objetivo do presente trabalho é avaliar o desenvolvimento de *Chlorella sorokiniana* em meio alternativo à base de vinhaça de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) clarificada e a produção de biodiesel e biofilmes biopoliméricos a partir de sua biomassa.

Para desenvolver a presente pesquisa, o estudo foi dividido em oito capítulos: 1) com uma introdução geral sobre os objetivos e principais resultados de cada capítulo; 2) uma revisão da literatura sobre a temática biocombustíveis a partir de microalgas; 3) um experimento de bancada sobre desenvolvimento de técnicas de clarificação da vinhaça;

4) um experimento de bancada sobre cultivo de microalgas em meio de cultivo com vinhaça clarificada; 5) um experimento para avaliar a relação funcional entre as variáveis de peso seco, densidade ótica e densidade celular da microalga; 6) um estudo experimental do desenvolvimento de metodologia para a produção de biodiesel a partir da biomassa microalgal; 7) um estudo experimental do desenvolvimento de metodologia para aplicação da biomassa microalgal em biofilmes para proteção de alimentos; e 8) as considerações finais da estrutura experimental adotada e seus principais resultados.

Assim, no capítulo dois foi realizada uma revisão dos biocombustíveis produzidos a partir de biomassa microalgal, destacando os métodos de produção, vantagens e desvantagens além de características relevantes de cada biocombustível. As microalgas são uma potencial biotecnologia sustentável na produção de biocombustíveis, necessitando apenas da adequação metodológica das tecnologias de produção para cada espécie, a fim de potencializar a geração do biocombustível que deseja obter (NUNES et al., 2020).

O capítulo três traz a avaliação da redução de cor e turbidez da vinhaça de cana-de-açúcar, submetida a processos de clarificação utilizando compostos comerciais, compostos químicos e floculantes alternativos naturais. A vinhaça foi também diluída em água destilada. Não houve um produto ou processo em específico com o melhor resultado de clarificação da vinhaça, mas vários. O que aumenta as perspectivas de tratamento para este resíduo, sendo possível o aumento do seu ciclo de vida, com a possibilidade de utilização da mesma para o cultivo de microalgas.

Avaliar o desenvolvimento de *Chlorella sorokiniana* em meio alternativo à base de vinhaça de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) clarificada foi o objetivo do quarto capítulo. *C. sorokiniana* apresentou baixa densidade em meio contendo vinhaça clarificada. Os valores ótimos de densidade foram verificados para microalgas cultivadas em vinhaça diluída e suplementada com fertilizante NPK. Apesar da vinhaça clarificada ter sido eficiente em estudos na literatura, no presente trabalho se mostrou um fator de inibição para o crescimento de *C. sorokiniana*, sugerindo novos estudos para a compreensão dos processos químicos pós clarificação necessários para o crescimento da microalga.

Foi verificada no capítulo cinco a existência de uma relação funcional entre as variáveis utilizadas para quantificar a microalga *Chlorella sorokiniana*. Para tanto, a análise de regressão linear foi aplicada às variáveis de densidade celular, densidade ótica e biomassa seca obtida pelo cultivo de microalgas em diferentes concentrações. Usando

as equações geradas a partir da análise de regressão para a microalga *C. sorokiniana* foi possível obter valores de densidade celular entre 3 a $38 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ e valores de biomassa seca entre 0,1 e 4,3 mg mL^{-1} a partir dos valores de densidade óptica com alta precisão e maior praticidade (NUNES et al., 2021).

No capítulo seis buscou-se produzir ésteres etílicos através da transesterificação etílica *in situ* da biomassa de *Chlorella sorokiniana*. A identificação e quantificação dos ésteres etílicos obtidos foi realizada através de cromatografia gasosa e as propriedades do biodiesel foram determinadas por equações empíricas. Os ésteres etílicos obtidos com a melhor relação entre ácidos graxos saturados em maior quantidade e poli-insaturados em menor quantidade, como é preferível, apresentou 24,34% de ácidos graxos saturados 56,63% de ácidos graxos monoinsaturados e 18,95% de ácidos graxos poli-insaturados. Quanto as propriedades do biodiesel avaliadas empiricamente, a maioria atendeu os padrões de controle de qualidade do biodiesel.

Propusemos no capítulo sete desenvolver e caracterizar filmes biopoliméricos a base de biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana*. Os filmes foram obtidos pelo método de *casting* em triplicata, com a microalga *Chlorella sorokiniana*, gelatina e glicerol, demonstrou excelentes características para embalagens de alimentos e uma barreira, em todas as concentrações de biomassa microalgal avaliadas para o desenvolvimento dos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*.

1.2 REFERÊNCIAS

- Cazzaniga, S., Dall'osto, L., Szaub, J., Scibilia, L., Ballottari, M., Purton, S. E., Bassi, R. 2014. Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, 7,157, p. 2-13. Doi: 10.1186/s13068-014-0157-z.
- Junior; W. G. M., Gorgicha; M., Corrêa; P. S., Martins; A. A., Mata; T. M., Caetano; N. S. 2020. Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing, **Aquaculture**, v. 528.
- Khan; M.I., Shin; J.H. e Kim; J.D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories** 17, 36, 2018.
- Malathi, A. N., Santhosh, K. S., Nidoni, U. 2014. Recent trends of biodegradable polymer: biodegradable films for food packaging and application of nanotechnology in biodegradable food packaging. **Current Trends in Technology and Science**, 3, 2, 73-79.

Nunes, N. S. P., Ansilago, M., Oliveira, N. N., Leite, R. S., Paz, M. F., Fonseca, G. G. 2020. Biofuel production. In: CHARIS M. GALANAKIS. (Org.). **Microalgae Cultivation, Recovery of Compounds and Applications**. I ed.: Elsevier, 145-166.

Nunes, N. S. P., Oliveira, I. G. S., Ansilago, M., Carvalho, E. M. 2021. Analysis of functional relationships between the cell quantification variables in the microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, 12, 1. Doi: 10.6008/CBPC2179-6858.2021.001.0036

Xu, L., Wim Brilman, D.W., Withag, J.A., Brem, G., Kersten, S. 2011. Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: energy balance analysis. **Bioresource Technology**, 102, 8, 5113-5122. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.066

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DA BIOMASSA DE MICROALGAS: UMA REVISÃO

RESUMO: Como uma solução promissora para atender as necessidades de energia e combustíveis tem-se as microalgas, organismos microscópicos unicelulares e fotoautotróficos encontrados principalmente em ambientes aquáticos. As microalgas podem ser utilizadas como matéria prima para a obtenção de biocombustíveis de terceira geração. Pesquisas vem sendo desenvolvidas no intuito de explorar precursores de biocombustíveis encontrados nestes microrganismos, como lipídios na forma de triacilglicerol e amido, sendo estes transformados em biodiesel e bioetanol, respectivamente, e a produção de biogás a partir da biomassa microalgal. Além disso, algumas espécies são capazes de produzir biohidrogênio, um combustível atraente e limpo que ajuda na redução de emissão de carbono. Desta forma, foi realizada uma revisão dos biocombustíveis produzidos a partir de biomassa microalgal, destacando os métodos de produção, vantagens e desvantagens além de características relevantes de cada biocombustível. Assim, observou-se que as microalgas são uma potencial biotecnologia sustentável na produção de biocombustíveis, necessitando apenas da adequação metodológica das tecnologias de produção para cada espécie, a fim de potencializar a geração do biocombustível que deseja obter.

Palavras-chave: biomassa microalgal, biodiesel, bioetanol, biohidrogênio, energia.

2.1 INTRODUÇÃO

É cada vez mais crescente a necessidade global por energia e o suprimento de combustíveis fósseis está ameaçado, pois essa fonte não é sustentável e está se esgotando. Assim a produção de alimentos e combustíveis depende da obtenção de recursos sustentáveis (TALEBI et al., 2013). Como uma solução promissora para atender as necessidades de energia e combustíveis tem-se as microalgas, organismos microscópicos unicelulares e fotoautotróficos encontrados principalmente em ambientes aquáticos, estão na base das cadeias alimentares e são considerados um dos organismos vivos mais antigos do planeta (KUMAR; SHARMA, 2014)

A biomassa de microalgas contém como principais componentes carboidratos, proteínas, lipídios, pigmentos, entre outros. Cada espécie de microalga é capaz de produzir diferentes quantidades desses componentes e seu metabolismo pode se alterar de acordo com as mudanças na composição química do meio além de outras condições como a temperatura e a luminosidade. Elas podem ser usadas como fonte para síntese de vários bioprodutos, tais como combustíveis, químicos, materiais, cosméticos, ração animal e suplementos alimentares.

O uso desta biomassa apresenta potencial para ser usado em vários processos energéticos. Ela possui vantagens consideráveis sobre matérias-primas tradicionais, como: alta produtividade - geralmente de 10 a 100 vezes maior do que as culturas agrícolas tradicionais; captura de carbono altamente eficiente; elevado teor de lipídios ou amido, que podem ser utilizados para produção de biodiesel ou etanol, respectivamente. Podem ser produzidas sobre terras não agriculturáveis sendo cultivadas em água doce, água do mar, água salobra ou mesmo em águas residuais e produção sobre terras não agricultáveis (XU et al., 2011; CAZZANIGA et al., 2014).

Além de poderem ser colhidas continuamente ao longo do ano, sem período de entressafra, outra característica que favorece a produção integrada e sequencial de vários produtos e reduz os custos de logística nas instalações de biorrefinarias é o cultivo e o processamento de microalgas poderem ser realizados em um mesmo local. Entre as técnicas usadas atualmente para se produzir microalgas em larga escala estão o uso de tanques tipo *raceway*, que são grandes tanques abertos e de fotobiorreatores tubulares fechados. Com diversas possibilidades para a produção de biocombustíveis a partir da biomassa microalgal há oportunidades para o desenvolvimento de uma indústria sustentável baseada em microalgas cuja produtividade é independente da fertilidade do solo e menos dependente da pureza da água. Os biocombustíveis produzidos a partir de

matérias-primas de primeira e segunda gerações têm uma capacidade limitada de atingir metas comerciais para produção de biocombustíveis, além do baixo potencial de mitigação de carbono (MATA et al., 2010); enquanto que as microalgas, matéria prima de terceira geração (Figura 2.1), utilizam como fonte de carbono tanto o carbono inorgânico (CO_2) quanto orgânico para a formação de ácidos graxos e, conseqüentemente, lipídios, sendo a quantidade destes em cada célula diferente entre espécies. Dessa forma há um interesse crescente em explorar microalgas na produção de precursores de biocombustíveis, como lipídios na forma de triacilglicerol e amido, que podem ser transformados em biodiesel e bioetanol, respectivamente, e a produção de biogás a partir da biomassa microalgal (Figura 2.2).

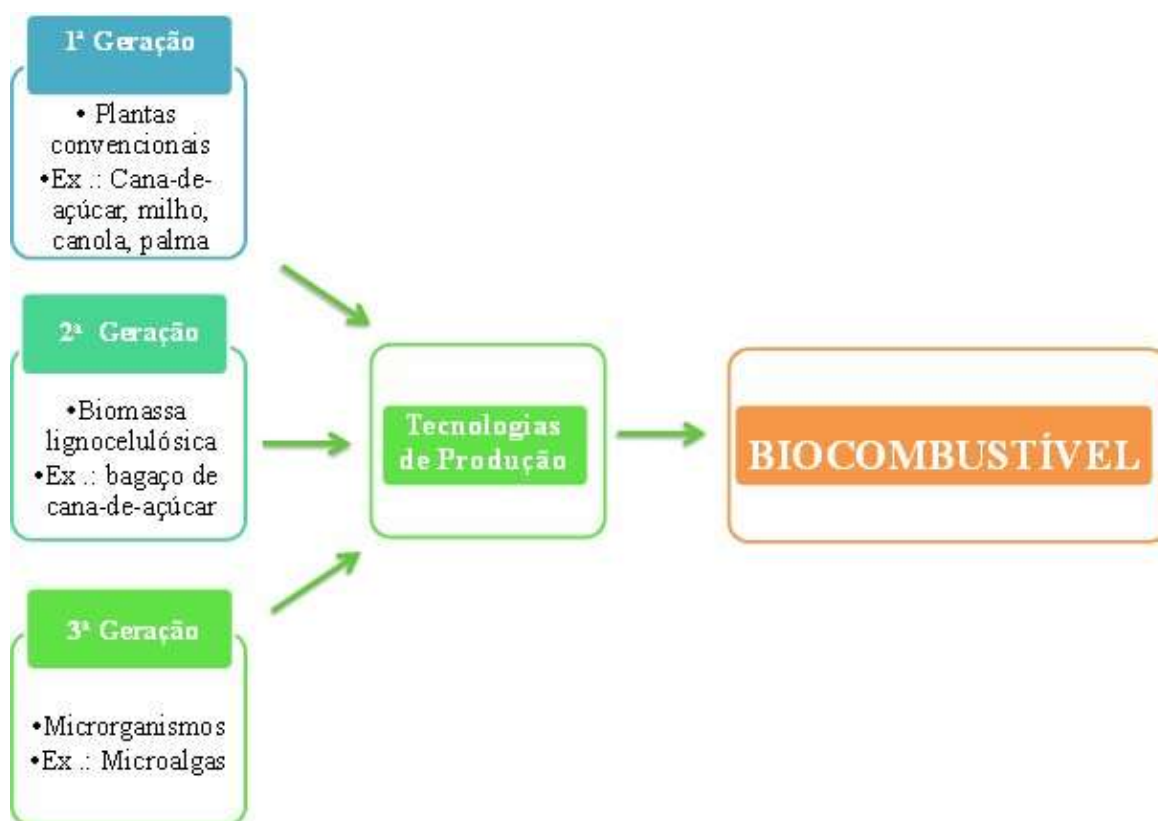


Figura 2. 1 Produção biocombustíveis por meio de diferentes fontes de recursos.

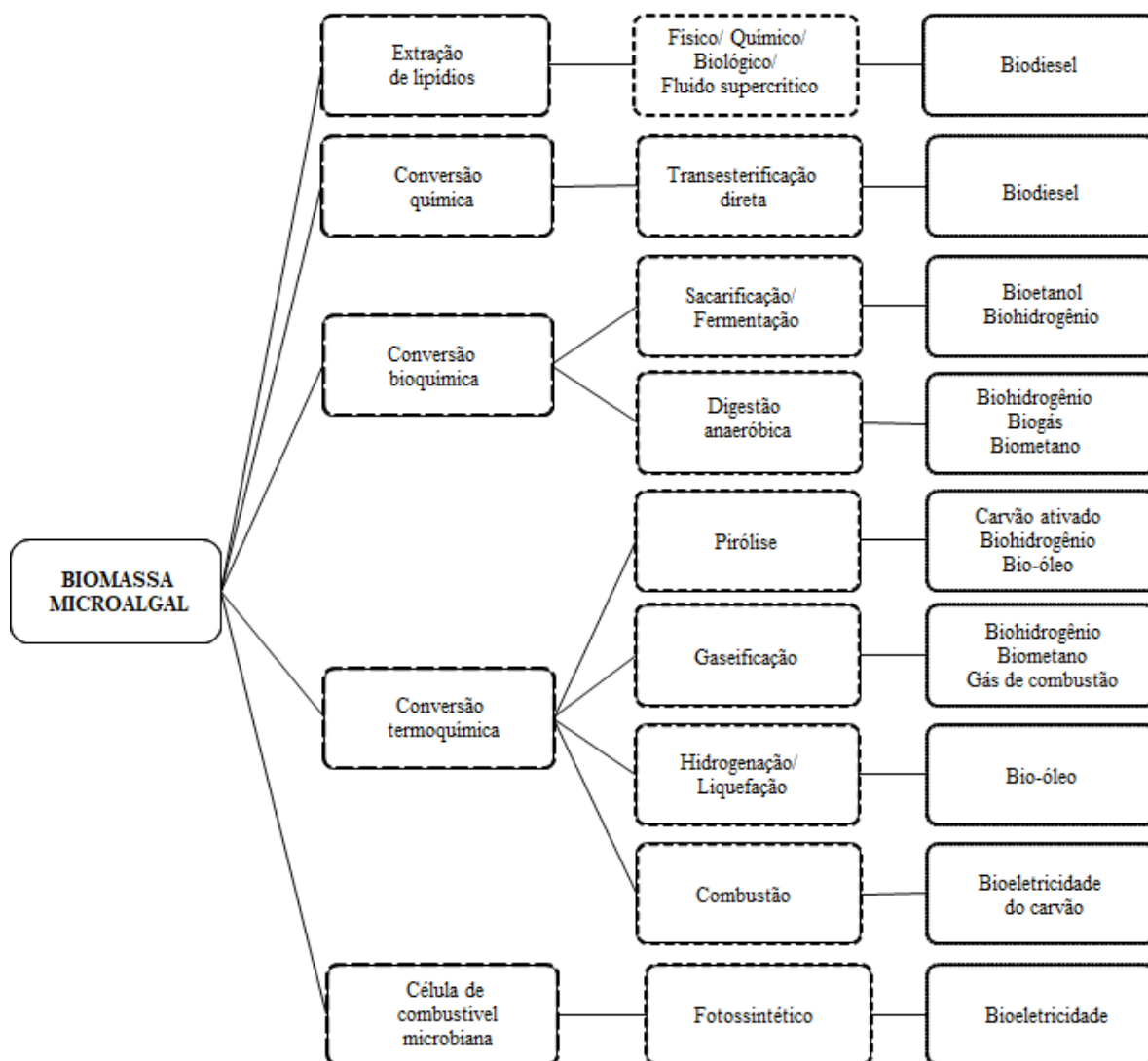


Figura 2. 2 Esquema de biocombustíveis produzidos a partir de microalgas.

2.2. PRINCIPAIS BIOCMBUSTÍVEIS PRODUZIDOS A PARTIR DE MICROALGAS

2.2.1. Biodiesel

Dentre as diversas aplicações para a biomassa microalgal, o uso para a produção de biodiesel tem ganhado destaque, já que as microalgas requerem muito menos área de terra, menos tempo (24 a 48 h) para maturidade e produzem cerca de 30 vezes ou mais rendimentos de óleo do que as culturas de sementes oleaginosas terrestres (KUMAR; SHARMA, 2014).

Os teores de lipídios de microalgas encontrados na literatura podem variar de 5 a 75% em termos de biomassa seca (SHARMA et al., 2012; OHSE et al., 2015). Apresentam em sua composição ácidos graxos com 14 a 22 átomos de carbono, que é

semelhante aos óleos vegetais utilizados na produção de biodiesel, além das características físicas e químicas semelhantes aos de biomassas tradicionais e do diesel, porém com um impacto ambiental significativamente menor do que o diesel derivado de fósseis (ADESANYA et al., 2014).

Estudos atuais em todo o mundo, concentram-se principalmente em melhorar o acúmulo de lipídios nas microalgas sob diversas condições de crescimento para maior produção de óleo. O acúmulo de lipídios nas microalgas ocorre quando um nutriente é esgotado do meio ou se torna o fator limitador do crescimento (BRENNAN; OWENDE, 2010). Dessa forma, intervenções biotecnológicas podem fazer grandes avanços para a produção em escala comercial de biocombustível a partir de microalgas.

A fim de potencializar a produção de lipídios, os pesquisadores têm recorrido ao melhoramento genético, permitindo o controle direto sobre esses microrganismos através da mutagênese ou à engenharia metabólica com a introdução de transgenes que ajustam as vias metabólicas da célula para desencadear a produção de metabólitos (NASIR et al., 2019). A modificação genética em microalgas oferece mais caminhos para o controle preciso dos mecanismos alvo, levando a um maior acúmulo de lipídios celulares em condições normais de crescimento (XUE et al., 2015; LIM; SCHENK, 2017).

As condições de cultivo também influenciam diretamente sobre a concentração de lipídios produzidos por cada espécie de microalga, de forma que submeter as células a estressores, como depleção de nutrientes, intensidade variável de luz, temperatura, salinidade e pH, são convencionalmente usadas para aumentar o acúmulo de lipídios dentro dos limites biológicos das células (BARTLEY et al., 2014; SUYONO et al., 2015).

A biomassa de *Chlorella* sp. obtida de culturas com 150 ppm de $MgSO_4$, 12,5% de salinidade e baixa intensidade luminosa apresentou alto teor lipídico (32,5%), no entanto, quando cultivadas em menor concentração de $MgSO_4$ e maior salinidade e intensidade luminosa, produziu menor teor lipídico (12,5%) (SHEKH et al., 2015). Verificando condições estressoras para promover a melhoria na produtividade de lipídios de *Chlorella vulgaris*, Beloti et al. (2013) constataram que a falta de nitrogênio representa apenas uma ligeira melhoria, porém quando associada a falta de nitrogênio e fósforo, houve aumento na produtividade total de lipídios não polares.

Os lipídios são a matéria-prima de biocombustível mais facilmente extraível de algas, mas o armazenamento é dificultado pela presença de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs- Polyunsaturated fatty acid) causando reações de oxidação e alto teor de umidade (BRENNAN; OWENDE, 2010). O alto teor de lipídios polares, uma classe de moléculas

que afeta negativamente o processo de produção de biodiesel, do petróleo bruto de microalgas geralmente não é analisado (BELOTTI et al., 2013). A transesterificação do triacilglicerol (TAG) é significativamente influenciada por vários parâmetros operacionais, incluindo a razão óleo / biomassa / álcool, carga do catalisador, tempo de reação e temperatura e pureza dos reagentes.

2.2.1.2 Métodos de produção

Para a produção do biodiesel tradicionalmente utilizam-se óleos que são convertidos por meio da reação de transesterificação, usando um álcool de cadeia curta, tais como metanol e etanol, responsáveis por fornecer os radicais metila e etila, respectivamente, e um catalisador básico ou ácido, sendo que à medida que a reação avança são gerados o glicerol e um conjunto de ésteres de ácidos graxos como produtos (WAHLEN et al., 2011). Como alternativa ao processo clássico de produção de biodiesel, tem-se adotado o processo de transesterificação direta das microalgas usando soluções com álcool, catalisador e um solvente, juntamente com a biomassa.

A transesterificação convencional tem duas etapas, na primeira os triacilglicerídeos (TAG) são extraídos os lipídios das microalgas pelo método de extração por solvente. Geralmente solventes como como clorofórmio, metanol, hexano ou isopropanol são usados para a extração, individualmente ou em proporções mistas. Na segunda etapa, os TAG são transformados em éster metílico de ácidos graxos (FAME-Fatty acid methyl ester) na presença de um álcool monohidroxi (como metanol) e um catalisador (um alcalino ou ácido) com glicerol como subproduto (PARK et al., 2019). Mesmo já sendo bem estabelecido, o processo de transesterificação convencional, tem algumas desvantagens, pois gera uma quantidade muito grande de contaminantes com solvente em águas residuais, gerando sérios problemas de reciclagem, além de que o manuseio e armazenamento do grande volume desses solventes podem causar riscos ambientais e de saúde.

A transesterificação direta é uma alternativa para a produção de biodiesel a partir de biomassa microalgal em uma única etapa (Figura 2.3). Nesse processo, a biomassa microalgal é misturada com metanol na presença de um catalisador adequado por um certo período de tempo e em determinada temperatura. O metanol usado neste processo é facilmente recuperado e pode ser reutilizado várias vezes. Esse processo, portanto, minimiza o uso de grande quantidade de solventes, reduz os tempos de processamento e reduz a riscos ambientais e de saúde. No entanto, requer otimização adequada de parâmetros físico-químicos, como temperatura, concentração de catalisador, tempo de

reação entre outros, para obter rendimentos mais altos de biodiesel (GHOSH et al., 2017). Desse modo, busca-se eliminar o processo de extração e purificação dos lipídios da biomassa (TALEBI et al., 2013; GHOSH et al., 2017; VELASQUEZ-ORTA et al., 2012; TORRES et al., 2017). Com base nessas características, a transesterificação direta da biomassa microalgal pode alcançar valores semelhantes para a recuperação de ácidos graxos aos que seriam obtidos por métodos que realizam a extração seguida de transesterificação (Tabela. 2.1). No entanto, esses resultados dependem muito da espécie em estudo, para *Chlorella vulgaris* os valores de FAME foram superiores quando utilizado o processo convencional de transesterificação (NASCIMENTO et al., 2013; TALEBI et al., 2013; VELASQUEZ-ORTA et al., 2012), enquanto que para *Nannochloropsis gaditana* com a transesterificação direta é que foram obtidos os valores superiores de FAME (JAZZAR et al., 2015; TORRES et al., 2017).

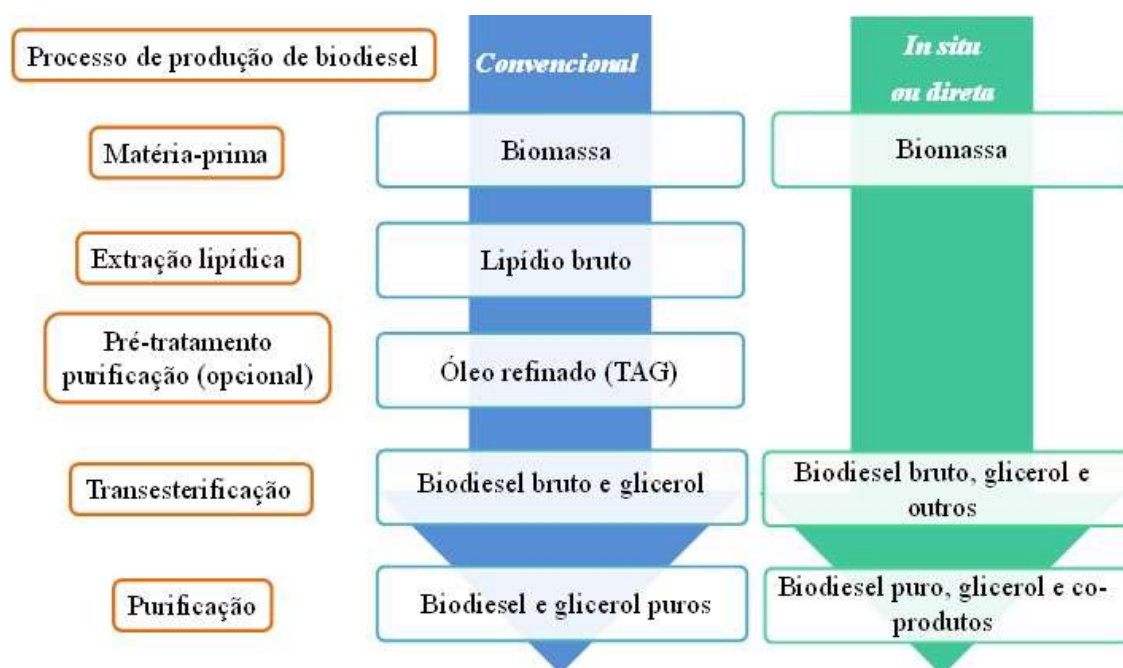


Figura 2.3. Fluxograma dos métodos de produção de biodiesel.

As moléculas de triacilgliceróis reagem com um álcool de cadeia curta, metanol ou etanol, sendo mais utilizado o metanol. Ele é comercializado com um alto grau de pureza e não é higroscópico, porém como já citado é altamente tóxico, além de ser de origem fóssil. Assim, o uso do etanol como solvente contribuiria para o processo ser 100% renovável, no entanto, a presença de água no álcool hidratado dificulta a síntese do

biodiesel. A hidrólise, reduz a atividade do catalisador, aumenta o seu consumo, aumenta saponificação e diminui o rendimento de biodiesel (RAHMAN et al., 2017).

Buscando avaliar a utilização do etanol na transesterificação direta de biodiesel a partir da microalga *Ankistrodesmus* sp, Makareviciene et al. (2019) encontraram as condições ideais de processamento com temperatura a 42 ° C, razão molar etanol / óleo, 8: 1, biocatalisador Lipozyme TL IM, 9,6% (da massa do óleo), duração do processo, 12h, resultando em 97,69% de transesterificação de óleo, com um produto final contendo 6,8% de ésteres etílicos de óleo de microalgas misturado com óleo diesel e atendendo aos requisitos da norma europeia de combustível diesel. Dessa forma, o etanol pode ser usado em vez de metanol para a produção de biodiesel e fazer a processo ecológico e eficiente, devendo-se apenas encontrar catalisadores que promovam o melhor desempenho deste solvente no processo de transesterificação direta.

Tabela 2. 1 Comparação do rendimento FAME gerado na transesterificação convencional e na transesterificação direta.

Método	Condições	Espécie de microalga	AGS	AGM	AGP	Ref.			
Transesterificação Convencional	NaOH em metanol, seguido de metilação com BF3 catalisador (12% em metanol)	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	41,39	28,41	30,20	Nascimento et al. 2013			
		<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	37,33	22,43	40,24				
		<i>Kirchneriella lunaris</i>	32,06	23,11	44,83				
		<i>Coelastrum microporum</i>	45,87	38,03	16,10				
		<i>Desmodesmus brasiliensis</i>	34,54	44,08	21,38				
		<i>Scenedesmus obliquus</i>	70,83	21,71	7,46				
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	35,39	47,36	17,25				
		<i>Chlorella vulgaris</i>	52,15	37,51	10,33				
		hexano / clorofórmio (4: 1, v / v)		<i>Achnanthes</i> sp.	40,20		45,90	14,30	Doan et al. 2011
				<i>Heterosigma</i> sp.	45,40		31,00	23,70	
<i>Nannochloropsis</i> sp	47,50			41,80	10,70				

Tabela 2.1. Comparação do rendimento FAME gerado na transesterificação convencional e na transesterificação direta (continuação).

		<i>Ankistrodesmus</i> sp.	23,43	23,27	37,16	
	Metanol e 2% de ácido sulfúrico em 4 mg de microalgas (2 h, 80 ° C, 750 rpm). 300 µl de solução de NaCl a 0,9% e 300 µl de hexano; centrifugada (3000 g, 20 ° C, 3 min)	<i>Dunaliella salina</i> (UTEX)	22,77	22,89	34,47	Talebi et al. 2013
		<i>Scenedesmus</i> sp.	18,59	26,86	30,00	
		<i>Chlorella emersonii</i>	24,55	17,01	38,37	
		<i>Chlorella protothecoides</i>	22,79	19,23	36,19	
		<i>Chlorella salina</i>	29,34	18,52	40,63	
		<i>Chlorella vulgaris</i>	25,0	24,80	45,90	
Transesterificação Direta	Metanol e ácido clorídrico em 1 g de biomassa microalgal	<i>Chlorella</i> sp	28,5	40,6	28,2	Ghosh et al. 2017
	Proporção de metanol 600: 1, catalisador ácido Sulfúrico 0,35: 1	<i>Chlorella vulgaris</i>	18,6	42,9	20,9	Velasquez-Orta et al. 2012
	Proporção de metanol 600: 1, catalisador hidróxido de sódio alcalino 0,35: 1	<i>Chlorella vulgaris</i>	15,3	41,86	31	
	Metanol, catalisador ácido sulfúrico, agitação por 2h a 95–100 ° C, hexano, agitação por 30 min. Biodiesel foi destilado duas vezes	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	29,8	20,49	14,79	Torres et al. 2017

AGS: ácidos graxos saturados (%), AGM: ácidos graxos monoinsaturados (%), AGP: ácidos graxos poliinsaturados (%)

2.2.1.3 Caraterísticas relevantes

As biomoléculas de lipídios são formadas por carbono, hidrogênio e oxigênio. Estes lipídios incluem fosfolipídios, glicolipídios, mono-, di- e triacilgliceróis, dentre outros (GREENWELL et al., 2010), os quais apenas os triacilgliceróis são facilmente convertidos em biodiesel pelo método de transesterificação. As microalgas são também compostas por triglicerídeos e ácidos graxos poli-insaturados que não são tradicionalmente utilizados para a obtenção de biodiesel, pois são propensos a reações de

oxidação indesejáveis (ADESANYA et al., 2014). A alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados limita a velocidade da reação e por sua vez aumenta a energia de ativação (GHOSH et al., 2017).

A maioria das microalgas marinhas não atendem aos parâmetros exigidos por normas internacionais, com relação à composição de ácidos graxos, devido apresentarem consideráveis teores de ácidos insaturados, especialmente tri- e poli-insaturados. Assim, diante dos resultados de produção de biodiesel a partir de microalgas marinhas, estima-se que o biodiesel produzido por espécies dulcícolas demonstrará melhor qualidade nas propriedades físico-químicas do biodiesel. De acordo com os parâmetros estabelecidos pela norma EN 14214, o limite máximo estabelecido para o teor de ácido linolênico ou, no caso de microalgas, de ácidos tri- insaturados, é de 12%; e de 1% para o teor máximo de ácidos graxos com mais de três duplas ligações (AGP).

As insaturações reduzem a viscosidade do biodiesel e melhoram as propriedades de ponto de entupimento de filtro a filtro. Entretanto, a presença de ácidos graxos insaturados, principalmente os AGP, irá causar baixa estabilidade oxidativa ao biocombustível. A predominância dos ácidos oleico e palmitoleico, dentre os ácidos insaturados e os baixos teores de di, tri e poli-insaturados favorecem algumas das propriedades físicas do biodiesel, tais como as de ponto de entupimento e viscosidade. Apesar da saturação e do perfil dos ácidos graxos das microalgas não terem muito impacto sobre a obtenção de biodiesel a partir da reação de transesterificação, eles podem afetar as propriedades do biocombustível.

Muitas revisões de literatura relacionam o conteúdo de lipídios e ácidos graxos obtidos através do cultivo de diferentes espécies e linhagens de microalgas, no entanto, poucos relacionam a influência dos métodos de obtenção com a qualidade do biodiesel produzido (GOH et al., 2019). A influência de cada ácido graxo nas propriedades do biodiesel foi investigada por Islam et al. (2013), os autores observaram que quanto maior o ácido graxo poliinsaturado, maior o valor de iodo (VI) e menor o número de cetano. A viscosidade é altamente associada aos ácidos graxos saturados, de modo que um valor mais alto de aquecimento aumenta os ácidos graxos saturados, enquanto o valor do iodo é um parâmetro indicador do grau de saturação do combustível que influencia a viscosidade do combustível e o ponto de conexão do filtro a frio.

As propriedades do biodiesel produzido a partir de *Chlorella* sp foram avaliadas por Gumbyte et al., (2018) através da transesterificação convencional (TC) e por Ghosh et al. (2017) através da transesterificação direta (TD) (Tabela 2.2). A densidade e a

viscosidade do combustível afetam o desempenho do motor e suas características de emissão, foram obtidos valores de 833 e 886, para densidade, e 3.82 e 4.6 para viscosidade, através de TC e TD, respectivamente. O número de ácidos descreve a qualidade do biodiesel e mede seu potencial corrosivo, esta propriedade foi avaliada somente na TD, com 0.7. O valor do iodo indica a estabilidade química do biodiesel, com 80.6, também avaliada apenas na TD. O valor de saponificação significa a quantidade de álcalis necessária para a hidrólise de ácidos graxos nos glicerídeos, com 244.8 obtidos através da TD. Outra característica importante do combustível é o número de cetano, que é a capacidade de um combustível inflamar rapidamente, foram observados os valores de 52 e 56.1, para *Chlorella* sp através da TC e TD, respectivamente.

Gumbyte et al. (2018) obtiveram um rendimento de 98% de transesterificação com uma razão molar de etanol e óleo de 4,54: 1, onde o baixo teor de ácidos graxos poliinsaturados foi uma propriedade positiva para a produção de combustível biológico, pois os ácidos poliinsaturados são propensos à oxidação; durante a oxidação, os produtos de oxidação secundária geram borrachas, bloqueando os injetores de combustível, esse combustível não pode alcançar o motor. Enquanto Ghosh et al. (2017) com uma razão molar de metanol e biomassa de microalgas de 5: 1 obtiveram uma conversão lipídica máxima de 95%.

O perfil da FAME analisado por Nascimento et al. (2013) sugeriu que a melhor abordagem para gerar biodiesel de microalgas de alta qualidade é misturando os óleos de culturas celulares distintas, já que *Kirchneriella lunaris*, *Ankistrodesmus fusiformis*, e *Ankistrodesmus falcatus* mostraram os maiores níveis de FAME poli-insaturadas incorrendo na produção de biodiesel com a menor número de cetano (NC), o mais alto valores de iodo (IV) e a menor estabilidade à oxidação, enquanto que os níveis mais altos de FAME saturada nos óleos *Scenedesmus obliquus* os indicaram como fonte biodiesel com maior estabilidade à oxidação, maior NC e IV inferior. O biodiesel produzido a partir de microalgas pode ter altos valores do índice de iodo, uma vez que é composto principalmente de ácido graxo insaturado de ésteres metílicos (TORRES et al., 2017).

Um biodiesel composto por ésteres de ácidos graxos saturados e de cadeia longa apresentará alto número de cetano (NC), o que favorece a qualidade do biocombustível. A propriedade de número de cetano, que mede a qualidade da combustão, está relacionada com a velocidade de ignição. Um alto número de cetano indica bom funcionamento do motor, com minimização da quantidade de poluentes emitidos. Esta propriedade é influenciada pelo grau de saturação e comprimento da cadeia carbônica. O NC mínimo

de biodiesel é 51 na Europa, 47 nos EUA e 45 no Brasil. Levando essas especificações em consideração, o biodiesel de microalgas atinge todos os requisitos de NC, e isto é uma indicação adicional da viabilidade deste biocombustível como alternativa ao biodiesel a partir de óleos vegetais alimentares (BATISTA et al., 2018)

Assim nenhuma barreira é definitiva ao futuro de produção de biodiesel de microalgas, são necessárias inovações biológicas e de engenharia significativas para mitigar a demanda por recursos. É essencial determinar o método mais eficiente para cada espécie, quanto ao processo de produção do biodiesel, transesterificação direta ou convencional, o solvente a ser utilizado e o catalizador, parâmetros esses determinantes na qualidade do perfil de ácidos graxos extraídos e conseqüentemente nas propriedades do biodiesel produzido.

2.2.2 Bioetanol

O bioetanol produzido pelas microalgas se caracteriza como um biocombustível de terceira geração (LAKATOS et al., 2019), uma vez que é proveniente da fermentação do carboidrato presente na biomassa de um microrganismo, no caso em questão, das microalgas. O bioetanol microalgal se apresenta como um excelente substituto para a gasolina convencional refinada do petróleo (DOAN et al., 2012).

As vantagens de se utilizar a biomassa microalgal em relação a outros tipos de biomassa, se dá pelo fato de que são necessários menos hectares para se obter uma boa produção de biomassa, podem ser cultivadas sobre áreas improdutivas, facilidade no rompimento celular e liberação dos carboidratos, além de que não existe um conflito alimentar, o que é um problema da primeira geração de biocombustíveis (DUTTA; LIN, 2014; PHWAN et al., 2018).

Até o presente momento, a desvantagem do bioetanol proveniente da biomassa se dá pelo fato de ainda não se ter a todas as variáveis (cultivo, colheita, ruptura celular e conversão) (Figura 2.4) do processo produtivo otimizadas (LEE et al., 2015). Além do

Tabela 2. 2 Propriedades do biodiesel de microalgas.

Condições de reação do biodiesel	Espécies de microalgas	GI	NC	VS	II	FSCL	POFF	PN	IA	D	V	PI	Ref.	
Transesterificação convencional	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	88,81	50,52	201,97	101,33	1,69	-10,43	-	-	-	-	-	Nascimento et al. 2013	
	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	102,91	48,00	199,85	113,81	1,78	-10,14	-	-	-	-	-		
	<i>Kirchneriella lunaris</i>	112,77	42,47	202,21	136,97	1,94	-9,62	-	-	-	-	-		
	<i>Coelastrum microporum</i>	70,23	52,95	205,63	88,42	1,98	-9,52	-	-	-	-	-		
	<i>Desmodesmus brasiliensis</i>	86,84	53,28	205,46	87,05	1,23	-0,55	-	-	-	-	-		
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	36,63	63,63	216,04	35,28	1,23	-11,87	-	-	-	-	-		
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	81,86	53,94	207,68	82,83	1,95	-9,60	-	-	-	-	-		
	<i>Chlorella vulgaris</i>	58,17	61,83	199,37	52,63	1,57	-10,81	-	-	-	-	-		
	<i>Chlorella protothecoides</i>	-	51,32	-	-	-	-	246,0	0,224	0,874	4,88*	183,9		Batista et al. 2018
	<i>Chlorella</i> sp.	-	52	-	-	-	-	-	-	833**	3,82**	58		Gumbyté et al. 2018
<i>Acutodesmus obliquus</i>	-	-	165,66	156,40	-	-	-	74,41	-	33,33**	-	Escorsim et al. 2018		
Transesterificação direta	<i>Ankistrodesmus</i> sp.	97,59	52,45	170,60	114,88	5,22	-0,08	3,55	-	-	-	-	Talebi et al. 2013	
	<i>Dunaliella salina</i> (UTEX)	91,83	55,40	170,56	108,58	4,85	-1,24	3,60	-	-	-	-		
	<i>Scenedesmus</i> sp.	86,86	59,57	152,99	99,57	3,05	-6,91	3,22	-	-	-	-		
	<i>Chlorella emersonii</i>	93,75	54,24	162,28	114,18	6,37	3,55	2,77	-	-	-	-		
	<i>Chlorella protothecoides</i>	91,60	54,57	163,37	111,75	4,93	-0,99	3,51	-	-	-	-		
	<i>Chlorella salina</i>	99,78	49,93	180,97	117,92	6,07	2,58	6,32	-	-	-	-		
	<i>Chlorella vulgaris</i>	116,59	44,0	194	135,26	6,71	4,60	2,66	-	-	-	-		
	<i>Chlorella</i> sp. MJ 11/11	-	56,1	244,8	80,6	-	-	-2,2	0,7	886*	4,6**	113		Ghosh et al. 2017
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	-	52	-	-	-	-	-	-	844**	4,45**	59	Makareviciene et al. 2019		
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	-	-	-	86,5	-	-	-	2,7	852**	3,76**	-	Torres et al. 2017		

GI: grau de insaturação, NC: número de cetano, VS: valor de saponificação (mg g^{-1}), II: índice de iodo ($\text{g I}_2 \text{ 100 g}^{-1}$), FSCL: fator saturado de cadeia longa, POFF: ponto de obstrução do filtro frio ($^{\circ}\text{C}$), PN: ponto de nuvem ($^{\circ}\text{C}$), IA: Índice de acidez (mg KOH.g^{-1}), D: Densidade (g.cm^{-3}) a $^{\circ}\text{C}$, ** 15°C ; V: Viscosidade ($\text{mm}^2.\text{s}^{-1}$) a $^{\circ}\text{C}$, * 40°C , FP: Ponto de inflamação ($^{\circ}\text{C}$).

fato de que as enzimas ainda representam um elevado custo no setor industrial. No entanto tal fato, pode vir a ser contornado com maiores investimentos em microalgas geneticamente modificadas (LAKATOS et al., 2019).



Figura 2.4. Fluxograma das variáveis do processo produtivo do bioetanol.

2.2.2.1 Métodos de produção

Os métodos de rompimento celular podem ser físicos, químicos e biológicos. Os tratamentos físicos são: agitação, ultrassonicação, autoclavagem, micro-ondas, entre outros. Tais métodos, atuam ou fazendo uma ruptura mecânica por contato, pressão ou desnaturação (LAKATOS et al., 2019) Uma das vantagens desses métodos é que são eficientes e não geram resíduos e a desvantagem é que demandam energia.

Já os métodos químicos, se caracterizam pela utilização de reagentes químicos ácidos ou alcalinos para a ruptura celular. A vantagem desse processo é a simplificação, pois pelo uso dos reagentes químicos (principalmente o ácido sulfúrico), consegue-se realizar a ruptura celular e a hidrólise dos polissacarídeos ao mesmo tempo (CHNG et al., 2017). A desvantagem é a geração de resíduos além do risco operacional por se tratar de um ácido extremamente corrosivo.

O método biológico por sua vez, se caracteriza pelo uso de enzimas para fazer tanto a ruptura celular, como a hidrólise dos polissacarídeos. Enzimas, apesar de apresentarem valor elevado, não são nocivas ao meio ambiente, porém exigem o controle de alguns fatores como pH, temperatura, dentre outros (HARUN; DANQUAH, 2011).

Outro método de produção é processo de sacarificação, que é extremamente necessários devido a diversidade de polissacarídeos encontrados na biomassa microalgal. Dentre os açúcares não polissacarídeos, acumulados na biomassa microalgas pode-se

citar xilose, manose, arabinose, manose, galactose, glicose (KIM et al., 2014; KIM et al., 2017).

Os processos de sacarificação mais utilizados para a liberação e hidrólise dos polissacarídeos presentes nas microalgas são: hidrólise química e enzimática. A hidrólise química geralmente é realizada utilizando o ácido sulfúrico, mas também existem trabalhos que relatam o uso de ácido clorídrico e até mesmo o uso de ácido acético (CHNG et al, 2017; PHWAN et al., 2019).

Dessa forma, mistura-se a biomassa microalgal com uma solução de ácido (a concentração do ácido pode variar de espécie para espécie). Logo em seguida, realiza-se a elevação da temperatura para a que a hidrólise de fato aconteça (KHAN et al., 2017; ZHOU et al., 2011). Após o processo de hidrólise, tem a necessidade de ajustar o pH para posterior ou simultânea fermentação (HO et al., 2013a, b).

A hidrólise enzimática por sua vez, ocorre fazendo uso de enzimas de diferentes microrganismos. Dentre as enzimas utilizadas, pode-se citar: a amiloglucosidase (CHNG et al., 2017), β -glucosidase, celulase (ONAY, 2019), lisozima (KHAN et al., 2017). O rendimento desse processo é extremamente alto, no entanto quanto mais enzimas purificadas são utilizadas, maior é o custo do processo produtivo.

A produção do bioetanol pode também ser realizada a partir da fermentação dos polissacarídeos encontrados na biomassa microalgal (DUTTA et al., 2014). Em relação ao processo fermentativo, pode se optar por fazer a hidrólise e em seguida a fermentação (HSF), ou fazer simultaneamente a hidrólise e a fermentação (SHF). Para o processo de SHF pode ser realizado algum tratamento físico antes, ou pode-se utilizar enzimas que realizem a ruptura celular.

Nesse processo o rendimento de bioetanol é maior quando comparado com o SHF, na maioria dos trabalhos, pois ocorre um efeito sinérgico entre a digestão dos carboidratos (com a enzima ou com o ácido) e a produção de bioetanol (CHNG et al., 2017; PHWAN et al., 2019; KIM et al., 2014). No processo HSF, tem-se a necessidade de realização de duas operações, sendo a primeira a hidrólise e posteriormente a fermentação.

Para ambos os processos, a fermentação ocorre fazendo uso de dois principais microrganismos *Zymomonas mobilis* (HO et al., 2013a, b) e *Saccharomyces cerevisiae* (KIM et al., 2014; PHWAN et al., 2019). Logo, para verificar a eficiência da conversão dos carboidratos em etanol, utiliza-se a Equação 2.1 descrita por Mussatto et al. (2010).

$$\text{Rendimento teórico de etanol \%} = \frac{\text{Etanol (g)}}{\text{Açúcar Total (g)} \times 0.511 \times 100}$$

Equação 2.1.

Onde: 0.511 é a máxima conversão teórica de açúcar em etanol.

De acordo com a Tabela 2.3, é possível observar que cada etapa do processo produtivo é extremamente importante, desde a escolha da cepa, ao método de hidrólise e o tipo de fermentação, pois vão influenciar diretamente na produtividade final de etanol obtida. Logo, para cada microalga e conseqüentemente para hidrólise de seus polissacarídeos é importante a avaliação de ambos os métodos de hidrólise e verificar a eficiência de cada um, bem como dos métodos de fermentação.

A recombinação genética, poderia então ser utilizada visando minimizar as etapas do processo produtivo e dessa maneira, modificar a microalga para que seu metabolismo se assemelhe cada vez mais ao de uma levedura.

2.2.2.2 Características relevantes

A quantidade de açúcar encontrado na biomassa depende da espécie e também pode ser influenciada por outros fatores, tais como, temperatura, intensidade luminosa, pH, suplementação de dióxido de carbono, macronutrientes (nitrogênio, fósforo) entre outros (HO et al., 2012; BUONO et al., 2014; LAKATOS et al., 2019).

No trabalho realizado por Kim et al. (2014), quando se induziu um estresse relacionado a limitação dos nutrientes nitrogênio e enxofre no cultivo de *Chlorella vulgaris*, foi constatado o aumento de 7 e 40% (w/w), respectivamente, no teor de carboidratos totais encontrados em relação a condições normais. No estudo realizado por Ho et al. (2012) a influência da intensidade luminosa foi associada à limitação de nutrientes no processo produtivo de biomassa e de produto para a microalga *Scenedesmus obliquus*. Foi observado que à medida que se aumentou a intensidade luminosa, a quantidade de biomassa produzida também foi maior e conseqüentemente maior fixação de dióxido de carbono. No entanto, o limite de aumento para essa espécie nessas determinadas condições foi de $540 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. E o maior teor de carboidratos foi de 22,4% (w/w), com cinco dias de limitação de nitrogênio.

Dessa forma, é possível observar que em relação ao custo produtivo final, deve-se analisar todas essas variáveis, uma vez que elas também influenciam diretamente na

quantidade de biomassa produzida, logo a otimização das mesmas, pode resultar na diminuição dos custos por se ter uma alta produtividade de biomassa, somada a uma elevada produtividade de produto (HO et al., 2013).

2.2.3 Biohidrogênio

Nos últimos anos, em decorrência de uma crescente e elevada demanda de energia e ao fato de um consumo acentuado das reservas de combustíveis não renováveis, as tecnologias de produção de combustíveis produzidos a partir de energia renovável têm recebido especial atenção, entre eles o biohidrogênio, visto que o mesmo é considerado como uma fonte de energia potencialmente mais limpa e uma alternativa promissora quando comparado aos demais combustíveis fósseis convencionais (SHOW et al., 2019; KHOSRAVITABAR, 2019). O biohidrogênio libera somente água como produto final no seu processo de produção, por este motivo ele vem sendo considerado como uma alternativa sustentável para a substituição da gasolina e/ou do diesel, gerando assim menos impactos negativos ao meio ambiente (SZWAJA; GRAB-ROGALINSKI, 2009).

O hidrogênio não pode ser encontrado livre no meio ambiente, porém pode ser encontrado combinado a outros elementos, sendo considerada uma fonte intermediária de energia. O hidrogênio pode conter o triplo de energia que combustíveis originários a partir de hidrocarbonetos (KHOSRAVITABAR, 2019). Ainda segundo Khorsravitar (2019), para que ocorra o processo de produção do hidrogênio são necessários alguns aportes externos de energia, como a luz, o calor ou até mesmo a eletricidade. O desafio para a utilização do hidrogênio consiste na sustentabilidade na etapa de produção e da estocagem deste combustível (GHIMIRE et al., 2015).

A utilização de microalgas para a produção de biohidrogênio é uma tecnologia recente, considerada limpa e que possui diversos benefícios, como por exemplo: elevada captura de CO₂ quando comparada a outras plantas superiores, métodos simplificados para o cultivo deste microrganismo, podendo ser utilizados resíduos como fonte de carbono, além de produção acelerada e alto teor de carboidratos, sem presença de material

Tabela 2. 3 Influência da cepa, do método de hidrólise e o tipo de fermentação na produtividade final de etanol obtida.

Microalga	Método de hidrólise	Tipo de fermentação	Levedura	Produção de bioetanol, g bioetanol / g biomassa	Rendimento teórico de bioetanol, %	Referência
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	4% v/v ácido sulfúrico	SHF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,178	80,3	Ching et al. 2017
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Enzimático (amiloglucosidase)	SHF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,183	84,3	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	2.5% ácido sulfúrico	SHF	<i>Zymomonas mobilis</i>	0,195	-	Ho et al. 2013b
<i>Chlorella sp</i>	1% ácido sulfúrico	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,137	-	Phwan et al. 2019
<i>Chlorella sp</i>	3% ácido sulfúrico	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,169	-	
<i>Chlorella sp</i>	5% ácido sulfúrico	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,281	-	
<i>Chlorella sp</i>	7% ácido sulfúrico	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,154	-	
<i>Chlorella sp</i>	9% ácido sulfúrico	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,084	-	
<i>Chlorella sp</i>	1% ácido acético	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,110	-	
<i>Chlorella sp</i>	3% ácido acético	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,133	-	
<i>Chlorella sp</i>	5% ácido acético	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,230	-	
<i>Chlorella sp</i>	7% ácido acético	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,134	-	
<i>Chlorella sp</i>	9% ácido acético	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,080	-	
<i>Porphyridium cruentum</i> (SPC)	Enzimático (celulase e pectinase)	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	65,4	Kim et al. 2017
<i>Porphyridium cruentum</i> (FPC)	Enzimático (celulase e pectinase)	SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	70,3	
<i>Scenedesmus obliquus</i> CNW-N	2.0% ácido sulfúrico	SHF	<i>Zymomonas mobilis</i>	0,213	99,8	Ho et al. 2013b
<i>Chlorella vulgaris</i>	Enzimático (celulases e amilases)	SHF	<i>Zymomonas mobilis</i>	0,178	89,3	Ho et al. 2013a
<i>Chlorella vulgaris</i>	Enzimático (celulases e amilases)	SSF	<i>Zymomonas mobilis</i>	0,214	92,3	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ácido sulfúrico	SHF	<i>Zymomonas mobilis</i>	0,233	87,59	

N.I.: não informado; ASPC: *Porphyridium cruentum* de água salgada; ADPC: *Porphyridium cruentum* de água doce; SHF: Fermentação e hidrólise separadas; SSF: Fermentação e hidrólise simultâneas.

lignocelulósico, possibilitando a sua utilização como matéria prima na produção de combustíveis de terceira geração (CALLEGARI et al., 2020; SARATALE et al., 2019).

Dentre os substratos usualmente utilizados, para a produção das microalgas, pode-se citar os materiais advindos de resíduos que geralmente não possuem grande valor econômico e comercial, sendo por vezes agravantes para o meio ambiente. Dentre os materiais que podem ser utilizados como substrato na produção de microalgas, temos: resíduos da agricultura, como bagaços lignocelulósico; dejetos da pecuária e suinocultura; resíduo industrial, como resíduo da produção do óleo de palma e óleo de oliva; resíduos orgânicos municipais, entre outros (GHIMIRE et al., 2015).

2.2.3.1 Métodos de produção

A produção de hidrogênio pode ocorrer de diferentes formas, como a partir de fontes não renováveis e fontes renováveis de energia. Dentre as técnicas de produção do hidrogênio por meio de fontes não renováveis de energia, pode-se citar a reforma a vapor de gás, gaseificação, pirólise, outras por meio da água, como a eletrolise e outras por meio de microrganismos, como a fermentação e a biofotólise (DEMIRBAS, 2009). Porém, as tecnologias associadas a combustíveis fósseis para produção do hidrogênio ainda são prejudiciais ao meio ambiente, sendo necessário o estudo e aplicação de tecnologias de produção limpa e que sejam ambientalmente mais sustentáveis (SHOW et al., 2011). Dentre as técnicas para a produção de hidrogênio por meio de fontes renováveis, pode-se citar a energia hidroelétrica, energia eólica, energia ondomotriz, energia solar, energia geotérmica, por meio de biomassa e até por meio de energias não renováveis, como carvão, gás natural e energia nuclear (ABE et al., 2019).

A produção de biohidrogênio por meio de microalgas pode ocorrer por meio de sistemas fotobiológicos em biorreatores, que são utilizados para a produção da biomassa, em condições de cultivo controladas, como luz, temperatura, pH, aeração, entre outras (HALLENBECK, 2005; CHANDRA et al., 2019). Dentre os processos, pode-se citar a foto-fermentação, a fermentação anaeróbica, a eletrólise microbiana, a pirólise e a gaseificação (AZIZ, 2015; SARATALE et al., 2019) como pode ser visualizado na Figura 2.5. Na fermentação anaeróbica ocorre a fermentação com ausência de luz, produzindo hidrogênio. Na foto-fermentação tem-se a eletrólise direta e indireta e a fermentação com presença de energia luminosa (SARATALE et al., 2019). O processo de fotólise envolve a fotossíntese e o acúmulo de carboidratos, que em um momento posterior são convertidos em hidrogênio. No processo de eletrólise microbiana, os elétrons, que são resultantes do

metabolismo dos microrganismos, percorrem do anodo para o catodo, gerando energia, convertendo assim energia química em energia elétrica (MONASTERIO et al., 2017).

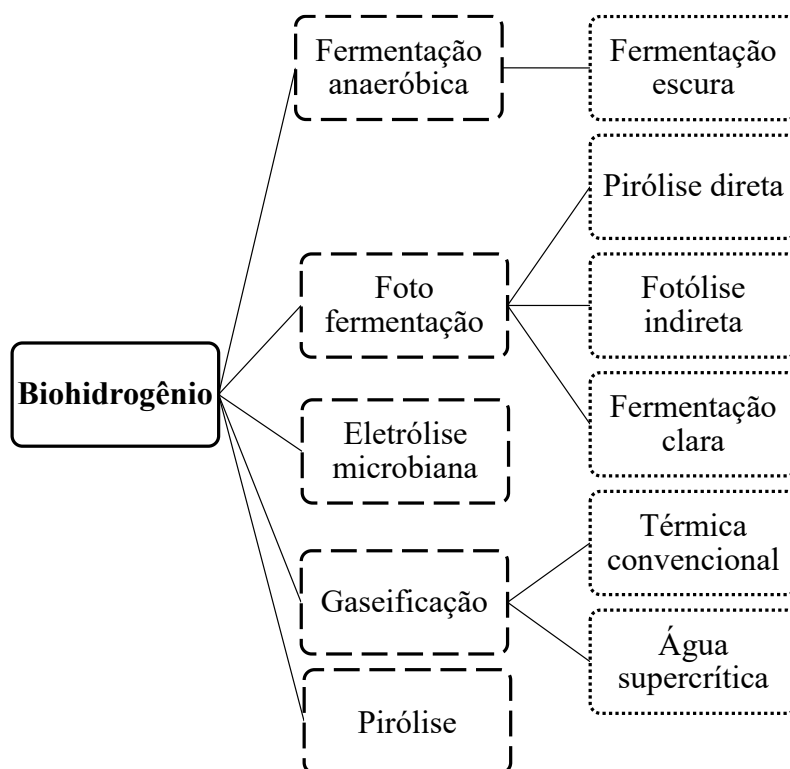


Figura 2.5. Metodologias para a produção de biohidrogênio por meio de microrganismos incluindo processos bioquímicos e processos termoquímicos de produção.

A produção do biohidrogênio por microrganismos ocorre por meio de autotrofia e heterotrofia e as reações químicas envolvidas nestes processos podem ser visualizadas na Figura 2.6. Na conversão autotrófica a energia solar é convertida em biohidrogênio diretamente pela fotossíntese, que ocorre semelhante a plantas superiores. Já na conversão heterotrófica substratos orgânicos são convertidos em biohidrogênio juntamente com a formação de outros compostos orgânicos menos complexos (GHIMIRE et al., 2015).

As vantagens e desvantagens de cada método variam de acordo com a sustentabilidade, a praticidade da tecnologia envolvida e com a eficiência energética do processo. Apesar do grande potencial de produção, as tecnologias utilizando microalgas ainda são objetos de investigação e necessitam de estudos em ampla escala. Na eletrólise microbiana a grande vantagem decorre da eficiência energética deste método em comparação com outros, além da grande disponibilidade de material intracelular, como por exemplo, de lipídios. Já a desvantagem decorre do fato da dificuldade de ampliação deste método em larga escala (MONASTERIO et al., 2017).

Na conversão bioquímica a desvantagem decorre do fato de ser um processo lento e com uma baixa conversão energética quando comparada a conversão termoquímica. Na conversão termoquímica por gaseificação são geralmente utilizados os métodos convencional e supercrítico. A desvantagem do método convencional se baseia na necessidade da máxima secagem da biomassa de microalga, gerando alto consumo de energia (AZIZ, 2014), o que não é necessário no método supercrítico, visto que a gaseificação é realizada em meio aquoso. Porém, na técnica de gaseificação supercrítica, também é necessário um alto consumo energético quando a biomassa de microalga é levada a um estado supercrítico (AZIZ, 2015).

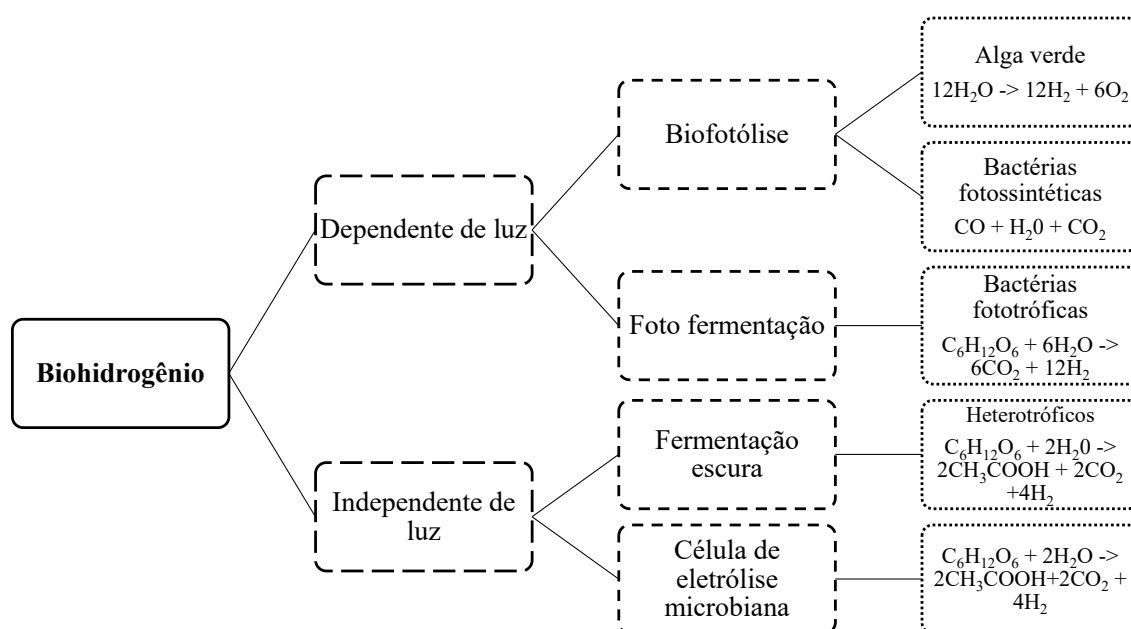


Figura 2.6. Esquematização das reações químicas envolvidas na produção de biohidrogênio a partir da presença e a da ausência de energia luminosa.

A biofotólise é caracterizada pela ação biológica por meio da energia luminosa em dissociar um substrato em hidrogênio e oxigênio, tem como vantagens a utilização de recursos naturais geralmente com maior disponibilidade no meio ambiente, como energia luminosa e água, porém se limita pela baixa produção do bicomcombustível (SINGH; DAS, 2018). Na fermentação no escuro o metabolismo microbiano não necessita gastar energia específica para transportar glicose para o interior da célula além de não gastar ATP para a produção de glicose-6-phosphate (SHOBANA et al., 2017).

2.2.3.2 Características relevantes

O hidrogênio que é produzido por meio de agentes biológicos, como microalgas e bactérias é conhecido como biohidrogênio. Estes microrganismos têm a capacidade de decompor matéria orgânica e transformá-la em dióxido de carbono e hidrogênio (CALLEGARI et al., 2019). A produção de hidrogênio por meio de microalgas é uma tecnologia promissora, visto os inúmeros benefícios e propriedades destes microrganismos, além requerer pequenas áreas para a produção da biomassa das microalgas, o que difere de outros combustíveis que necessitam de um grande espaço de área agriculturável (KRUSE; HANKAMER, 2010). As enzimas envolvidas no processo de produção do biohidrogênio são as hidrogenases e a nitrogenases. As hidrogenases utilizam prótons reduzindo-os para a produção de hidrogênio e as nitrogenases estão associadas na fixação de nitrogênio reduzindo este elemento em amônia (SINGH; DAS, 2018).

Na Tabela 2.4 são apresentados alguns trabalhos que utilizaram microalgas para a produção de biohidrogênio, por meio de diferentes processos e em diversos meios de cultivo, tanto sintéticos, como por exemplo meio BG-11, tanto como naturais, como por exemplo resíduo da indústria de amido.

Tabela 2. 4 Produtividade de biohidrogênio por diferentes espécies de microalgas.

Espécies de microalgas	Meio de cultivo	Condições de reação	Modo de cultura	Rendimento	Ref.
<i>Chlorococcum</i> sp.	BG-11	Fermentação anaeróbica de acetona-butanol	Mini-reatores	8,4 e 6,1 mmol L ⁻¹ de meio/dia	Chernova; Kiseleva, 2017
<i>Scenedesmus</i> sp.	TAP (com S)	Foto fermentação	Reator de vidro retangular	Máxima evolução de 17,72% v/v H ₂ do total de gases	Dasgupta et al. 2015
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	TAP	Foto fermentação	Foto biorreator Tubular	3121,5 ± 178,9 mL	Giannelli; Torzillo, 2012
<i>Gloeocystis</i> sp.	BG-11 sem de glicose	Condições de luz / Condições escuras	Frascos para septo / frascos de septo embrulhados em papel alumínio	346 µmol H ₂ (mg chl a h ⁻¹) ⁻¹ /108,5 µmol H ₂ (mg chl a h ⁻¹) ⁻¹	Junaid et al. 2019
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Pirólise (900 ° C e 4 Mpa)	Reator de fluxo confinado	88,01 vol%	Maliutina et al. 2018
<i>Scenedesmus</i> sp	Águas residuais de amido	Fermentação escura	Reatores onde o ar foi removido do espaço	1508,3 mL L ⁻¹	Ren et al. 2015

			superior pelo gás argônio		
<i>Scenedesmus</i> sp.	Pilha de milho (resíduos de biomassa agrícola)	Fermentação escura	Reator anaeróbico de sequenciamento descontínuo	811,1 mL L ⁻¹ d ⁻¹	Ren et al. 2019
<i>Chlorella</i> sp.	Glicerol bruto	Condições anaeróbicas	Frasco de soro / biorreator	10,31 ± 0,05 mL L ⁻¹ 11,65 ± 0,65 mL L ⁻¹	Sengemee et al. 2017

2.2.4 Outros biocombustíveis

Menos estudados, porém não menos importantes existem outros biocombustíveis obtidos a partir da biomassa microalgal.

2.2.4.1 Bio-óleo

O bio-óleo é produzido pela pirólise da biomassa microalgal, ele e o diesel têm características semelhantes, assim, o bio-óleo poderia substituir o diesel e resolver o problema conflito de demanda e oferta de combustível. Porém, o teor de oxigênio do bio-óleo de microalgas não é o mesmo que o diesel, o que restringe o uso industrial deste material. Portanto, para melhorar a sua qualidade o bio-óleo de microalgas precisa ser desoxigenado e torná-lo adequado para a indústria de combustíveis, assim Guo et al., (2019) utilizaram a hidróxido-calcinação CaO (HC CaO) para desoxigenar a pirólise bio-óleo de *Nannochloropsis* sp. de forma que os resultados indicaram que o HC CaO desoxigenou significativamente o bio-óleo, melhorando seu desempenho através da fixação direta de “intermediários ativos de quase-CO₂”.

2.2.4.2 Gás de combustão

A aplicação da tecnologia de microalgas para capturar CO₂ a partir de gases de combustão tem ganho atenção significativa. Embora não possa ser tratado como um método de mitigação de CO₂ a longo prazo (a menos que o CO₂ é armazenado), ainda é um método neutro em carbono, porque a quantidade de CO₂ liberado durante a combustão de biocombustíveis de algas não é superior ao CO₂ capturado durante o cultivo de algas (VUPPALADADIYAM, et al., 2018). Realizando uma revisão dos aspectos técnicos e a viabilidade da fixação combinada de carbono e o cultivo de microalgas para reutilização de carbono. Vuppaladadiyam et al. (2018) concluíram que a fixação do dióxido de carbono dos gases de combustão depende principalmente da cepa de microalgas selecionada e dos compostos dos gases de combustão/concentrações, e apesar das

inovações tecnológicas, a sua viabilidade para aplicação a nível comercial ainda exigem mais pesquisas.

2.2.4.3 Biometano

A digestão anaeróbica de microalgas para a produção de biometano tem grande potencial devido à sua facilidade de cultivo e baixa conteúdo de lignina. No entanto, segundo Bishop e Rahman, (2017) muitos obstáculos permanecem no caminho da expansão comercial, como alto consumo de água, qualidade / quantidade variável de produtos gasosos e fenômenos de inibição e para estes problemas serem superados, mais pesquisas são necessárias para a diversidade e função das bactérias e microalgas. Dentro do digestor e o desenvolvimento de uma abordagem robusta ao cultivo. Produzindo biometano por gaseificação hidrotérmica, Haiduc et al. (2009) descreveram um novo processo (SunCHem) onde os nutrientes, a água e o CO₂ produzidos são reciclados, de forma que os resultados confirmaram que o SunCHem é um processo promissor para produção eficiente de metano por gaseificação catalítica por HT da biomassa de microalgas, porém a economia do processo deve ser melhorada.

2.2.4.4 Bioeletricidade

A bioeletricidade pode ser gerada pelo uso de células combustíveis microbianas de microalgas fotossintéticas (PMMFC). Nesse sistema as microalgas atuam utilizando a luz (artificial ou natural) de maneira a gerar energia elétrica. Sendo assim, elas desempenham a função de biocatalisadores em reações de oxidação ou redução, podendo estar tanto no compartimento de ânodo como de cátodo (GOUVEIA et al., 2014; BADZAR et al., 2018; KUMAR et al., 2019).

2.2.4.5 Biocarvão

O biocarvão obtido por meio da biomassa de microalgas possui aproximadamente um tamanho de 10 a 100 µm com a porosidade em torno de 1 µm. O biocarvão pode ser produzido através do processo de pirólise ou pelo processo de combustão. No processo de pirólise para a obtenção de carvão ativado, o que determina o sucesso da técnica é o tempo e a temperatura empregada (MALIUTINA et al., 2018). A pirólise ocorre na ausência de oxigênio entre 350 a 700 °C. Uma das aplicações do carvão ativado é na utilização deste material como biofertilizante e como um sequestrante de dióxido de carbono da atmosfera (RIZWAN et al., 2018; EL-NAGGAR et al., 2019). Quando a

pirólise ocorre de forma rápida, há uma produção de biocarvão, porém com a geração de subprodutos, como bio-óleo, enquanto a pirólise que ocupa um tempo maior, acaba tendo um maior rendimento apenas do biocarvão (YU et al., 2017). No processo de carbonização, que é um processo químico da combustão, a biomassa de microalga passa por um processo de degradação térmica, que ocorre em temperaturas moderadas, levando assim maior tempo para que o processo esteja completo (RODRIGUES; BRAGHINI JUNIOR, 2019).

2.2.4.6 Biogás

O biogás é um dos produtos da decomposição da matéria orgânica. Para a produção de biogás pode ser utilizado como matéria-prima o carvão, resíduos agroindustriais, biomassa microalgal, coque de petróleo, entre outros (TORO et al., 2018). Dentre os processos para obtenção de biogás pode-se citar a gaseificação e a digestão anaeróbica. A obtenção de biogás por meio do processo de gaseificação envolve diversas etapas, como a alimentação do sistema de gaseificação com a biomassa de microalgas, com o aumento da temperatura até 1200 °C. Conforme a temperatura deste processo vai aumentando, a água vai evaporando, ocorrendo assim a oxidação parcial da biomassa, produzindo por fim o biogás, que neste processo também pode ser chamado de gás de síntese (PATINVOH et al., 2016). O biogás obtido por meio da digestão anaeróbica pode ser produzido com diferentes substratos, como por exemplo matéria orgânica e biomassa. Para que ocorra o processo de obtenção do biogás, reações químicas ocorrem em diferentes estágios, como por exemplo, a hidrólise, acidificação, produção de acetato e produção de metano. Deste processo químico, o biogás formado é composto por metano e dióxido de carbono (TORO et al., 2018). Porém pode ser encontrado demais traços de gases diferentes, como sulfeto de hidrogênio, amônia, hidrogênio, monóxido de carbono, entre outros.

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

2.3.1 Metabolismo microalgal

Cada condição de cultivo fornece diferentes fontes de nutrientes e fontes de energia, resultando na variação do conteúdo de carboidratos, lipídios, proteínas e da produtividade de biomassa. As microalgas apresentam diferentes formas de metabolismo energético, o metabolismo fotoautotrófico: utilizando a luz para produzir energia química através do processo de fotossíntese, por exemplo, a luz solar, como fonte de energia, e o

carbono inorgânico, por exemplo, o CO₂; o heterotrófico: quando a energia e o carbono são obtidos de fonte orgânica externa, em geral pela oxidação de açúcares; o mixotrófico: quando a fotossíntese e a oxidação de compostos orgânicos ocorrem concomitantemente e o fotoheterotrófico: quando a fonte de energia é a luz e a fonte de carbono são compostos orgânicos. Escolher qual a melhor condição para produção dependerá do objetivo do cultivo, bem como as características da microalga, afim de se alcançar maior teor do composto pretendido, à custa de menor produtividade de biomassa.

Tradicionalmente, o cultivo de microalgas tem explorado o seu metabolismo fotoautotrófico, no entanto estudos têm apontado vantagens da produção de biomassa por outras vias metabólicas. O conhecimento do metabolismo de cada espécie é relevante para otimizar a produção de compostos em grande escala, uma vez que estas vias metabólicas influenciam as características de crescimento, assim como os produtos a serem extraídos e conseqüentemente suas aplicações energéticas (AMARO et al., 2011; LIANG, 2013; ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

Microalgas em cultivo heterotrófico, não realizam fotossíntese, assim não necessitam de luz, apenas de uma fonte orgânica externa para obtenção de energia e carbono. No entanto, as microalgas fotoautotróficas também são capazes de oxidar compostos orgânicos, originados do processo interno de fotossíntese para obter energia, enquanto nas heterotróficas, o carbono orgânico é captado do meio externo (PEREZ-GARCIA et al, 2011).

Com rendimentos significativamente superiores aos do cultivo fotoautotrófico, o cultivo heterotrófico evita problemas associados à limitação de luz, utilizando o carbono orgânico tanto como fonte de energia quanto como fonte de carbono para a produção de biomassa (HUANG et al., 2010; LIANG, 2013). No entanto, é necessário que uma fonte de carbono seja adicionada ao meio. As fontes de carbono que mais têm sido utilizadas são: a glicose, o glicerol e o acetato, aplicadas nos cultivos heterotrófico e mixotrófico (FENG et al., 2011; ZHENG et al., 2012; ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

A entrada de carbono orgânico na célula, é umas das características mais determinantes para o metabolismo heterotrófico (AZMA et al., 2011). O uso de uma fonte de carbono orgânico possibilita a redução do custo do cultivo de microalgas, reutilizando excesso de nutrientes encontrados em ou águas residuais industriais ou domésticas, além do aspecto ambiental. Assim, alguns pesquisadores têm combinado o cultivo de microalgas com o tratamento de águas residuais, com excelente produção de lipídios e biomassa, como também a assimilação de alguns elementos. Utilizando as microalgas em

águas residuais de destilaria de álcool, Solovchenko et al. (2014) observaram um declínio de nitrato (95%), fosfato (77%) e sulfato (35%), além do aumento na composição de clorofila e ácidos graxos da biomassa das microalgas. Higgins et al. (2016) estudaram a co-cultura de microalgas com *Auxenochlorella protothecoides* e *Escherichia coli* em condições mixotróficas, o que levou ao aumento de 2-6 vezes no crescimento das microalgas, a duplicação do teor de lipídios, além de elevadas taxas de remoção de nutrientes; indicando o potencial de sua utilização no tratamento de águas residuais e de melhorar a produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

A concentração e a fonte de carbono utilizada no meio de cultivo influenciam a composição bioquímica da biomassa microalgal, Liang (2009) observaram em *Chlorella vulgaris* cultivada em meio com 1% de glicose: 44% de carboidratos, 21% lipídios, 32% proteínas e 3% cinzas; com 1% de acetato: 23% de carboidratos, 31% de lipídios, 42% de proteínas e 4% de cinzas; com 1% glicerol: 29% de carboidratos, 22% de lipídios, 45% de proteínas e 4% de cinzas; e com 2% de glicerol: 34% de carboidratos, 32% de lipídios, 30% de proteínas e 3% de cinzas. Assim a escolha da fonte de carbono para o meio de cultivo heterotrófico deve ser de acordo com o composto que se deseja obter.

Cultivando *Chlorella vulgaris* em meio heterotrófico e fotoautotrófico, Barros et al. (2019) observaram velocidades específicas máximas de crescimento de 1,24 e 1,28 d⁻¹. Os autores sugeriram uma solução para melhorar a expansão de microalgas, combinando dois modos de cultivo em uma produção eficiente em duas etapas, baseando-se no crescimento heterotrófico para obter alta concentração de inóculos para reatores que operam sob fotoautotrofia. Assim, os autores supracitados avaliaram inóculos de *C. vulgaris* cultivados heterotroficamente e fotoautotroficamente, e os utilizaram para semear *flat panel* (FP) de 1 m³, operados sob condições fotoautotróficas. Os inóculos cultivados heterotroficamente levaram a uma diminuição de 100 vezes no volume necessário para iniciar um FP, em comparação com os inóculos obtidos usando condições fotoautotróficas, sem qualquer atraso causado pela mudança metabólica para as novas condições tróficas.

Para *Chlorella sorokiniana* o melhor desempenho de crescimento foi obtido sob condições mixotróficas quando comparadas com as condições fotoautotróficas e heterotróficas a fonte de carbono foi a glicose com 4 g L⁻¹, apresentando uma taxa de crescimento específica (3,40 d⁻¹) e peso seco de biomassa (3,55 g L⁻¹) na cultura mixotrófica 1,8 e 2,4 vezes mais do que na cultura heterotrófica e 5,4 e 5,2 vezes mais sob a cultura fotoautotrófica. Quanto ao conteúdo lipídico, em cultivo mixotrófico houve

um aumento substancial, alcançando um teor lipídico de 45% em comparação com apenas 13% na cultura heterotrófica (LI et al., 2016).

Analisando o efeito da temperatura e da concentração de nitrogênio na produtividade lipídica em três diferentes microalgas; e estudando as respostas morfológicas, de crescimento, da composição bioquímica e fotossintética da microalga *Chlorella vulgaris*, Ördög et al. (2016) e Li et al. (2016), respectivamente, concluíram que para maximizar a produção de lipídios nas microalgas é essencial regular a oferta de nitrogênio, e ter conhecimento de que cada espécie responde de forma diferente aos suprimentos que recebe.

A comparação da produtividade dos diferentes sistemas de cultivo de microalgas, nem sempre é fácil, pois existe grande variação nas metodologias utilizadas para obtenção dos dados, bem como nas condições de cultivo. Observou-se que a adição de nutrientes no cultivo de microalgas, resulta em maior custo, as águas residuais são uma opção para tornar o cultivo mais econômico e sustentável, no entanto apenas algumas espécies sobrevivem nestas condições de cultivo. Cultivos heterotróficos e fotoautotróficos são os mais utilizados, de forma que o cultivo heterotrófico produz microalgas com lipídios mais elevados conteúdo, mas as microalgas são contaminadas facilmente, especialmente em sistemas de cultivo aberto, enquanto o cultivo fotoautotrófico é ecológico, mas o conteúdo lipídico produzido é baixo (CHEW et al., 2018).

2.3.2 Sistemas de cultivo microalgal

Vários sistemas são utilizados para a produção de microalgas, desde tanques abertos até biorreatores controlados. Cada sistema tem suas vantagens e desvantagens, com volumes diferentes de cultivo e características próprias. O controle da produção pode ser uma vantagem visto a otimização da produção, porém, a elevação de custos energéticos e operacionais acaba sendo menos atrativo, cabendo assim a escolha de cada sistema baseada nas necessidades intrínsecas de cada microrganismo utilizado, as condições climáticas da região e os custos que foram despendidos no sistema (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Os sistemas fechados, conhecidos como fotobiorreatores, possuem como característica o não contato direto com o ar atmosférico, o que permite o controle de diversas condições de cultivo, como temperatura, luminosidade, pH, quantidade de nutrientes e densidade celular, reduzindo assim o risco de contaminações (BITOG et al.,

2011). Geralmente este sistema é empregado para obtenção de produtos com maior valor agregado, como farmacêuticos e suplementação alimentar.

Os fotobiorreatores possuem diferentes configurações e entre elas pode-se citar: painel plano, tubular e/ou espiral. O fotobiorreator de painel plano constitui-se de duas placas de vidros transparentes dispostas de forma a retangular conectadas em cascata, podendo ser dispostas verticalmente e de forma inclinada (BITOG et al., 2011). Apresentando uma maior superfície de contato, o que permite uma maior luminosidade do cultivo, porém possui como uma desvantagem a possibilidade de formação de biofilme na superfície interna das placas de vidro (CHEW et al., 2018).

Estudando o cultivo da microalga *Geitlerinema* sp. em fotobiorreatores do tipo painel plano de 100 L em condições de cultivo não assépticas, Romero-Villegas et al. (2018) observaram que as microalgas alcançaram um resultado de 47,7 g m⁻² de biomassa seca, além da remoção de 82%, 85% e 100% de carbono, nitrogênio e fosforo, respectivamente, e identificaram na biomassa microalgal alta concentração de carboidratos, seguido de proteínas e lipídios.

Já os fotobiorreatores tubulares são uma série de tubos transparentes conectados entre si, que podem estar dispostos de forma inclinada, horizontal ou vertical, sendo dividido em colunas de bolhas e *airlift*, (DEMIREL et al., 2015). Na configuração do biorreator *airlift* ocorre introdução de CO₂, que por meio de uma agitação física, há o borbulhamento dentro do reator, realizando um transporte para a superfície do biorreator, quando chega na superfície o gás se desprende e volta para o fluxo do sistema (SINGH; SHARMA, 2012). *Cylindrotheca closterium* apresentou em biorreator *airlift* a produtividade 0,356 g L⁻¹ de biomassa e 7,364 mg L⁻¹ de lipídios de em meio F/2 (DEMIRLEL et al., 2015).

Nas colunas de bolhas a movimentação das bolhas é de forma aleatória, muitas vezes por meios mecânicos, enquanto o *airlift* possui um fluxo de bolhas cíclicas, geralmente o biorreator de coluna de bolhas possui o dobro de altura do diâmetro do cilindro, a luz é fornecida externamente e a movimentação das bolhas faz com haja uma maior mobilidade celular, aprimorando assim a fotossíntese (CHEW et al., 2018).

Sob condições naturais é realizado o cultivo de microalgas em sistemas abertos, com pouco ou até nenhum controle de condições de cultivo. Os tanques de cultivo são abertos, estando assim em contato com o ar atmosférico, porém apresentam um maior risco de contaminação externa. Geralmente os tanques utilizados são rasos, para que todo

o cultivo tenha maior eficiência na utilização da luminosidade (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Os sistemas abertos de produção de microalgas, geralmente do tipo *raceways*, foram desenvolvidos visando uma maior produção de biomassa microalgal com menor custo operacional. Porém, quando este cultivo está sendo realizado em ambientes externos, um fator que pode prejudicar a produção microalgal, ocasionar contaminação e alterar a composição bioquímica das células microalgais é a variação sazonal, de temperatura e condições de luminosidade (KUMAR et al., 2015; CHEW et al., 2018). Os sistemas abertos geralmente são aplicados para produção de biomassa microalgal com menor valor agregado, podendo ser aplicado na alimentação de organismos aquáticos, produção de biocombustíveis (HE et al., 2016), entre outros.

Realizando um cultivo em dois estágios da microalga *Chlorella vulgaris* Adesanya et al. (2014) combinaram fotobiorreatores tubulares do tipo *airlift* em um primeiro estágio e *raceways* em um segundo estágio. Neste estudo, os autores avaliaram o impacto ambiental do biodiesel produzido por meio das microalgas e de combustíveis fósseis. Assim, foi observado uma redução no potencial de aquecimento global de 76% e redução nos requisitos de energia fóssil de 75%. As microalgas *Chlorella* sp. ($5,15 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$; $4,06 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) e *Monoraphidium dybowskii* Y2 ($5,35 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$; $3,00 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) apresentaram uma produção lipídica diferente nos modos de alimentação semi-contínuo e no modo de batelada, revelando assim um maior rendimento lipídico no modo de alimentação semi-contínuo em *raceways ponds* de 40.000 L (HE et al., 2016).

Apesar de econômico e simples, o sistema aberto possui algumas desvantagens para o crescimento das algas, como a perda de evaporação que resulta em baixo rendimento produzido e contaminação no meio de cultura; enquanto que os fotobiorreatores são predominantemente projetados para cultivar algas em condições ideais que eliminam a maioria dos problemas encontrados no cultivo em sistema aberto (CHEW et al., 2018).

2.4 APLICAÇÃO COMERCIAL DESTAS TECNOLOGIAS

Uma das características mais marcantes e que atraem o interesse comercial em relação ao estudo e comercialização das microalgas, é sua capacidade de acumular diferentes compostos que por sua vez podem ser matéria prima de diferentes coprodutos de um processo produtivo (ZHAN et al., 2017). O conceito de biorrefinaria faz alusão a maximização do processo produtivo de forma a converter a biomassa microalgal em

diferentes materiais, ou seja, é uma forma de extrair diferentes produtos e matérias primas para diferentes aplicações, tendo como base neste caso a biomassa das microalgas (CHEN et al., 2019).

Dessa forma, a produção de biocombustíveis pode estar associada a outros processos, cujo objetivo é a geração de compostos de médio a alto valor agregado (antioxidantes, cosméticos, suplementos, entre outros) (CHIA et al., 2018). Além disso, é importante ressaltar que o mesmo deve ser integrado, seja fazendo o reuso da água, ou utilizando efluentes para o cultivo microalgal (DEPRÁ et al., 2018), o que irá reduzir os custos de produção, quanto ao suprimento de nutrientes, tornando o processo mais sustentável.

Sendo assim, no contexto da produção de biocombustíveis, para o processo ser economicamente viável as microalgas devem ser vistas como uma matéria prima versátil. Tal estratégia já vem sendo adotada por plantas pilotos e algumas companhias que já produzem biocombustível a partir de microalgas, como por exemplo Sapphire Energy Inc, Cellana Inc (CELLANA 2020; DICKINSON et al., 2017), que vem gerando como produtos o biocombustível, ração para aquicultura, e suplemento de ômega 3 a partir do cultivo de microalgas. A Cellana Inc, assim como a Sapphire Energy Inc, tem visado a produção de biocombustíveis bem como a produção de ração para a aquicultura e suplemento de ômega 3. Já a Algenol Biotech LLC, tem seu processo produtivo em biorreatores fechados voltado para a produção biocombustíveis, tais como etanol, biodiesel, bem como suplementação a base de microalgas e desenvolvimento de produtos de cuidados pessoais (ALGENOL 2020). A Joule Unlimited Inc, Synthetic Genomics Inc possuem o mesmo foco, voltado para a produção de biocombustível, fazendo uso de engenharia genética para a melhora das cepas (DICKINSON et al., 2017).

2.5 PERSPECTIVAS

Apesar dos problemas atualmente enfrentados na produção de microalgas, nenhuma barreira é definitiva ao futuro de produção de biocombustíveis de microalgas, uma vez que estão sendo desenvolvidas inovações de engenharia significativas para mitigar a demanda por recursos, além da análise de diversos métodos, que promovam o aumento da produção dos biocombustíveis a partir da biomassa microalgal. Sobre a contribuição futura dos biocombustíveis, Kagan e Bradford (2009) foram bem otimistas e estimaram que a matéria-prima de algas atingisse 37% (40 bilhões de galões) da produção total de biocombustíveis no mundo até 2022, enquanto outros autores acreditam

que esse valor possa ser de 6000 gal. / acre / ano produzidos por cultivo de microalgas e que esse valor possa ser aumentado para até 10.000 gal. / acre / ano se os fatores limitantes existentes forem bem abordados (TABATABAEI et al., 2011; WALTZ et al., 2009). Sabe-se que as microalgas são potencialmente uma forma sustentável de produzir biocombustíveis, necessitando apenas da adequação metodológica das tecnologias de produção para cada espécie, a fim de potencializar a geração do biocombustível que deseja obter.

2.6 REFERÊNCIAS

- Abe, J. O., Popoola, A. P. I., Ajenifuja, E., Popoola, O. M., 2019. Hydrogen energy, economy and storage: Review and recommendation. **International Journal Of Hydrogen Energy** ,44, 29, 15072–15086. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2019.04.068.
- Adesanya, V. O., Cadena, E., Scott, S. A., Smith, A. G., 2014. Life cycle assessment on microalgal biodiesel production using a hybrid cultivation system. **Bioresource Technology**, 163, 343–55. Doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.051.
- Algenol Biotech LLC, 2011. About Algenol. <http://www.algenol.com/>. Accessed 28 Jan 2020.
- Amaro, H. M., Guedes, A. C., Malcata, F. X., 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, 88, 3402–3410.
- 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**, 26, 83–90. Doi: 10.1007/s10811-013-0048-x.
- Aziz, M., Oda, T., Kashiwagi, T., 2014. Advanced energy harvesting from macroalgae-innovative integration of drying, gasification and combined cycle. **Energies** 7, 8217–8235. Doi: 10.3390/en7128217.
- Aziz, M., 2015. Integrated hydrogen production and power generation from microalgae. **International Journal Of Hydrogen Energy**, 41, 104–112. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.10.115.
- Bartley, M. L., Boeing, W. J., Dungan, B. N., Holguin, F. A., Schaub, T. 2014. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. **Journal Of Applied Phycology**, 26, 1431–1437. Doi: 10.1007/s10811-013-0177-2
- 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 methodology. **Biochemical Engineering Journal**, 53, 187–195. Doi: 10.1016/j.bej.2010.10.010.
- Barros, A., Pereira, H., Campos, J., Marques, A., Varela, J., Silva, J., 2019. Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae. **Scientific Reports**, 9, 13935. Doi: 10.1038/s41598-019-50206-z.

- Batista, F. R. M., Lucchesi, K. W., Carareto, N. D. D., Costa, M. C. D., Meirelles, A. J. A., 2018. Properties of microalgae oil from the species *Chlorella protothecoides* and its ethylic biodiesel. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, 35, 1383–1394. Doi: 10.1590/0104-6632.20180354s20170191
- Bazdar, E., Roshandel, R., Yaghmaei, S., Mardanpour, M. M., 2018. The effect of different light intensities and light/dark regimes on the performance of photosynthetic microalgae microbial fuel cell. **Bioresource Technology**, 261, 350–360. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.04.026.
- Belotti, G., Bravi, M., de Caprariis, B., de Filippis, P., Scarsella, M., 2013. Effect of nitrogen and phosphorus starvations on *Chlorella vulgaris* lipids productivity and quality under different trophic regimens for biodiesel production. **American Journal Of Plant Sciences** 4, 44–51. Doi: 10.4236/ajps.2013.412A2006
- Bishop, T., Rahman, P. 2017. The production of biomethane from the anaerobic digestion of microalgae: Production technologies for biofuels. **Advances In Biofeedstocks And Biofuels**, 177-200. Doi: 10.1002/9781119117551.ch7.
- Bitog, J. P., Lee, I. -B., Lee, C. -G., Kim, K. -S., Hwang, H. -S., Hong, S. -W., Mostafa, E., 2011. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. **Computers And Electronics In Agriculture**, 76, 131–147. Doi:10.1016/j.compag.2011.01.015
- Brennan, L., Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, 14, 557–577. Doi: 10.1016/j.rser.2009.10.009.
- Buono, S., Langellotti, A. L., Martello, A., Rinna, F., Fogliano, V., 2014. Functional ingredients from microalgae. **Food & Function**, 5, 1669-1685.
- Callegari, A., Bolognesi, S., Ceconet, D., Capodaglio, A. G., 2020. Production technologies, current role, and future prospects of biofuels feedstocks: A state-of-the-art review. **Critical Reviews In Environmental Science And Technology** 50, 384–436. Doi: 10.1080/10643389.2019.1629801.
- Cazzaniga, S., Dall'osto, L., Szaub, J., Scibilia, L., Ballottari, M., Purton, S. E., Bassi, R., 2014. Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology For Biofuels**, 7, 157. Doi: 10.1186/s13068-014-0157-z.
- Cellana Inc. 2015. Alduo technology. <http://cellana.com/technology/core-technology/>. Accessed 28 Jan 2020.
- Chandra, R., Iqbal, H. M. N., Vishal, G., Lee, H. S., Nagra, S., 2019. Algal biorefinery: A sustainable approach to valorize algal-based biomass towards multiple product recovery. **Bioresource Technology**, 278, 346–359. Doi: 10.1016/j.biortech.2019.01.104.
- Chen, H., Li, T., Wang, Q., 2019. Ten years of algal biofuel and bioproducts: gains and pains. **Planta**, 249, 195-219. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3066-8>.
- Chernova, N. I., Kiseleva, S. V., 2017. Microalgae biofuels: Induction of lipid synthesis for biodiesel production and biomass residues into hydrogen conversion. **International Journal Of Hydrogen Energy**, 42, 2861–2867. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.05.302.

- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., Chang, J. -S., 2018. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, 91, 332–344. Doi: 10.1016/j.jtice.2018.05.039.
- Chia, S. R., Chew, K. W., Show, P. L., Yap, Y. J., Ong, H. C., Ling, T. C., Chang, J. S., 2018. Analysis of economic and environmental aspects of microalgae biorefinery for biofuels production: a review. **Biotechnology Journal**, 13, 1700618. Doi: 10.1002/biot.201700618.
- Chng, L. M., Lee, K. T., Chan, D. J. C., 2017. Synergistic effect of pretreatment and fermentation process on carbohydrate-rich *Scenedesmus dimorphus* for bioethanol production, **Energy Conversion And Management** 141, 410–419.
- Dasgupta, C. N., Suseela, M. R., Mandotra, S. K., Kumar, P., Pandey, M. K., Toppo, K., Lone, J. A., 2015. Dual uses of microalgal biomass: an integrative approach for biohydrogen and biodiesel production. **Applied Energy**, 146, 202–208. Doi: 10.1016/j.apenergy.2015.01.070.
- Demirbas, A., 2009. Biorefineries: Current activities and future developments. **Energy Conversion And Management**, 50, 11, 2782–2801. Doi: 10.1016/j.enconman.2009.06.035.
- Demirel, Z., Imamoglu, E., Conk Dalay, M., 2015. Fatty acid profile and lipid content of *Cylindrotheca Closterium* cultivated in air-lift photobioreactor. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, 90, 2290–2296. Doi:10.1002/jctb.4687
- Deprá, M. C., dos Santos, A. M., Severo, I. A., Santos, A. B., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E. 2018. Microalgal biorefineries for bioenergy production: can we move from concept to industrial reality? **BioEnergy Research**, 11, 727–747. Doi: 10.1007/s12155-018-9934-z
- Dickinson, S., Mientus, M., Frey, D., Amini-Hajibashi, A., Ozturk, S., Shaikh, F., El-Halwagi, M. M. 2017. A review of biodiesel production from microalgae. **Clean Technologies And Environmental Policy**, 19, 637–668. Doi: 10.1007/s10098-016-1309-6.
- Doan, Q. C., Moheimani, N. R., Mastrangelo, A. J., Lewis, D. M., 2012. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus. **Biomass And Bioenergy**, 46, 79-88. Doi: 10.1016/j.biombioe.2012.08.022.
- Doan, Y., Sivaloganathan, B., Obbard, J., 2011. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. **Biomass And Bioenergy**, 35, 2534–2544. Doi: 10.1016/j.biombioe.2011.02.021.
- Dutta, K., Daverey, A., Lin, J. G., 2014. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. **Renewable Energy**, 69, 114–122. Doi: 10.1016/j.renene.2014.02.044.
- El-Naggar, A., Lee, S. S., Rinklebe, J., Farooq, M., Song, H., Sarmah, A. K., Zimmerman, A. R., Ahmad, M., Shaheen, S. M., Ok, Y. S., 2019. Biochar application to low fertility soils: a review of current status, and future prospects. **Geoderma**, 337, 536–554. Doi: 10.1016/j.geoderma.2018.09.034.

- Escorsim, A., Rocha, G., Vargas, J., Mariano, A., Pereira Ramos, L., Corazza, M.; Cordeiro, C. 2017. Extraction of *Acutodesmus obliquus* lipids using a mixture of ethanol and hexane as solvent. **Biomass And Bioenergy**, 108, 470–478. Doi: 10.1016/j.biombioe.2017.10.035.
- Feng, Y., Li, C., Zhang, D., 2011. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, 102, 101–105. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.016
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., Esposito, G., 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, 144, 73–95. Doi: 10.1016/j.apenergy.2015.01.045.
- Ghosh, S., Banerjee, S., Das, D., 2017. Process intensification of biodiesel production from *Chlorella* sp. MJ 11/11 by single step transesterification. **Algal Research**, 27, 12–20. Doi: 20. 10.1016/j.algal.2017.08.021.
- Giannelli, L., Torzillo, G., 2012. Hydrogen production with the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* grown in a compact tubular photobioreactor immersed in a scattering light nanoparticle suspension. **International Journal Of Hydrogen Energy**, 37, 22, 16951–16961. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.08.103.
- Goh, B. H. H., Ong, H. C., Cheah, M. Y., Chen, W. H., Yu, K. L., Mahlia, T. M. I., 2019. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review, **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, 107, 59–74, Doi: 10.1016/j.rser.2019.02.012.
- Gouveia, L., Neves, C., Sebastião, D., Nobre, B. P., Matos, C. T., 2014. Effect of light on the production of bioelectricity and added-value microalgae biomass in a photosynthetic alga microbial fuel cell. **Bioresource Technology**, 154, 171–177. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.12.049.
- Greenwell, H. C., Laurens, L. M. L., Shields, R. J., Lovitt, R. W., Flynn, K. J., J. R., 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal Of The Royal Society, Interface The Royal Society**, 7, 703–726. Doi: 10.1098/rsif.2009.0322.
- Gumbyte, M., Makareviciene, V., Skorupskaite, V., Sendzikiene, E.; Kondratavicius, M. 2018. Enzymatic microalgae oil transesterification with ethanol in mineral diesel fuel media. **Renewable Sustainable Energy**, 10, 013105. Doi: 10.1063/1.5012939
- Guo, Q., Yang, L., Wang, K., Xu, X., Wu, M., Zhang, X., 2019. Effect of hydration-calcination CaO on the deoxygenation of bio-oil from pyrolysis of *Nannochloropsis* sp., **International Journal Of Green Energy**, 16:14, 1179–1188, Doi 10.1080/15435075.2019.1671393
- Haiduc, A. G., Brandenberger, M., Suquet, S., Vogel, F., Bernier-Latmani, R., Ludwig, C., 2009. SunCHem: an integrated process for the hydrothermal production of methane from microalgae and CO₂ mitigation. **Journal Of Applied Phycology**, 21, 529–541. Doi:10.1007/s10811-009-9403-3
- Hallenbeck, P., 2005. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. **Water Science & Technology** 52, 21–29. Doi: 10.2166/wst.2005.0494

- Harun, R., Danquah, M. K., 2011. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, 168, 1079–1084. Doi: 10.1016/j.cej.2011.01.088.
- He, Q., Yang, H., Hu, C., 2016. Culture modes and financial evaluation of two oleaginous microalgae for biodiesel production in desert area with open raceway pond. **Bioresource Technology**, 218, 571–579. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.137
- Higgins, B. T., Gennity, I., Samra, S., Kind, T., Fiehn, O., Vanderghaynst, J. S., 2016. Cofactor symbiosis for enhanced algal growth, biofuel production, and wastewater treatment. **Algal Research**, 17, 308–315. Doi: 10.1016/j.algal.2016.05.024.
- Ho, S. H., Chen, C. Y., Chang, J. S., 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, 113, 244–252. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.133.
- Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J. S., 2013a. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, 135, 191–198. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.015.
- Ho, S. H., Kondo, A., Hasunuma, T., Chang, J. S., 2013b. Engineering strategies for improving the CO₂ fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation. **Bioresource Technology**, 143, 163–171. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.043.
- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., Chen, G., 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, 87, 38–46. Doi: 10.1016/j.apenergy.2009.06.016.
- Islam, M. A., Ayoko, G., Brown, R., Stuart, D., Heimann, K., 2013. Influence of fatty acid structure on fuel properties of algae derived biodiesel. **Procedia Engineering**, 56, 591–596. Doi:10.1016/j.proeng.2013.03.164.
- Jazzar, S., Olivares C. p., De los Ríos, A., Marzouki, M. N., Acien, G., Fernandez-Sevilla, J. M., Molina-Grima, E., Issam, S., Quesada-Medina, J., 2015 Direct supercritical methanolysis of wet and dry unwashed marine microalgae (*Nannochloropsis gaditana*) to biodiesel. **Applied Energy**, 148, 210–219. Doi:10.1016/j.apenergy.2015.03.069.
- Junaid, S., Khanna, N., Lindblad, P., Ahmed, M., 2019. Multifaceted biofuel production by microalgal isolates from Pakistan. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, 13, 1187–1201. Doi: 10.1002/bbb.2009.
- Kagan, J., Bradford, T. 2009. **Biofuels 2010: Spotting the Next Wave**, The Prometheus Institute.
- Khan, M. I., Lee, M. G., Shin, J. H., Kim, J. D., 2017. Pretreatment optimization of the biomass of *Microcystis aeruginosa* for efficient bioethanol production. **AMB Express**, 7, 19. Doi: 10.1186/s13568-016-0320-y.
- Khosravitar, F., 2019. Microalgal biohydrogen photoproduction: scaling up challenges and the ways forward. **Journal Of Applied Phycology**, 1–13. Doi: 10.1007/s10811-019-01911-9.

- Kim, H. M., Oh, C. H., Bae, H. J., 2017. Comparison of red microalgae (*Porphyridium cruentum*) culture conditions for bioethanol production. **Bioresource Technology**, 233, 44–50. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.02.040.
- Kim, K. H., Choi, I. S., Kim, H. M., Wi, S. G., Bae, H. J., 2014. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. **Bioresource Technology** 153, 47–54. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.059.
- Kruse, O., Hankamer, B., 2010. Microalgal hydrogen production. **Current Opinion In Biotechnology**, 21, 238–243. Doi: 10.1016/j.copbio.2010.03.012.
- Kumar, M., Sharma, M. P., 2014. Potential assessment of microalgal oils for biodiesel production: A review. **Journal Of Materials And Environmental Science**, 5, 757–766.
- Kumar, S. S., Basu, S., Gupta, S., Sharma, J., Bishnoi, N. R., 2019. Bioelectricity generation using sulphate-reducing bacteria as anodic and microalgae as cathodic biocatalysts. **Biofuels**, 10, 81–86. Doi: 10.1080/17597269.2018.1426161.
- Lakatos, G. E., Ranglová, K., Manoel, J. C., Grivalský, T., Kopecký, J., Masojídek, J., 2019. Bioethanol production from microalgae polysaccharides. **Folia Microbiologica**, 1–18. Doi: 10.1007/s12223-019-00732-0.
- Lee, O. K., Seong, D. H., Lee, C. G., Lee, E. Y., 2015. Sustainable production of liquid biofuels from renewable microalgae biomass. **Journal Of Industrial And Engineering Chemistry**, 29, 24–31. Doi: 10.1016/j.jiec.2015.04.016.
- Li, T., Xu, J., Gao, B., Xiang, W., Li, A., Zhang, C., 2016. Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) under low and high nitrogen supplies. **Algal Research**, 16, 481–491. Doi: 10.1016/j.algal.2016.04.008.
- Liang, Y., 2013. Production liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. **Applied Energy**, 104, 860–868. Doi: 10.1016/j.apenergy.2012.10.067.
- Lim, D. K. Y.; Schenk, P. M. 2017. Microalgae selection and improvement as oil crops: GM vs non-GM strain engineering. **AIMS Bioengineering**, 4, 151–161. Doi: 10.3934/bioeng.2017.1.151.
- Makareviciene, V., Gumbytė, M., Sendzikiene, E., 2019. Simultaneous extraction of microalgae *Ankistrodesmus* sp. oil and enzymatic transesterification with ethanol in the mineral diesel medium. **Food & Bioproducts Processing: Transactions Of The Institution Of Chemical Engineers Part C**, 116, 89–97. Doi: 10.1016/j.fbp.2019.05.002.
- Maliutina, K., Tahmasebi, A., Yu, J., 2018. Pressurized entrained-flow pyrolysis of microalgae: Enhanced production of hydrogen and nitrogen-containing compounds. **Bioresource Technology**, 256, 160–169. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.016.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, 14, 217–232. Doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020.
- Menegazzo, M. L., Fonseca, G. G., 2019. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, 107, 87–107. Doi: 10.1016/j.rser.2019.01.064.

- Monasterio, S., Mascia, M., Lorenzo, M. D., 2017. Electrochemical removal of microalgae with an integrated electrolysis-microbial fuel cell closed-loop system. **Separation And Purification Technology**, 183, 373–381. Doi: 10.1016/j.seppur.2017.03.057.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimaraes, P. M. R., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L., & Teixeira, J. A. 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production-R1. **Biotechnology Advances**, 28, 6, 817–830. Doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.001.
- Nadhirah, N.A., Islam, A. K. M. A., Anuar, N., Yaakob, Z., 2018. Genetic improvement and challenges for cultivation of microalgae for biodiesel: A review. **Mini-Reviews In Organic Chemistry**, 16, 277–289. Doi: 10.2174/1570193X15666180627115502.
- Nascimento, I., Marques, S., Teles, I., Pereira, S., Druzian, J., Oliveira de Souza, C., Vich, D., Carvalho, G., Nascimento, M., 2012. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **BioEnergy Research**, 6, 1–13. Doi:10.1007/s12155-012-9222-2.
- Nascimento, V. M., Nascimento, K. M., Fonseca, G. G., 2020. Biotechnological potential of *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus spinosus* and *Scenedesmus acuminatus*. **Acta Alimentaria**, 49, 154–162. Doi: 10.1556/066.2020.49.2.4.
- Nasir, N. A. N., Aminul Islam, A. K. M., Anuar, N., Yaakob, Z. 2019. Genetic improvement and challenges for cultivation of microalgae for biodiesel: A review. **Mini-Reviews In Organic Chemistry**, 16, 277–289. Doi: 10.2174/1570193X15666180627115502.
- Ohse, S., Derner, R., Ozório, R., Corrêa, R., Badiale-Furlong, E., Cunha, P., 2015. Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. **Idesia (Arica)**, 33, 93–101. Doi: 10.4067/S0718-34292015000100010.
- Onay, M., 2019. Bioethanol production via different saccharification strategies from *H. tetracontoma* ME03 grown at various concentrations of municipal wastewater in a flat-photobioreactor. **Fuel** 239, 1315–1323. Doi: 10.1016/j.fuel.2018.11.126.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Aremu, A. O., Okem, A., Lovász, C., ... van Staden, J., 2016. Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains. **Algal Research**, 16, 141–149. Doi: 10.1016/j.algal.2016.03.001.
- Park, S., Nguyen, T. H. T., Jin, E., 2019. Improving lipid production by strain development in microalgae: Strategies, challenges and perspectives. **Bioresource Technology**, 292, 121953. Doi: 10.1016/j.biortech.2019.121953.
- Patinvoh, R.J., Osadolor, O.A., Chandolias, K., Horváth, I.S., Taherzadeh, M.J., 2016. Innovative pretreatment strategies for biogas production. **Bioresource Technology**, 224, 13–24. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.083.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, 45, 11–36. Doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037.
- Phwan, C. K., Chew, K. W., Sebayang, A. H., Ong, H. C., Ling, T. C., Malek, M. A., Show, P. L., 2019. Effects of acids pre-treatment on the microbial fermentation process

for bioethanol production from microalgae. **Biotechnology For Biofuels**, 12, 191. Doi: 10.1186/s13068-019-1533-5.

Phwan, C. K., Ong, H. C., Chen, W. H., Ling, T. C., Ng, E. P., Show, P. L., 2018. Overview: Comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. **Energy Conversion And Management**, 173, 81–94. Doi: 10.1016/j.enconman.2018.07.054.

Rahman, M. A., Aziz, M. A., Al-khulaidi, R. A., Sakib, N., Islam, M., 2017. Biodiesel production from microalgae *Spirulina maxima* by two step process: Optimization of process variable. **Journal Of Radiation Research And Applied Sciences**, 10, 140–147. Doi:10.1016/j.jrras.2017.02.004

Ren, H. Y., Kong, F., Zhao, L., Ren, N. -Q., Ma, J., Nan, J., Liu, B. -F., 2019. Enhanced co-production of biohydrogen and algal lipids from agricultural biomass residues in long-term operation. **Bioresource Technology**, 289, 121774. Doi: 10.1016/j.biortech.2019.121774.

Ren, H. Y., Liu, B. F., Kong, F., Zhao, L. Ren, N., 2015. Hydrogen and lipid production from starch wastewater by co-culture of anaerobic sludge and oleaginous microalgae with simultaneous COD, nitrogen and phosphorus removal. **Water Research**, 85, 404–412. Doi: 10.1016/j.watres.2015.08.057.

Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S.A., Lee, K., Rashid, N., 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, 92, 394–404. Doi: 10.1016/j.rser.2018.04.034.

Rodrigues, T., Braghini Junior, A., 2019. Charcoal: a discussion on carbonization kilns. **Journal Of Analytical And Applied Pyrolysis**, 104670. Doi: 10.1016/j.jaap.2019.104670.

Romero-Villegas, G. I., Fiamengo, M., Acién Fernández, F. G., Molina Grima, E., 2018. Utilization of centrate for the outdoor production of marine microalgae at pilot-scale in flat-panel photobioreactors. **Journal Of Biotechnology**, 284, 102–114. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.08.006.

Saratale, G.D., Saratale, R.G., Banu, J.R., Chang, J.-S., 2019. Biohydrogen production from renewable biomass resources. **In: Biohydrogen**. Elsevier, 247–277. Doi: 10.1016/B978-0-444-64203-5.00010-1.

Sengmee, D., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., Prasertsan, P., 2016. Biophotolysis-based hydrogen and lipid production by oleaginous microalgae using crude glycerol as exogenous carbon source. **International Journal Of Hydrogen Energy**, 42, 1971–1976. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.10.089.

Sharma, K. K., Schuhmann, H., Schenk, P. M., 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, 5, 5, 1532–1553. Doi: 10.3390/en5051532.

Shekh, A. Y., Shrivastava, P., Gupta, A., Krishnamurthi, K., Devi, S. S., Mudliar S. N., 2015. Biomass and lipid enhancement in *Chlorella* sp. with emphasis on biodiesel quality assessment through detailed FAME signature. **Bioresource Technology**, 201, 276–286. Doi:10.1016/j.biortech.2015.11.058.

- Shobana, S., Saratale, G. D., Pugazhendhi, A., Arvindnarayan, S., Periyasamy, S., Kumar, G., Kim, S. -H., 2017. Fermentative hydrogen production from mixed and pure microalgae biomass: Key challenges and possible opportunities. **International Journal Of Hydrogen Energy**, 42, 26440–26453. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2017.07.050.
- Show, K. Y., Yan, Y., Zong, C., Guo, N., Chang, J. S., Lee, D. J., 2019. State of the art and challenges of biohydrogen from microalgae. **Bioresource Technology**, 289, 121747. Doi: 10.1016/j.biortech.2019.121747.
- Silva, A. A., Fonseca, G. G., 2020. Influence of luminosity, carbon source, and concentration of salts in the physiology of *Chlorella sorokiniana*. **Environmental Technology**, 41, 719–729. Doi: 10.1080/09593330.2018.1509889.
- Singh, H., Das, D., 2018. Biofuels from microalgae: biohydrogen. **Cham: Springer**, 201–228. Doi: 10.1007/978-3-319-69093-3_10.
- Singh, R. N., Sharma, S., 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production - A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, 16, 2347–2353. Doi: 10.1016/j.rser.2012.01.026.
- Solovchenko, A., Pogosyan, S. I., Chivkunova, O. B., Selyakh, I., 2014. Phycoremediation of alcohol distillery wastewater with a novel *Chlorella sorokiniana* strain cultivated in a photobioreactor monitored on-line via chlorophyll fluorescence. **Algal Research**, 6, 234–241. Doi: 10.1016/j.algal.2014.01.002.
- Suyono, E. A., Haryadi, W., Zusron, M., Nuhamunada, M., Rahayu, S., Nugroho, P., 2015. The effect of salinity on growth, dry weight and lipid content of the mixed microalgae culture isolated from Glagah as biodiesel substrate. **Journal Of Life Sciences**, 9, 229–233. Doi: 10.17265/1934-7391/2015.05.006.
- Szwaja, S., Grab-Rogalinski, K., 2009. Hydrogen combustion in a compression ignition diesel engine. **Internacional Journal Of Hydrogen Energy**, 34, 4413–4421. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.03.020.
- Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Jouzani, G. S., Safarnejad, M., Pazouki, M., 2011. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: future of bioenergy in Iran. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, 15, 1918–1927. Doi: 10.1016/j.rser.2010.12.004.
- Talebi, A. F., Mohtashami, S.K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Mirzaei, H. H., Mirzajanzadeh, M., Shafaroudi, S. M., Bakhtiari, S., 2013. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, 2, 258–267. Doi: 10.1016/j.algal.2013.04.003.
- Toro, J.C.S., Pérez, Y.C., Alzate, C.A.C., 2018. Evaluation of biogas and syngas as energy vectors for heat and power generation using lignocellulosic biomass as raw material. **Electronic Journal Of Biotechnology**, 33. Doi.: 10.1016/j.ejbt.2018.03.005.
- Torres, S., Acien, G., García-Cuadra, F., Navia, R., 2017. Direct transesterification of microalgae biomass and biodiesel refining with vacuum distillation. **Algal Research**, 28, 30. Doi: 10.1016/j.algal.2017.10.001.
- Velasquez-Orta, S.B., Lee, J.G.M., Harvey, A., 2012. Alkaline *in situ* transesterification of *Chlorella vulgaris*. **Fuel**, 94, 544–550. Doi: 10.1016/j.fuel.2011.11.045.

- Vuppaladadiyam, A. K., Yao, J. G., Florin, N., George, A., Wang, X., Labeeuw, L., ... Zhao, M., 2018 Impact of flue gas compounds on microalgae and mechanisms for carbon assimilation and utilization. **ChemSusChem**, 11, 334–355. Doi:10.1002/cssc.201701611.
- Wahlen, B., Willis, R.; Seefeldt, L. 2011. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, 102, 2724–2730. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.11.026.
- Waltz, E. 2009, Biotech's green gold? **Nature Biotechnology**, 27, 15–18. Doi: 10.1038/nbt0109-15
- Xu L., Wim Brilman, D. W., Withag, J. A., Brem, G., Kersten, S., 2011. Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: energy balance analysis. **Bioresource Technology** 102, 5113-5122. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.066
- Xue, J., Niu, Y. F., Huang, T., Yang, W. D., Liu, J. S., Li, H. Y., 2015. Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation. **Metabolic Engineering**, 27, 1–9. Doi: 10.1016/j.ymben.2014. 10.002
- Yu, K.L., Show, P.L., Ong, H.C., Ling, T.C., Chi-Wei Lan, J., Chen, W.-H., Chang, J.-S., 2017. Microalgae from wastewater treatment to biochar – Feedstock preparation and conversion technologies. **Energy Conversion And Management**, 150, 1–13. Doi: 10.1016/j.enconman.2017.07.060.
- Zhan, J., Rong, J., Wang, Q. 2017. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. **International Journal Of Hydrogen Energy**, 42, 8505–8517. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.12.021.
- Zheng, Y., Chi, Z., Lucker, B., Chen, S., 2012. Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, 103, 484-488. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.09.122.
- Zhou, N., Zhang, Y., Wu, X., Gong, X., Wang, Q., 2011. Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂. **Bioresource Technology**, 102, 10158–10161. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.08.051.

CAPÍTULO 3

CLARIFICAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum*)

RESUMO: A disposição final da vinhaça da produção sucroenergética tem gerado grandes preocupações para adequação do setor na agenda da sustentabilidade. Com a produção contínua e crescente de álcool e açúcar, a fertirrigação como alternativa final para a vinhaça torna-se insuficiente. Neste contexto, o aproveitamento dos micros e macronutrientes presentes na vinhaça para a suplementação de meios de cultivo para o crescimento de microalgas pode se tornar uma técnica viável economicamente e ambientalmente. No entanto, a concentração utilizada de vinhaça nos estudos ainda é muito baixa em decorrência principalmente da sua cor e turbidez elevadas. Assim, o objetivo deste trabalho é determinar formas alternativas para clarificação da vinhaça resultante da destilação fracionada do caldo de cana-de-açúcar. Para tal, foram utilizados compostos comerciais: 1) tanfloc MT, 2) polímero Praestol Solenis 2530; compostos químicos 3) cloreto de ferro III (FeCl_3) 4) sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)$) 5) hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e floculantes alternativos naturais 6) semente de *Moringa oleifera*; 7) semente de *Moringa oleifera*+ carvão ativado e 8) carvão ativado. A vinhaça foi também diluída em água destilada nas concentrações de 10%, 25%, 40% e 50% de vinhaça para avaliação. Foi avaliada a redução de cor e turbidez da vinhaça, submetida aos processos de clarificação. Como produto alternativo a semente de *Moringa oleifera* + filtro de vidro foi eficiente na clarificação da vinhaça com maior percentual de redução de cor e turbidez obtido utilizando 30 g.L⁻¹ de semente, com 68, 92% e 78,78% de redução, respectivamente. Dessa forma, não há razão para se desperdiçar a vinhaça, seja descartando ou armazenando-a, já que devidamente tratada, a sua utilização como fonte de nutrientes para o cultivo microalgal poderá ser uma alternativa.

Palavras-chave: cor, turbidez, clarificantes, tanfloc MT, hidróxido de cálcio, *Moringa oleifera*.

3.1 INTRODUÇÃO

A indústria sucroenergética é responsável pela produção do etanol e do açúcar, por meio de matérias primas de origem celulósicas (cana-de-açúcar) e neste processo acaba gerando resíduos líquidos, sólidos e gasosos, além de subprodutos de valor agregado para outras cadeias produtivas. Dentre os resíduos gerados, a vinhaça apresenta um volume relativamente elevado, considerando a taxa de geração de vinhaça normalmente utilizada de 12 litros de vinhaça por litro de etanol produzido, estima-se, para 2030, um volume de aproximadamente 540 bilhões de litros de vinhaça por ano (UNICA, 2019). Esse rejeito industrial acaba se tornando um grande desafio e despendendo grandes esforços do setor para o seu armazenamento e disposição final.

A vinhaça da cana-de-açúcar constitui em um caldo fermentado sem álcool e com alguns sólidos orgânicos em suspensão, bem como minerais, açúcar residual e alguns compostos voláteis (SYDNEY et al., 2019). Estes materiais orgânicos e inorgânicos presentes na vinhaça geralmente apresentam-se concentrações acima da capacidade de suporte de ambientes aquáticos e terrestres, exigindo muita cautela na sua correta disposição.

Este efluente apresenta baixo pH e alta demanda química e bioquímica de oxigênio, não podendo ser descartado diretamente em ambientes aquáticos por ser considerado um poluente (CORTEZ et al., 2014). O descarte inadequado e indiscriminado da vinhaça de cana-de-açúcar no solo e nos corpos d'água tem recebido muita atenção há décadas, devido aos problemas ambientais associados a essa prática (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

A legislação ambiental federal, bem como as resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA estabelecem normas para o descarte de efluentes industriais, porém os resíduos são tratados de forma genérica. A maior parte das empresas idôneas e regulamentadas segue, no âmbito nacional, a resolução nº 430 de 2011 do CONAMA, a qual classifica os corpos de água traça, estabelece condições para o lançamento de efluentes industriais e outras diretrizes ambientais (CONAMA, 2011).

Visando suprir as deficiências da Federação no regramento jurídico referente à destinação dos efluentes da indústria sucroenergética, alguns estados propuseram seus próprios regulamentos, sendo São Paulo o ente federativo que construiu a maior e mais complexo normativa sobre o tratamento e disposição da vinhaça (FERNANDES FILHO; ARAUJO, 2016). A norma técnica P 4.231 da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) estabelece os critérios e procedimentos para o armazenamento,

transporte e aplicação da vinhaça gerada pela atividade sucroenergética no processamento de cana-de-açúcar (CETESB, 2015). No entanto, quanto a penalidade para o descarte inadequado, há somente uma ação corretiva da CETESB, aprovada pela decisão N° 103/2007/C/E, de 22 de junho de 2007, àqueles que não cumprirem os procedimentos para gerenciamento de áreas contaminadas, que incluem a elaboração de planilhas para avaliação de risco para as áreas contaminadas sob investigação e um roteiro para realização de investigação detalhada, além da elaboração de plano de intervenção em postos e sistemas retalhistas de combustíveis, descritos no documento e regulamentado pela Lei 997/76 aprovada pelo Decreto 8468/76. Porém, o artigo 69-A da Lei n° 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 (Lei de Crimes Ambientais) estabelece que caso haja o uso da informação falsa, incompleta ou enganosa em relatório, estudo ou laudo ambiental haverá punição penal.

Assim, afim de mitigar os impactos ambientais, a vinhaça de cana-de-açúcar tem sido amplamente utilizada como fertilizante do solo na indústria sucroenergética brasileira, para reciclagem de potássio e água através da técnica de fertirrigação (FUESS et al., 2018). Essa técnica tem fornecido diversos benefícios agrícolas, como melhores condições químicas, físicas e biológicas na fertilidade do solo; elevada produtividade da cana; retenção da umidade no solo; aumento da mineralização do nitrogênio; entre outros (SILVA et al., 2007). No entanto, a falta de manejo e controle adequado deste resíduo no solo pode acarretar impactos de grandes proporções no meio ambiente.

Os potenciais efeitos negativos da fertirrigação no solo, a longo prazo, representam uma grande desvantagem em relação a essa prática, segundo Christofolletti et al. (2013), a infiltração da vinhaça compromete a potabilidade das águas subterrâneas, pois transfere altas concentrações de amônia, magnésio, alumínio, ferro, manganês, cloretos e matéria orgânica para o lençol freático, além de que a quantidade de nutrientes da vinhaça causa a proliferação de microrganismos que esgotam o oxigênio dissolvido na água, matam animais aquáticos e plantas. E ainda, o custo para transporte e/ou bombardeamento da vinhaça até as lavouras, que geralmente se apresentam em lugares distantes da indústria, acaba gerando custos elevados, dificultando o aproveitamento deste resíduo de forma integral e ocasionando riscos de contaminação por vazamento no meio ambiente.

Com a produção contínua e crescente de álcool e açúcar, somente a fertirrigação como alternativa final para a vinhaça torna-se insuficiente. Os micros e macronutrientes presentes na vinhaça podem ser empregados com fonte de suplementação para o

crescimento de outros organismos fotossintetizantes, como microalgas. Estudos realizados em escala de bancada têm demonstrado elevada eficiência na produção de biomassa de microalgas com o emprego da vinhaça (CANDIDO; LOMBARDI, 2018; MELO et al., 2018; QUINTERO-DALLOS et al., 2019; SANTANA et al., 2017; ENGIN et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2016). No entanto, inúmeros desafios abrem caminho para o emprego eficiente da vinhaça impulsionar a produção de microalgas.

Além de sua elevada carga orgânica e concentração de nutrientes a vinhaça apresenta uma coloração escura, sobretudo devido as moléculas denominadas melanoidinas (CHANDRA et al., 2018). Por ser um resíduo escuro, a vinhaça dificulta a entrada de luz solar ou artificial no meio de cultivo inibindo a fotossíntese das microalgas e com isso o seu desenvolvimento. As melanoidinas são macromoléculas orgânicas formadas pela reação entre aminoácidos e açúcares, por serem macromoléculas orgânicas semelhantes a matéria orgânica natural, são passíveis de remoção por coagulação/floculação (LIANG et al., 2009; CHANDRA et al., 2008)

Tecnologias para a clarificação da vinhaça, seja por meio de processos químicos, físicos ou biológicos, são necessários, para a redução da turbidez e a cor. Foi observado na literatura diversos sistemas mecânicos de filtração com adoção de membranas ultrafinas através de osmose reversa (GOMES et al., 2011; MOTA et al., 2015; SANTOS et al., 2017), substâncias que promovem a decantação de nutrientes e até processos eletrolíticos (ZAYAS et al., 2007; YODHOR et al., 2017), oxidativos (GUERREIRO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017) e biológicos (RODRIGUES et al., 2017; MOTA et al., 2015; SILES et al., 2011), baseados na decomposição de matéria orgânica. Apesar da eficiência nos processos supracitados, o maior problema apresentado é o custo de tais processos, o qual poderá ser economicamente inviável para o seu emprego em escala industrial.

Assim este trabalho justifica-se pela necessidade de investigar meios alternativos para a clarificação da vinhaça resultante da destilação fracionada do caldo de cana-de-açúcar e, conseqüentemente, o seu emprego na produção de biomassa de microalgas. Tais investigações possibilitarão minimizar o impacto ambiental resultante da atividade sucroenergética, somado às possibilidades de lucros e continuidade da cadeia produtiva na produção de biomassa de microalgas e subsequente aproveitamento para elaboração de ração animal, suplementação humana, biofertilizantes, bem como para extração de óleos e seus bioativos para uma infinidade de aplicações biotecnológicas.

3.2. OBJETIVO GERAL

Determinar formas alternativas para clarificação da vinhaça resultante da destilação fracionada do caldo de cana-de-açúcar.

3.2.1. Objetivos Específicos

- ✓ Comparar a eficiência da clarificação da vinhaça entre produtos alternativos, comerciais e químicos.
- ✓ Clarificar a vinhaça através de dosagens moderadas com produto alternativo aos produtos comerciais e químicos;
- ✓ Determinar um protocolo adequado para a clarificação da vinhaça com um clarificante alternativo.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para clarificar a vinhaça obtida de usinas da região de Dourados-MS, foram utilizados produtos comerciais, químicos e alternativos conforme descrito na tabela 3.1, seguindo a metodologia esquematizada na figura 3.1. Foi realizada também a diluição da vinhaça em 10, 25, 40 e 50% de água destilada.

Tabela 3. 1 Produtos utilizados no processo de clarificação da vinhaça de cana-de-açúcar.

PRODUTOS COMERCIAIS	Tanfloc MT	Praestol Solenis 2530		Souza et al., 2013
PRODUTOS QUÍMICOS	sulfato de alumínio (Al ₂ (SO ₄))	cloreto de ferro III (FeCl ₃)	hidróxido de cálcio (Ca(OH) ₂)	Liang et al., 2009; Santana et al., 2017
PRODUTOS ALTERNATIVOS	semente de <i>Moringa oleifera</i> *	semente de <i>Moringa oleifera</i> *+ carvão ativado	carvão ativado	Zaid; Ghazali, 2019; Seixas et al., 2016

* a biomassa seca da semente triturada sem a casca (POZZOBON; KEMPKA, 2015), obtida de uma comunidade extrativista.

3.3.1 Avaliação

Foram avaliados através de espectrofotômetro cor (455 nm) e turbidez (860 nm) (APHA, 2017), o pH através de equipamento portátil, de cada um dos tratamentos, realizados em triplicatas. O percentual de redução de cor e turbidez da vinhaça, separadamente foi calculado através da equação 3.1.

$$R\% = [(C_0 - C_t) \cdot 100] / C_0$$

Equação 3. 1

onde C₀: valor inicial de cor e turbidez (nm); C_t: valor final de cor e turbidez (nm).

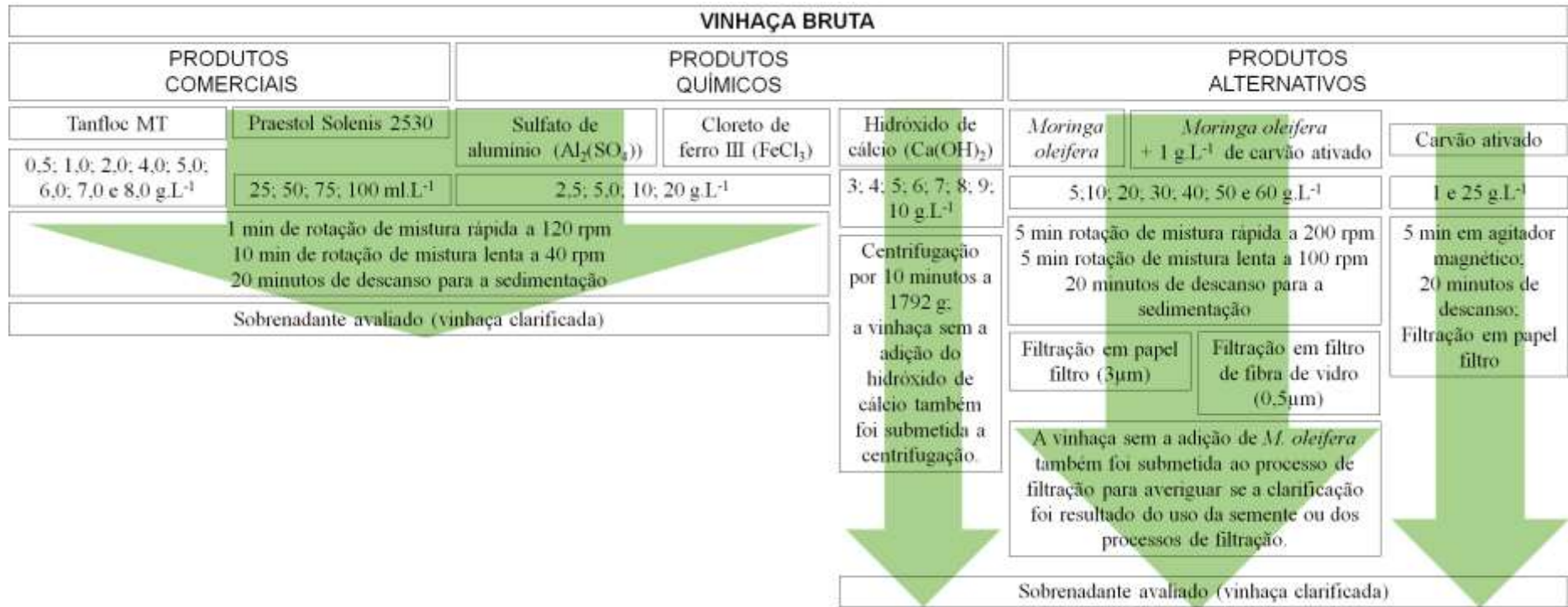


Figura 3. 1 Metodologia esquematizada do processo de clarificação com os produtos comerciais, químicos e alternativos.

3.3.2 Análise dos dados

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada a fim de verificar diferença significativa por tratamento (5% de probabilidade), seguido do teste de Tukey, no programa de estatística GENES versão DOS (Visual Basic 5.0).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As microalgas são organismos fotossintéticos, isto é, necessitam da energia luminosa para converter o gás carbônico em energia química contida nas moléculas biológicas. A radiação fotossinteticamente ativa, útil para microalgas, está localizada na faixa de 400 a 700 nm da irradiância da luz, correspondendo a 50% da radiação solar e intensidade de 800 a 1000 W m² (ZHANG et al., 2015). Assim, foi determinado o percentual de redução mínimo de 50% de cor e turbidez da vinhaça, para a clarificação ser considerada eficiente e adequada para sua utilização como meio de cultivo no desenvolvimento microalgal.

Dos produtos alternativos, comerciais e químicos avaliados *Moringa oleifera*+ filtro de vidro, tanfloc MT, hidróxido de cálcio, além da vinhaça sem adição de produtos submetida a centrifugação, filtração em filtro de vidro e a vinhaça diluída em água destilada foram eficientes com mais de 50% de clarificação da vinhaça.

Como produto alternativo a semente de *Moringa oleifera* + filtro de vidro foi eficiente na clarificação da vinhaça com maior percentual de redução de cor e turbidez obtido utilizando 30 g.L⁻¹ de semente, com 68,92% e 78,78% de redução, respectivamente (Figura 3.2 - A). A vinhaça sem adição da semente, submetida ao processo de filtração em filtro de fibra de vidro também foi eficiente, com redução de 52,80% para cor e 73,40% para turbidez, sendo o valor de turbidez significativamente igual ao tratamento acrescido de 30 g L⁻¹ de *M. oleifera*, porém significativamente diferente para cor, com valores superiores ao processo sem a adição da semente.

Com *Moringa oleifera* + carvão ativado + filtro de vidro, obteve-se na concentração de 5 g.L⁻¹ de *M. oleifera* a maior redução de cor, porém abaixo do mínimo esperado, com 46,98% e 56,99% de redução para turbidez, que não diferiram significativamente dos resultados da vinhaça submetida a filtração em fibra de vidro sem a adição de *M. oleifera* (Figura 3.2 - B)

Ainda não existe protocolo para a utilização de *M. oleifera* no tratamento de vinhaça, mas sua aplicação no tratamento de água já é conhecida (ZAID; GHAZALI, 2019). Mesmo com coloração marrom escura, alto teor de matéria orgânica, sólidos

suspensos, além de alta fração mineral, a utilização da semente de *M. oleifera* foi eficiente para a redução de cor e turbidez, quando associada ao processo de filtração em fibra de vidro, já que o filtro de fibra de vidro possui alta capacidade de retenção de partículas, contribuindo para a clarificação da vinhaça.

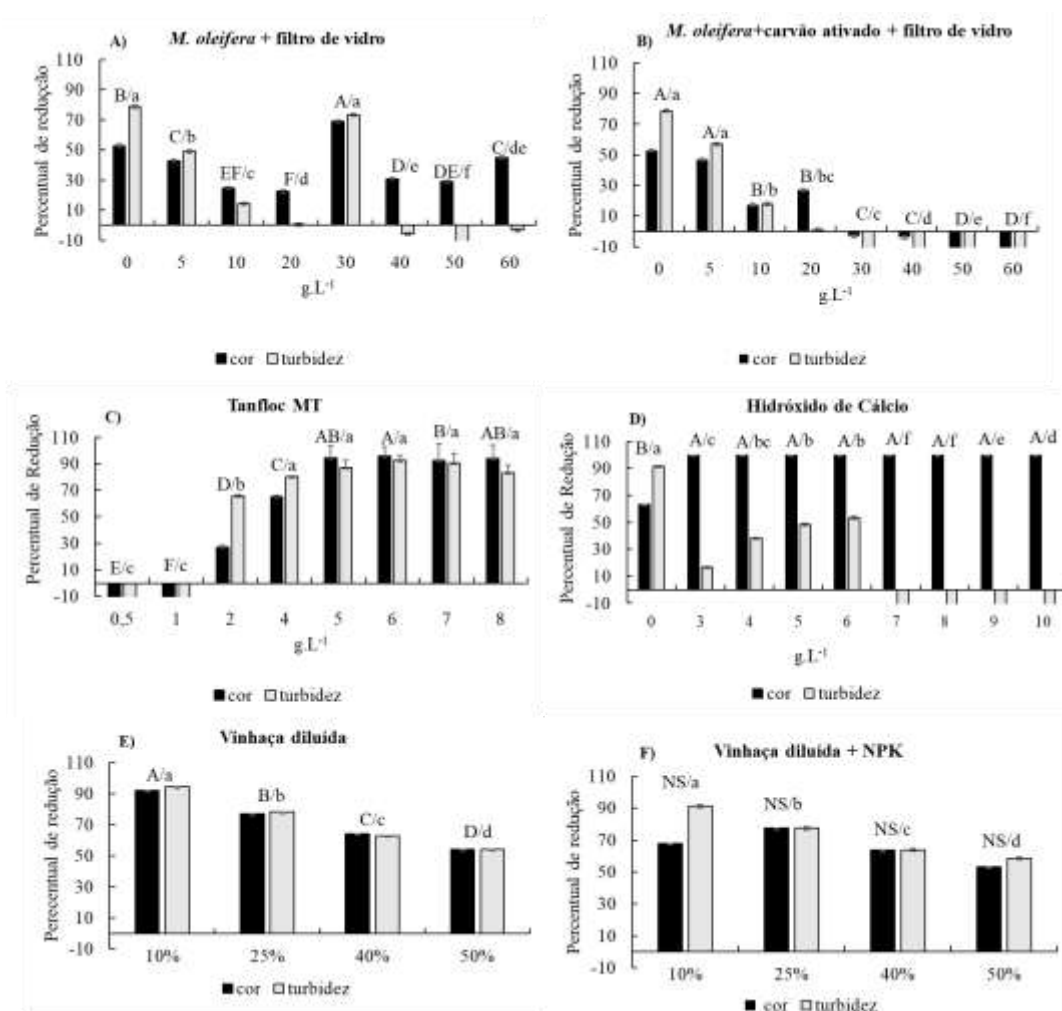


Figura 3. 2 Percentual de redução de cor e turbidez da vinhaça após processo utilizando A) *Moringa oleifera*+ filtro de vidro; B) *Moringa oleifera*+ carvão ativado+ filtro de vidro; C) tanfloc MT; D) hidróxido de cálcio; E) vinhaça diluída e F) vinhaça diluída+NPK

*Letras maiúsculas iguais não diferem entre si, comparando os valores médios do percentual de redução de cor e letras minúsculas iguais não diferem entre si, comparando os valores de turbidez, entre as diferentes concentrações avaliadas, dentro de cada tratamento, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

No processo de clarificação da vinhaça com a semente de *M. oleifera* as partículas solúveis se ligam ao agente ativo e juntam-se para formar grandes flocos, tornando o processo eficiente (ZAID; GHAZALI, 2019). A semente de *M. oleifera* é composta por duas proteínas que atuam como um polieletrólito catiônico, as proteínas da semente são pequenas e difíceis de desnaturar em solução (MOULIN et al, 2019). As duas proteínas

isoladas do extrato bruto de *M. oleifera* são MO2.1 o cuja sequência foi determinada por Gassenschmidt et al., (1995) e MO-CBP3-1, que é a única proteína de semente de *M. oleifera* com uma estrutura de cristal disponível (ULLAH et al, 2015).

Sabe-se que o principal foco para a clarificação da vinhaça é aumentar o ciclo de vida desse resíduo, podendo ser utilizado em outros processos, reduzindo o seu descarte e armazenamento inadequado. Após o tratamento da vinhaça com a semente de *M. oleifera* ainda haverá a geração de resíduo, porém este problema será menor do que o gerado originalmente pela vinhaça sem tratamento, já que a semente de *M. oleifera* não é tóxica, é renovável, produz menos lodo e é biodegradável (TETTEH; RATHIAL 2019).

Dos compostos comerciais avaliados, tanfloc MT na concentração de 5 g.L⁻¹, promoveu 94,53% e 87,42% de redução para cor e turbidez (Figura 3.2 - C). Ele foi eficiente em decantar as impurezas da vinhaça, separando a mistura em duas fases uma líquida, o sobrenadante e outra sólida, os flocos formados. O tanfloc MT é um tanino de origem vegetal (*Acácia negra*) que possui cor característica escura, portanto o mesmo não permite que o líquido clarificado fique cristalino. Tanfloc é uma linha de coagulantes/floculantes desenvolvido pela empresa TANAC ainda na década de 80, são polímeros orgânicos de baixo peso molecular, atuando em sistemas de partículas coloidais, neutralizando as cargas e formando pontes entre as partículas, formando assim os flocos e consequente sedimentação (TANAC, 2018).

Como composto químico o hidróxido de cálcio na concentração de 5 g.L⁻¹, promoveu a redução da cor e turbidez da vinhaça de 99,81% e 48,50%, respectivamente (Figura 3.2 - D). Em trabalho realizado por Santana et al. (2017), os autores obtiveram resultados positivos na clarificação da vinhaça com hidróxido de cálcio, porém em concentrações bem inferiores às do presente trabalho, com 3 g.L⁻¹, e posteriormente utilizaram a vinhaça para cultivar duas cepas de microalgas, no entanto, foi necessário ajustar o pH para 8 antes da inoculação das microalgas (SANTANA et al., 2015). Essa diferença na quantidade de produto utilizado se dá possivelmente, pelas características da vinhaça, que pode variar dependendo das condições de produção, necessitando assim do aumento ou não da concentração de produto para a clarificação.

A vinhaça diluída em água destilada também foi avaliada, como esperado os valores demonstraram maior percentual de redução para cor e turbidez na menor concentração de vinhaça (10%) com redução de 92,30% para cor e 94,55% para turbidez (Figura 3.2 - E). Quando acrescida de NPK, não houve diferença significativa para cor,

já a turbidez apresentou maior percentual de redução também na menor concentração de vinhaça (10%) com 91,30% (Figura 3.2 - F).

A diluição da vinhaça possibilitou excelente redução de cor e turbidez, porém com a utilização de baixíssimas concentrações de vinhaça (10%). O que torna o processo, de certa forma inviável, pois espera-se utilizar a maior concentração possível desse resíduo no cultivo microalgal, a fim de mitigar o impacto ambiental do descarte e armazenamento inadequado da vinhaça, aumentando o seu ciclo de vida de forma sustentável. Já a adição do NPK a vinhaça não promoveu aumento em sua cor e turbidez, acredita-se que a soma de vinhaça e NPK promovam maior desenvolvimento microalgal, uma vez que o NPK já é utilizado como nutriente para o crescimento das microalgas em substituição aos meios comerciais (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA 2003).

Os produtos químicos sulfato de alumínio, cloreto de ferro III, o produto comercial Praestol Solenis 2530, e os alternativos o carvão ativado, *M. oleifera* + papel filtro e *M. oleifera* + carvão ativado + papel filtro, não foram eficientes para a clarificação da vinhaça (Figura 3.3).

Os resultados negativos obtidos, com a utilização do cloreto de ferro III e do sulfato de alumínio na clarificação da vinhaça, podem ser devido à diversos fatores, entre eles o pH, sendo necessários mais estudos que avaliem a viabilidade destes produtos como clarificantes da vinhaça. A coagulação da vinhaça com cloreto de ferro III é um processo altamente dependente do pH, com melhor eficiência de remoção alcançada em níveis baixos de pH, a intensidade de mistura rápida, ao invés de tempo de mistura rápida, tem maior influência nas características dos flocos formados, já que a diminuição da intensidade de mistura resulta no aumento da taxa de floculação, com mais acúmulo de flocos flutuantes (LIANG et al., 2009).

Entretanto, o intuito é encontrar um produto que não seja tão residual e tóxico como é o cloreto de ferro III e o sulfato de alumínio, limitando a posterior utilização da biomassa microalgal, porém, ainda assim estes produtos foram avaliados, pois esperava-se resultados eficientes que serviriam de comparação com os produtos alternativos.

Polímeros têm sido utilizados como coagulantes primários ou como auxiliares de coagulação no tratamento de efluentes, promovendo aumento na taxa de sedimentação, redução da produção de lodo e melhorias do seu desaguamento, da qualidade final da água e redução de custos (TETTEH; RATHIAL, 2019). O polímero Praestol Solenis 2530 é um acrilato de sódio acrilamida copolímero, entretanto, para a o tratamento da vinhaça,

esse polímero, não demonstrou eficácia, com um baixo percentual de redução de cor e turbidez mesmo utilizando-se altas concentrações.

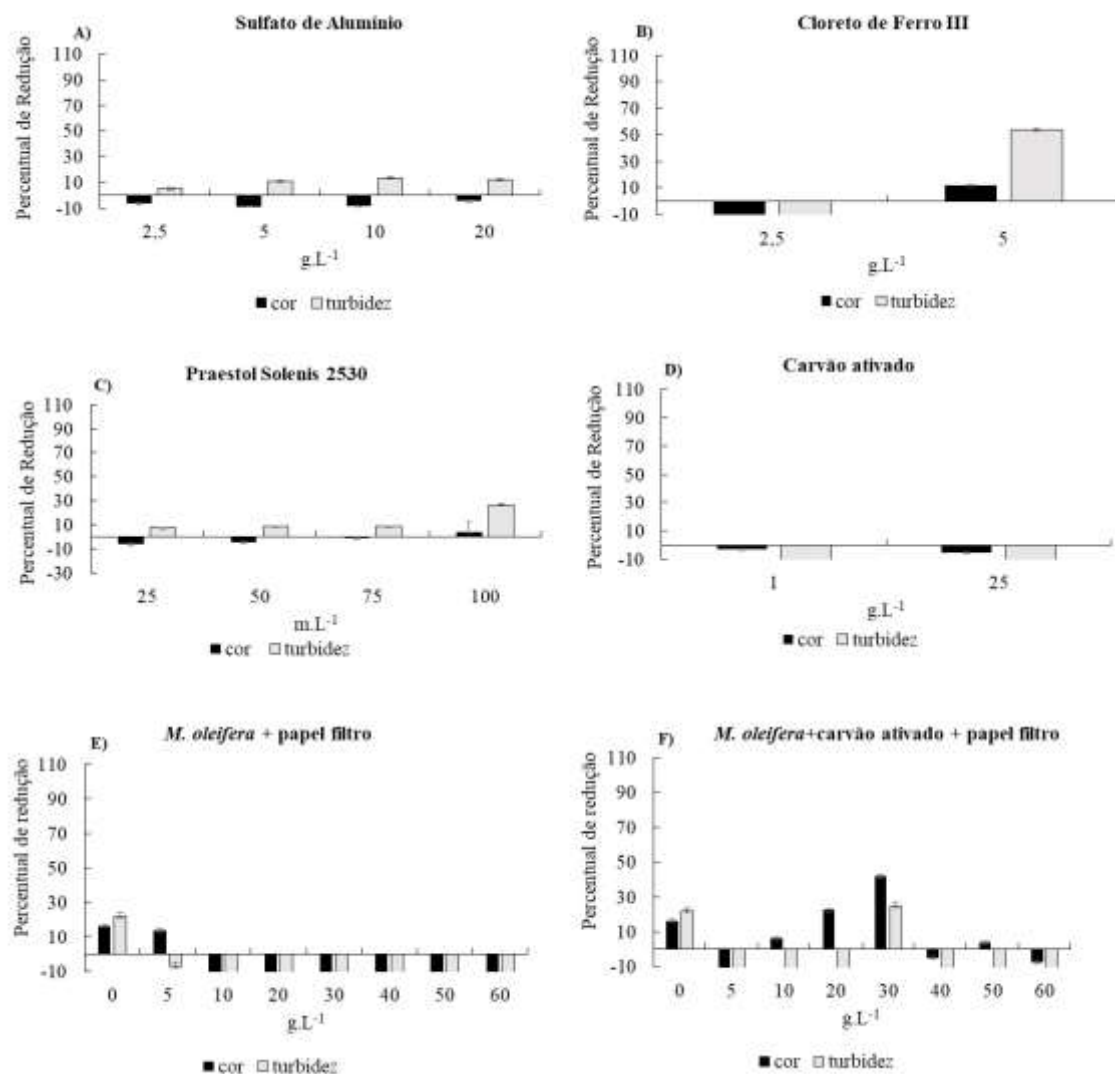


Figura 3.3 Percentual de redução de cor e turbidez da vinhaça após processo utilizando A) sulfato de alumínio; B) cloreto de ferro III; C) Praestol Solenis 2530; D) carvão ativado; E) *Moringa oleifera* + papel filtro e F) *Moringa oleifera* + carvão ativado + papel filtro.

*Letras maiúsculas iguais não diferem entre si, comparando os valores médios do percentual de redução de cor e letras minúsculas iguais não diferem entre si, comparando os valores de turbidez, entre as diferentes concentrações avaliadas, dentro de cada tratamento, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

O carvão ativado tem sido reconhecido como um dos adsorventes mais antigos e amplamente utilizado para o tratamento de água potável e águas residuais para remover poluentes orgânicos e inorgânicos (BHATNAGAR et al., 2013). Porém, a utilização do carvão ativado juntamente com a *M. oleifera*, não potencializou a ação da semente, como esperado. Assim como também a sua utilização de forma isolada, não apresentou

resultado positivo para a clarificação da vinhaça. Enquanto que Seixas et al., (2016) utilizaram o bagaço da cana-de-açúcar para produzir o carvão ativado e o utilizaram no tratamento da vinhaça, obtendo remoções de cor, turbidez e DQO de aproximadamente 76%, 85% e 69%, respectivamente, fazendo uso do bagaço de cana carbonizado a 800 ° C (1° estágio) e 600 ° C (2° estágio), em dosagens de 25 g de carvão por litro de vinhaça. Os autores supracitados constataram que a ação do carvão ativado depende principalmente da química da superfície e da estrutura dos poros dos carbonos porosos, além da interação com a amostra a ser tratada.

Quanto ao aspecto visual da vinhaça, é possível observar as diferenças quanto a coloração original da vinhaça, sem os tratamentos de clarificação e após os testes realizados com cada produto e concentração avaliados (Figura 3.4)

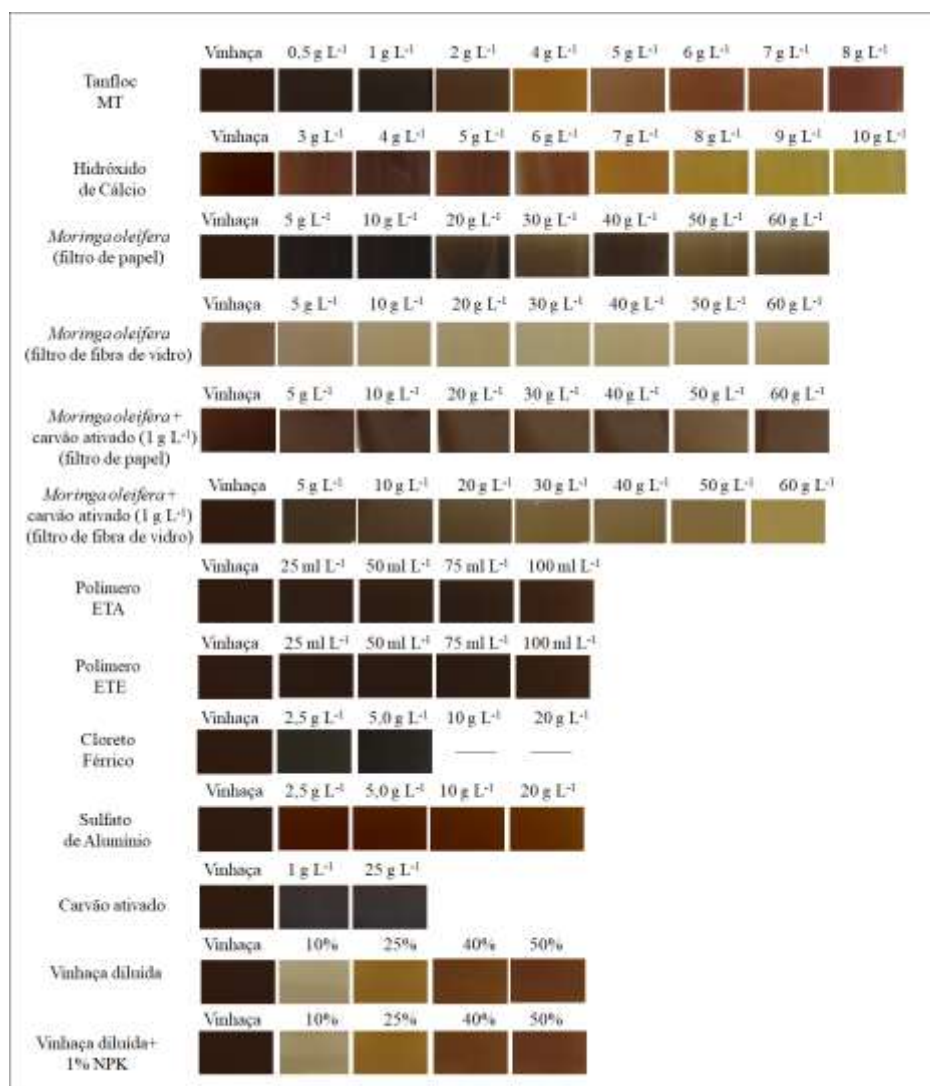


Figura 3.4 Aspecto visual da vinhaça após o processo de clarificação de acordo com o produto utilizado e sua concentração.

De forma geral, os produtos que promoveram percentuais de redução de cor e turbidez acima de 50% na vinhaça, não alteraram o seu pH, com exceção apenas para o hidróxido de cálcio, o qual chegou ao valor de 10,39 na concentração de 5 g.L⁻¹ (Figura 3.4)

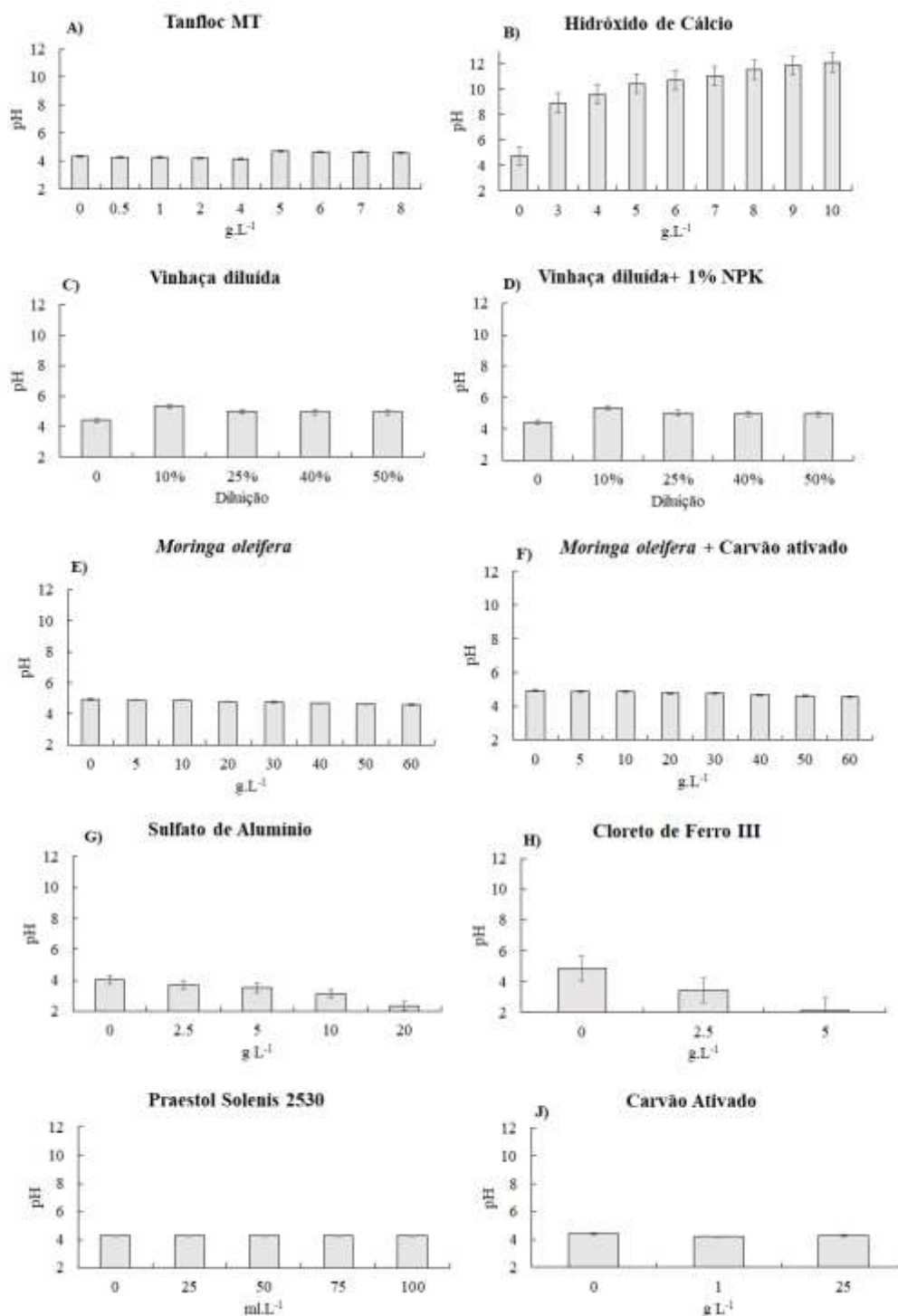


Figura 3. 4 Valores médios do potencial hidrogeniônico (pH) da vinhaça após processo de clarificação com cada produto e concentração avaliada.

Dessa forma, não há razão para se desperdiçar a vinhaça, seja descartando ou armazenando-a, já que devidamente tratada, a sua utilização como fonte de nutrientes para o cultivo microalgal é uma alternativa. Assim, o mesmo efluente que apresenta risco poluidor tem enorme potencial para a geração de renda e riqueza, desde que corretamente aproveitado. Portanto, com base nos resultados, é possível aumentar o ciclo de vida da vinhaça após a sua clarificação com um produto alternativo: a semente de *Moringa oleifera*.

3.5 REFERÊNCIAS

- APHA. 2017. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 23rd Ed.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC.
- Bhatnagar, A., Hogland, W., Marques, M., & Sillanpää, M. 2013. An overview of the modification methods of activated carbon for its water treatment applications. **Chemical Engineering Journal**, 219, 499–511. Doi:10.1016/j.cej.2012.12.038
- Brasil- **Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998**. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Artigo 69 Incluído pela Lei nº 11.284, de 2006.
- Candido, C., Lombardi, A. 2018. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. **Algal Research**, 30, 79-85, 2018. Doi: 10.1016/j.algal.2018.01.005
- CETESB (São Paulo). Decisão de Diretoria nº 103-2007-C-E, de 22-6-2007. Dispõe sobre o procedimento para o gerenciamento de áreas contaminadas. Diário Oficial [do] Estado de São Paulo, Poder Executivo, São Paulo, 117, 119, 2007. Seção 1, p. 34.
- CETESB (São Paulo). **Lei nº 997, de 31 de maio de 1976**. Dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente. Decreto nº 8.468, de 08 de setembro de 1976.
- CETESB (São Paulo). P4. 231. 2015. Dispõe a norma técnica - Critérios e procedimento para aplicação de vinhaça no solo agrícola. 3ª edição, 15p.
- Chandra, R., Bharagava, R. N., & Rai, V. 2008. Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. **Bioresource Technology**, 99, 11, 4648–4660. Doi:10.1016/j.biortech.2007.09.057
- Christofolletti, C., Escher, J., Correia, J., Marinho, J. Fontanetti, C. 2013. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management** (New York, N.Y.). Doi: 33. 10.1016/j.wasman.2013.09.005.
- CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho CONAMA

Cortez, L. A. B., Rossell, C. E. V., Jordan, R. A., Leal, M. R. L. V., Lora, E. E. S. 2014. "R&D Needs In The Industrial Production Of Vinasse", p.619-636. **In Luis Augusto Barbosa Cortez (Coord.). Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability**, São Paulo: Editora Edgard Blücher, Doi: 10.5151/BlucherOA-Sugarcane-SUGARCANE BIOETHANOL_55

Dos Santos, R. R., Araújo, O. De Q. F., De Medeiros, J. L., Chaloub, R. M. 2016. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, 204, 38–48. Doi:10.1016/j.biortech.2015.12.077

Engin, I. K., Cekmecelioglu, D., Yücel, A. M., Oktem, H. A. 2018. Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium* sp. ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 251, 128–134. Doi:10.1016/j.biortech.2017.12.023

Fernandes Filho, F. E., Araujo, G. J. F. 2016. Normativos federais e estaduais reguladores da destinação da vinhaça no Brasil: uma proposta de nova abordagem. **RACEF – Revista De Administração, Contabilidade E Economia Da Fundace**, 7, 3, 146-160.

Fuess, L. T., Garcia, M. L., & Zaiat, M. 2018. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science Of The Total Environment**, 634, 29–40. Doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.326

Gomes, M. T. M. S., Eca, K. S., Viotto, L. A. 2011. Concentração da vinhaça por microfiltração seguida de nanofiltração com membranas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 46, 6, 633-638. Doi: 10.1590/S0100-204X2011000600009.

Guerreiro L. F., Rodrigues C. S. D., Duda R. M., De Oliveira R. A., Boaventura R. A. R., Madeira L.M. 2016. Treatment of sugarcane vinasse by combination of coagulation/flocculation and Fenton's oxidation. **Journal Of Environmental Management**, 181, 237-248. Doi: 0.1016/j.jenvman.2016.06.027

Liang, Z., Wang, Y., Zhou, Y., Liu, H., Zhenbin Wu, Z. 2009. Variables affecting melanoidins removal from molasses wastewater by coagulation/flocculation. **Separation And Purification Technology**, 68, 382–389. Doi: 1016/j.seppur.2009.06.011

Melo, R. G. De, Andrade, A. F. De, Bezerra, R. P., Correia, D. S., Souza, V. C. De, Brasileiro-Vidal, A. C., ... Porto, A. L. F. 2018. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. **Chemosphere**, 204, 344–350, 2018. Doi:10.1016/j.chemosphere.2018.04.039

Mota, V., Araújo, T., Amaral, M. 2015. Comparison of Aerobic and Anaerobic Biodegradation of Sugarcane Vinasse. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, 176. Doi: 10.1007/s12010-015-1653-8.

Moulin, M., Mossou, E., Signor, L., Kieffer-Jaquinod, S., Kwaambwa, H. M., Nermark, F., ... Rennie, A. R. 2019. Towards a molecular understanding of the water purification properties of *Moringa* seed proteins. *Journal of Colloid and Interface Science*. Doi:10.1016/j.jcis.2019.06.071

Pozzobon, L., Kempka, A. P. 2015. Sementes de *Moringa oleifera* na clarificação de efluente de indústria de ingredientes para alimentação animal: Comparação com o

coagulante convencional e estudo das condições operacionais. **Engevista**, 17, 2, 196-206. Doi 10.22409/engevista.v17i2.595.

Quintero-Dallos, V., Garcia Martinez, J., Contreras, J., Barajas-Solano, A., Barajas-Ferreira, C., Lavecchia, R., Zuorro, A. 2019. Vinasse as a Sustainable Medium for the Production of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. **Water**, 11, 1526. Doi: 10.3390/w11081526.

Rodrigues, C., Neto, A., Duda, R., Oliveira, R., Boaventura, R., Madeira, L. 2017. Combination of chemical coagulation, photo-Fenton oxidation and biodegradation for the treatment of vinasse from sugar cane ethanol distillery. **Journal Of Cleaner Production**, 142, 3634-3644. Doi: 10.1016/j.jclepro.2016.10.104.

Santana, H., Cereijo, C. R., Brunale, P. P. De M., Siqueira, F. G. De, Brasil, B. Dos S. A. F. 2015. Produção de biomassa de microalgas em vinhaça e CO₂ e caracterização do efluente pós-cultivo In: **Encontro De Pesquisa E Inovação Da Embrapa Agroenergia**, 2015, Brasília, DF. Anais ... Brasília, DF: Embrapa Agroenergia,

Santana, H., Cereijo, C. R., Teles, V. C., Nascimento, R. C., Fernandes, M. S., Brunale, P., ... Brasil, B. S. A. F. 2017. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, 228, 133–140. Doi:10.1016/j.biortech.2016.12.075

Santos, F., Ricci, B., Neta, L., Amaral, M. 2017. Sugarcane Vinasse Treatment by Two-stage Anaerobic Membrane Bioreactor: Effect of Hydraulic Retention Time on Changes in Efficiency, Biogas Production and Membrane Fouling. **Bioresource Technology**, 245. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.08.126.

Seixas, F. L., Gimenes, M. L., Fernandes-Machado, N. R. C. 2016. Tratamento da vinhaça por adsorção em carvão de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, 39, 2, 172-179. Doi: 10.5935/0100-4042.20160013

Siles L., J., García-García, I., Martín, A. 2011. Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. **Journal Of Hazardous Materials**, 188, 247-53. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.096.

Silva, M. A. S. Da, Griebeler, N. P., Borges, Lino C. 2007. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira De Engenharia Agrícola E Ambiental**, 11, 1, 108-114.

Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 2003. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. 2 ed. São Carlos: RiMa.

Souza, R. P. de, Girardi, F., Santana, V. S., Fernandes-Machado, N. R. C., Gimenes, M. L. 2012. Vinasse treatment using a vegetable-tannin coagulant and photocatalysis. **Acta Scientiarum Technology**, 35, 1, 89-95. Doi:10.4025/actascitechnol.v35i1.11011

Sydney, E. B., Neto, C. J. D., De Carvalho, J. C., Vandenberghe, L. P. De S., Sydney, A. C. N., Letti, L. A. J., ... Soccol, C. R. 2019. Microalgal biorefineries: Integrated use of liquid and gaseous effluents from bioethanol industry for efficient biomass production. **Bioresource Technology**, 292, 21955. Doi:10.1016/j.biortech.2019.121955

TANAC- Tratamento de águas. 2018 Acesso em 09/12/2018. Disponível em <http://www.tanac.com.br/pt-br/produtos/aguas>

Tetteh, E. K. and Rathilal, S. 2019. Application of Organic Coagulants in Water and Wastewater Treatment, Organic Polymers, Arpit Sand and Elsayed Zaki, **IntechOpen**, ISBN: 978-1-78984-618-8. Doi: 10.5772/intechopen.84556.

Ullah, A., Mariutti, R. B., Masood, R., Caruso, I. P., Gravatim Costa, G. H., Millena de Freitas, C., ... Arni, R. K. (2015). Crystal structure of mature 2S albumin from *Moringa oleifera* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 468, 1-2, 365–371. Doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.087

UNICA- União da Indústria de Cana-de-Açúcar. 2019. Vinhaça: biofertilizante e energia sustentável. Disponível: <https://unica.com.br/noticias/vinhaca-biofertilizante-e-energia-sustentavel/>. Acesso em: 01.05.2021

Yodhor, P., Choeisai, P., Choeisai, K., Syutsubo, K., 2017. Effect of pH on electrochemical treatment using platinum coated titanium mesh electrodes for post treatment of anaerobically treated sugarcane vinasses. **Engineering And Applied Science Research**, 44, 39-42. Doi:10.14456/easr.2017.6.

Zaid, A. Q. A, Ghazali, S. 2019. Preliminary Investigation of Water Treatment Using *Moringa Oleifera* Seeds Powder as Natural Coagulant: A Case Study of Belat River, Malaysia. **The International Journal Of Engineering And Science (IJES)**, 8, 2, 79-85. Doi:10.9790/1813-0802017985

Zayas, T., Rómero, V., Salgado, L., Meraz, M., Morales, U. 2007. Applicability of coagulation/flocculation and electrochemical processes to the purification of biologically treated vinasse effluent. **Separation And Purification Technology**, 57, 2, 270–276. Doi:10.1016/j.seppur.2007.04.019

Zhang, X.; Tang, X.; Zhou, B.; Hu, S.; Wang, Y. Effect of enhanced UV-B radiation on photosynthetic characteristics of marine microalgae *Dunaliella Salina* (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 469, 27-35, 2015. Doi:10.1016/j.jembe.2015.04.002

CAPÍTULO 4

CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum*) CLARIFICADA

RESUMO: As aplicações das microalgas vêm sendo cada vez mais exploradas, com interesses intrínsecos na suplementação humana e animal, produção de biocombustíveis, em seus bioativos para indústria nutracêutica e cosmeceutica. Entretanto, a redução no custo de produção de biomassa de microalgas em ambientes controlados ainda é um desafio. Assim, o objetivo para este trabalho é avaliar o desenvolvimento de *Chlorella sorokiniana* em meio alternativo à base de vinhaça de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) clarificada. A clarificação da vinhaça é um processo importante, pois permite reduzir a cor e turbidez que são fatores limitantes para a fotossíntese das microalgas. Para tal, *C. sorokiniana* foi cultivada durante 35 dias em ambiente controlado no meio contendo vinhaça submetida a diferentes processos de clarificação, além da vinhaça bruta diluída em água destilada e um controle. Os valores ótimos de densidade foram verificados para microalgas cultivadas em vinhaça diluída e suplementada com fertilizante NPK. Apesar da vinhaça clarificada ter sido eficiente em estudos na literatura, no presente trabalho se mostrou um fator de inibição para o crescimento de *C. sorokiniana*, esses resultados sugerem novos estudos para a compreensão dos processos químicos pós clarificação necessários para o crescimento ótimo da microalga.

Palavras-chave: resíduo agroindustrial, clarificação, microalgas, cinética.

4.1 INTRODUÇÃO

A maioria das microalgas tem alta produtividade de biomassa e alta taxa de fixação de dióxido de carbono (CO_2), elas liberam oxigênio como subproduto da fotossíntese, dessa forma são importantes em qualquer cadeia alimentar (KUMAR; SHARMA, 2014). Estima-se que 50 a 80% do oxigênio presente na Terra seja produzido por elas, qualquer corpo de água contém algas planctônicas em seus primeiros metros de profundidade (PULZ; GROSS, 2004; TORTORA et al., 2005).

Estes organismos são utilizados para os mais diversos fins, pois possuem grande potencial biotecnológico nos mais diversos campos (DERNER et al., 2006). A utilização de microalgas em processos biotecnológicos possui inúmeras vantagens: alta taxa de duplicação celular com elevada produtividade e absorção de CO_2 , resistência a alterações do meio com capacidade de crescimento em águas salinas, salobras ou contaminadas por diversos resíduos, capacidade de produzir diversas biomoléculas, como proteínas e carboidratos, que na forma de amido, glicose, açúcares e outros polissacarídeos, de alta digestibilidade são altamente visadas na indústria alimentar (CHISTI, 2008; WALTZ, 2009; XU et al., 2011; CAZZANIGA et al., 2014).

As aplicações das microalgas vêm sendo cada vez mais exploradas, dessa forma, outros produtos celulares também são de interesse para a bioenergia ou produtos de elevado valor comercial constituindo, uma alternativa para produção de biodiesel e outras formas de biocombustíveis, como o metano e biohidrogênio (SPOLAORE et al, 2006; CHISTI, 2008), além de aplicações na indústria farmacêutica.

Assim, o estudo do cultivo de microalgas é importante para aumentar o conhecimento sobre a sua biologia, favorecendo posterior produção em ambientes controlados. Entretanto, o grande desafio no cultivo de microalgas é realiza-lo de forma economicamente viável, pois os meios de enriquecimento do cultivo são essenciais para o desenvolvimento das microalgas. No entanto, cabe ressaltar que os custos com a fonte de nutrientes consistem no segundo maior custo de produção (ANDRADE; COSTA, 2008), isso porque comumente utilizam-se meios sintéticos comerciais de elevado custo. A glicose, o glicerol e o acetato de sódio são as principais fontes de carbono aplicadas nos cultivos heterotróficos e mixotróficos (FENG et al., 2011; ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

Diante disso, novos meios de cultivo de menor custo têm sido avaliados, mostrando o potencial de cultivo de diferentes microalgas utilizando a vinhaça da cana-de-açúcar, tanto em diferentes concentrações quanto bruta e tratada, como fonte de

nutrientes, resultando em alta produção de biomassa microalgal, como para *Chlorella vulgaris* (CANDIDO; LOMBARDI, 2018; MELO et al., 2018; QUINTERO-DALLOS et al., 2019), *Micractinium* sp. e *Chlamydomonas bioconvexa* (SANTANA et al., 2017; ENGIN et al., 2018) e *Spirulina maxima* (DOS SANTOS et al., 2016).

O gênero *Chlorella* engloba microalgas verdes, que são utilizadas para a suplementação na alimentação humana e animal (SATHASIVAM et al., 2017). A espécie *Chlorella sorokiniana* é uma microalga de tamanho pequeno (4,5 µm), apresenta um crescimento rápido, alta produção de biomassa, possui vantagem competitiva e pode ser cultivada em ambientes mixotróficos, ideal para cultivo em águas residuais (LIZZUL et al., 2014). Dessa forma, iremos avaliar o desenvolvimento de *Chlorella sorokiniana* em meio alternativo à base de vinhaça de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*).

4.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a cinética de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* na fração clarificada da vinhaça, um efluente da indústria sucroenergética.

4.2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Quantificar os micros e macronutrientes de vinhaça de cana-de-açúcar;
- ✓ Avaliar o desenvolvimento de *Chlorella sorokiniana* em vinhaça de cana-de-açúcar clarificada.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Digestão de amostras no micro-ondas para análises de micros e macronutrientes da vinhaça de cana-de-açúcar

Foi pesado aproximadamente 100 mg da amostra, colocadas no tubo digestor do micro-ondas e adicionado 5 mL de ácido nítrico e 3 mL de peróxido de hidrogênio. A mistura foi repousada por um período de 15 min para reação da amostra/mistura acida. Após esse período, os tubos foram tapados e conduzidos ao digestor de micro-ondas para digestão completa da amostra conforme parâmetros abaixo:

Tabela 4. 1 Curva programada para digestão das amostras.

	T	P	Ramp.	Time	Power
1	170	35	5	5	60
2	190	35	2	10	80

3	210	35	2	15	90
4	50	35	0	0	0
5	50	35	0	0	0

Após a digestão completa da amostra, a mistura ácida foi transferida para balão volumétrico e completado o volume para 25 mL. As leituras foram feitas em espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-OES) usando curva padrão multielementar. Todas as soluções usadas nas digestões foram de padrão analítico (PA).

4.3.2 Obtenção da biomassa microalgal

Foi utilizada cepa da microalga *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae) adquirida da Fundação André Tosello (Ref. 211-32; CTT 7727; IBVF 211-32, University of Seville- Spain), que após recebida foi cultivada *in vitro* no Laboratório de Bioengenharia da UFGD. Para tal, utilizou-se meio definido (SUEOKA et al., 1967) em galões de polipropileno, com aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo controlado (12 h luz / 12 h escuro), a colheita microalgal foi realizada durante a fase estacionária. A biomassa foi separada por eletrofloculação e depois liofilizada.

4.3.3 Cultivo de *Chlorella sorokiniana* em vinhaça de cana-de-açúcar

A microalga foi inoculada na densidade de $290,75 \times 10^5$ céls. $m.L^{-1}$ em Erlemeyer com volume útil de 250 ml mantidos em estufa incubadora com demanda bioquímica de oxigênio (BOD), a temperatura ($25^\circ C$) e fotoperíodo controlados (12 h luz / 12 h escuro) e agitação constante de 200 rpm. A microalga foi cultivada em vinhaça de acordo com os tratamentos descritos na Figura 4.1

4.3.4 Avaliação e Análise dos dados

O cultivo foi monitorado diariamente e a cada sete dias foram retiradas as amostras para aferir a densidade celular utilizando contagem em câmara de Neubauer. Foram também monitorados semanalmente os valores de pH.

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada a fim de verificar diferença significativa por tratamento e entre os tratamentos (5% de probabilidade), seguido do teste de Tukey, no programa de estatística GENES versão DOS (Visual Basic 5.0).

CULTIVO DE <i>Chlorella sorokiniana</i>		
VINHAÇA CLARIFICADA*	VINHAÇA BRUTA + ÁGUA DESTILADA	CONTROLE
V1) 5 g.L ⁻¹ de hidróxido de cálcio V2) 30 g.L ⁻¹ de <i>Moringa oleifera</i> V3) 5g.L ⁻¹ de tanfloc MT V4) centrifugada (1792g 10min) V5) filtração em filtro de fibra de vidro (0,5µm)	V6) 10% de vinhaça V7) 25% de vinhaça V8) 40% de vinhaça V9) 50% de vinhaça V10) 10% de vinhaça+1% NPK** V11) 25% de vinhaça+1% NPK ** V12) 40% de vinhaça+1% NPK ** V13) 50% de vinhaça+1% NPK **	V14) água destilada e 1% NPK **
DURANTE 35 DIAS		

* Metodologia de clarificação descrita no capítulo 3.

** 1% de NPK da solução estoque de preparada de acordo com Sipaíba-Tavares e Rocha (2003)

Figura 4. 1 Delineamento determinando os tratamentos/ meios de cultivo para a microalga *Chlorella sorokiniana* em vinhaça.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vinhaça apresenta uma gama de micro e macronutrientes, com valores consideráveis de Ferro, Manganês e Zinco, comparáveis aos meios comerciais comumente utilizados para o cultivo microalgal. Já o NPK (20:5:20) apresenta somente macronutrientes, estes em concentração mais elevada do que na vinhaça, porém, inferior aos meios comerciais (Tabela 4.2).

A associação de vinhaça e NPK aumenta a gama de nutrientes do meio de cultivo para as microalgas. Já que o acréscimo do NPK ao meio possibilita maior inserção de nitrogênio, um nutriente essencial para a produção microalgal (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015). O nitrogênio é um elemento importante no metabolismo microalgal, sendo necessário em maior quantidade depois do carbono, cerca de 12 %; esse nutriente participa da composição molecular de proteínas e enzimas, das quais dependem as reações químicas celulares, e dos ácidos nucleicos, que compõem o DNA, além disso, o nitrogênio compõe muitas moléculas orgânicas (aminoácidos, peptídeos) e inorgânicas (NH₃, NO₃⁻, N₂) (WOJCIECHOWSKI et al., 2013).

A microalga *Chlorella sorokiniana* apresentou maior densidade microalgal no meio contendo vinhaça a 25% (281,44±2,53 x10⁵ céls. mL⁻¹) e 40%, ambas suplementadas com fertilizante agrícola NPK (275,15±0,20 x10⁵ céls. mL⁻¹), diferindo significativamente dos demais meios de cultivo, de forma que *C. sorokiniana* cultivada em vinhaça clarificada esteve abaixo de 53 x10⁵ céls. mL⁻¹, ou seja, cinco vezes menor que os melhores resultados (Tabela 4.3).

Tabela 4. 2 Composição e quantificação dos micro e macronutrientes da vinhaça, NPK e os meios comerciais CHU12, BBM e Sueoka (mg L^{-1}).

Componente (mg L^{-1})	Vinhaça	NPK	CHU12	BBM	Sueoka
Zinco (Zn)	1,60		-	8,82 ($\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$)	4,40 ($\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$)
Chumbo (Pb)	0,45		-	-	-
Cádmio (Cd)	0,05		-	-	-
Níquel (Ni)	0,20		-	-	-
Ferro (Fe)	42,50		1,0 (FeCl_3)	4,98 ($\text{FeSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$)	1,00 ($\text{FeSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$)
Manganês (Mn)	5,50		1,15 ($\text{MnCl}_2,4\text{H}_2\text{O}$)	1,44 ($\text{MnCl}_2,4\text{H}_2\text{O}$)	1,02 ($\text{MnCl}_2,4\text{H}_2\text{O}$)
Cobre (Cu)	0,95		-	1,57 ($\text{CuSO}_4,5\text{H}_2\text{O}$)	0,32 ($\text{CuSO}_4,5\text{H}_2\text{O}$)
Cromo (Cr)	0,07		-	-	-
Cobalto (Co)	0,22		-	0,49 ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$)	0,32 ($\text{CoCl}_2,6\text{H}_2\text{O}$)
Alumínio (Al)	43,80		-	-	-
Cálcio (Ca)	1,13		20 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)	25 ($\text{CaCl}_2,2\text{H}_2\text{O}$)	0,133 ($\text{CaCl}_2,2\text{H}_2\text{O}$)
Magnésio (Mg)	234		25 ($\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$)	75 ($\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$)	0,25 ($\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$)
Sódio (Na)	25,30		20 (Na_2CO_3)	250 (NaNO_3) 25(NaCl)	-
Potássio (K)	2,45	14	6 (K_2HPO_4)	75 (K_2HPO_4) 175 (KH_2PO_4)	5,3 (K_2HPO_4) 8,3 (KH_2PO_4)
Molibdênio (Mo)	<DL		-	-	-
Boro (B)	27,3		2,5 (H_3BO_3)	11,42 (H_3BO_3)	2,28 (H_3BO_3)
Nitrogênio (N)	0,06	14	20 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)	0,49 ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) 250 (NaNO_3)	9,35 (NH_4Cl)
Fósforo (P)	0,06	3,5	6 (K_2HPO_4)	75 (K_2HPO_4) 175 (KH_2PO_4)	-
Sílica (Si)	-		25 (Na_2SiO_3)	-	-
Enxofre (S)	-		-	0,1 (ml) (H_2SO_4)	-
EDTA	-		2 (Na_2 EDTA)	10 (Na_2 EDTA)	50,80 (Na_2 EDTA)

Legenda: <DL= Abaixo do limite de detecção. Fonte: BBM (BOLD 1949, BISCHOFT; BOLD 1963); CHU₁₂ (CHU, 1942), Sueoka (SUEOKA et al., 1967).

Os resultados apresentados indicaram que nos meios de cultivo preparados com vinhaça clarificada houve uma inibição de crescimento de até cinco vezes em comparação com os meios preparados com vinhaça diluída até 40%. Os produtos químicos utilizados para clarificação podem ter deixado resíduos na vinhaça, interferindo em aspectos fundamentais para manutenção da microalga no meio, como tensão superficial, metabolismo, permeabilidade, trocas de nutrientes com o meio, entre outros.

Para corroborar as observações supracitadas seria importante que os tratamentos que não utilizaram produtos químicos para clarificação, como aqueles que adotam somente centrifugação e a filtração, tivessem valores de desempenho ótimos ou melhores. No entanto, esses tratamentos também propiciaram baixo crescimento para as microalgas.

Tabela 4. 3 Densidade celular da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada em vinhaça durante 35 dias.

Meio de cultivo	Densidade celular em cada dia de cultivo ($\times 10^5$ céls. mL ⁻¹)						f	p
	1	7	14	21	28	35		
V1	5,56±0,10 NS e	22,33±1,17 G b	27,44±0,18 HI a	25,88±0,79 H a	18,00±0,51 G c	10,94±0,54 HIJ d	173,59	<0,05
V2	5,56±0,10 NS de	4,79±0,49 I e	20,33±1,03 IJ a	9,13±1,06 J c	13,33±0,74 G b	9,00±0,58 IJK cd	60,01	<0,05
V3	5,56±0,10 NS c	4,67±0,37 I c	15,79±0,58 JK b	14,19±0,11 IJ b	19,19±0,18 G a	5,00±0,58 JK c	285,28	<0,05
V4	5,56±0,10 NS e	11,17±0,71 H d	9,18±0,04 K d	21,94±0,95 HI b	42,15±1,03 EF a	15,58±0,65 GHIJ c	365,94	<0,05
V5	5,56±0,10 NS d	24,71±0,12 G c	38,42±0,55 G b	52,17±1,16 G a	51,81±1,08 DE a	48,63±0,87 F a	430,98	<0,05
V6	5,56±0,10 NS e	77,79±2,85 C c	128,50±2,47 C a	109±2,89 E b	36,13±2,17 F d	13,00±1,53 HIJ e	531,70	<0,05
V7	5,56±0,10 NS f	85,35±0,90 B c	122±1,73 C b	163,54±2,22 C a	54,24±1,30 D d	18,63±2,25 GHI e	1439,97	<0,05
V8	5,56±0,10 NS f	76,23±0,72 Cb	109±2,89 D a	45,10±1,21 G c	35,06±0,32 F d	21,25±3,36 GH e	398,63	<0,05
V9	5,56±0,10 NS d	66,94±1,46 D a	35,33±1,10 GH b	24,08±0,72 H c	9,13±0 G d	0 K e	968,96	<0,05
V10	5,56±0,10 NS e	31,56±0,59 F d	58,46±0,72 E c	136,63±0,69 D a	61,79±0,63 D b	59,92±0,37 E bc	6114,21	<0,05
V11	5,56±0,10 NS f	108,19±1,32 A e	255,48±3,13 A b	281,44±2,53 A a	184,54±1,86 C c	174,04±1,7 B d	2510,83	<0,05
V12	5,56±0,10 NS f	75,85±1,11 C e	224,40±2,26 B c	275,15±0,20 A a	253,60±2,06 A b	210,63±0,95 A d	6063,57	<0,05
V13	5,56±0,10 NS f	36,46±1,14 Fe	122±1,73 C d	224,25±2,53 B a	183,33±5,49 C b	149,33±4,91 C c	661,91	<0,05
V14	5,56±0,10 NS e	48,17±1,09 E d	48,25±0,45 F d	69,10±2,83 F c	208±4,62 B a	112±4,04 D b	638,88	<0,05
f	-	797,54	2157,03	3154,97	1450,82	1094,60		
P	1	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05		

V1) vinhaça clarificada com 5 g.L⁻¹ de Hidróxido de cálcio; V2) vinhaça clarificada com 30 g.L⁻¹ de *Moringa oleifera*; V3) vinhaça clarificada com 5 g.L⁻¹ de Tanfloc MT; V4) vinhaça centrifugada (1792g 10min); V5) vinhaça filtrada em filtro de fibra de vidro (0,5µm); V6) 10% de vinhaça diluída V7) 25% de vinhaça diluída; V8) 40% de vinhaça diluída; V9) 50% de vinhaça diluída; V10) 10% de vinhaça diluída+1% de solução estoque de NPK; V11) 25% de vinhaça diluída+1% de solução estoque de NPK; V12) 40% de vinhaça diluída+1% de solução estoque de NPK; V13) 50% de vinhaça diluída+1% de solução estoque de NPK e um controle (V14) preparado com água destilada e NPK 1% (v / v)

*Médias seguidas de mesma letra maiúsculas não diferem estatisticamente entre si, comparando os meios de cultivo, na coluna. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente entre si, dentro de cada meio, entre os dias de cultivo, na linha. Pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim, uma combinação de fatores pode ter interferido no desempenho da microalga, entre eles a elevada concentração de micro e macronutrientes na vinhaça em relação aos meios de cultivo comerciais mais adotados na literatura. A vinhaça chega a ter cinco nutrientes, alguns metais dentre eles, a mais do que a composição dos meios comerciais normalmente utilizados.

Alguns metais pesados podem ser necessários para muitos microrganismos em determinadas concentrações ou associações, sendo assim chamados de elementos-traço (GUILHERME et al., 2005). Os metais pesados são considerados tóxicos para grande parte dos seres vivos. Em uma pesquisa realizada por Ansilago et al. (2016) com a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, foi atribuído ao sulfato de zinco, quando presente isoladamente, um potencial efeito crônico de toxicidade; o mesmo ocorreu com cloreto de alumínio e sulfato ferroso quando avaliados isoladamente, apresentando um potencial de efeito agudo sobre as microalgas; enquanto que a associação entre cloreto de alumínio + sulfato ferroso + sulfato de zinco pode ter resultado em um efeito antagônico, em que os contaminantes, aplicados juntos, interferem um no outro ou interferem com outro contaminante que coexiste no meio, tornando-se benéficos às microalgas, com a maior taxa de crescimento para este meio.

O mesmo possivelmente ocorreu na presente pesquisa, onde a alta gama de nutrientes e associação destes, somado ao NPK potencializou o desenvolvimento microalgal. Quanto aos produtos utilizados inibirem o desenvolvimento microalgal pela presença de resíduos na vinhaça, essa possibilidade é ínfima, pois, com exceção apenas para o tratamento com tanfloc MT, todos os demais processos para clarificação foram submetidos a filtração e a centrifugação, eliminando qualquer resíduo do produto do meio, o que possivelmente reduziu também grande parte dos nutrientes necessários para o desenvolvimento microalgal.

O NPK já é um meio de cultivo alternativo a meios sintéticos. A utilização de fertilizante químico (NPK) associado com extrato de macrófita (*Eichhornia crassipes*) mostrou-se eficiente na promoção do cultivo de alta densidade de *Haematococcus pluvialis*, uma alternativa adequada para substituir o meio convencional (WC) (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015). Os fertilizantes inorgânicos são simples, pois estão amplamente disponíveis, se dissolvem facilmente, apresentam uma composição definida, alta taxa de nitrogênio e fósforo e desencadeiam pH moderado no meio (TEW et al., 2006).

A microalga é um microrganismo fotossintetizante, dessa forma fica dispersa na coluna d'água, apresentando diferentes formas de metabolismo energético, o metabolismo fotoautotrófico: utilizando a luz para produzir energia química através do processo de fotossíntese, por exemplo, a luz solar, como fonte de energia, e o carbono inorgânico, por exemplo, o CO₂; o heterotrófico: quando a energia e o carbono são obtidos de fonte orgânica externa, em geral pela oxidação de açúcares; o mixotrófico: quando a fotossíntese e a oxidação de compostos orgânicos ocorrem concomitantemente e o fotoheterotrófico: quando a fonte de energia é a luz e a fonte de carbono são compostos orgânicos. O crescimento microalgal tem normalmente como fonte de carbono o CO₂, mas ainda requer outros nutrientes, especialmente os macros (NPK) e micronutrientes (metais), além de vitaminas, em certos casos. O uso de uma fonte de carbono orgânico possibilita a redução do custo do cultivo de microalgas, reutilizando o excesso de nutrientes encontrados em águas residuais industriais, além do aspecto ambiental.

Diante disso, é grande o potencial de cultivo de microalgas utilizando a vinhaça da cana-de-açúcar, como fonte de nutrientes, acrescida de 1% de NPK, resultando em alta produção de biomassa microalgal. Outros autores relataram sobre a fisiologia da *Chlorella vulgaris* cultivada em 60% de vinhaça convencional e 80% tratada com biodigestão, em experimentos de 6 dias, de forma que os resultados mostraram que *C. vulgaris* cresceu melhor na vinhaça do que nos controles (CANDIDO; LOMBARDI, 2018). Já os resultados de Quintero-Dallos et al. (2019), demonstraram que *C. vulgaris* cultivada em vinhaça apresentaram concentrações máximas (% w / w) de: 48,95% de proteínas, 2,88% de xilose, 7,82% de glicose, 4,54% arabinose, 8,28% frutose e 4,82% lipídios. Sugerindo que a vinhaça é um produto promissor e meio sustentável para o crescimento de *C. vulgaris* e a produção de metabólitos valiosos.

No entanto, não são todas as espécies de microalgas que terão sucesso em se desenvolver em vinhaça. Santana et al. (2017) avaliaram quarenta cepas de microalgas para chegar a duas espécies que apresentaram crescimento vigoroso de forma dependente da luz, mesmo sem diluição da vinhaça em condições não axênicas, sendo elas *Micractinium* sp. Embrapa-LBA32 e *C. biconvexa* Embrapa-LBA40. Estas pesquisas, juntamente com o presente trabalho destacam o potencial do uso de vinhaça de cana-de-açúcar para cultivar microalgas para a produção de energia e bioprodutos. Destacando ainda a singularidade de cada espécie microalgal e a necessidade de avaliá-las individualmente. Alguns pesquisadores têm ainda, combinado o cultivo de microalgas com o tratamento de águas residuais, com excelente produção de lipídios e biomassa,

como também a assimilação de alguns elementos (SOLOVCHENKO et al., 2014; HIGGINS et al., 2016).

O pH do meio de cultivo variou entre 5,02 e 10,71 tanto no tempo amostral quanto no tratamento (Tabela 4.4). Quando o pH foi analisado ao longo do período amostral foi observado que, com exceção do controle, todos os tratamentos apresentaram diferença significativa; quando avaliado em função dos tratamentos observou-se diferença significativa em todos os dias de amostragem do meio.

O pH ótimo para o crescimento das microalgas varia para cada espécie, mas de forma geral está próximo da neutralidade; a este pH, teoricamente pouca energia é necessária para manter a homeostase (IHNKEN et al., 2014), ele é um dos fatores mais importantes no cultivo de microalgas. Ele determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio e influencia direta ou indiretamente o metabolismo das microalgas. No presente experimento a fonte de carbono teve origem somente nos nutrientes (NPK e vinhaça) adicionados ao meio de cultivo, diferente de outras pesquisas que têm injetado o dióxido de carbono continuamente no cultivo de microalgas (ADAMCZYK et al., 2016; MOREIRA et al., 2016; SHABANI et al., 2016).

Cultivada em vinhaça com NPK, *Chlorella sorokiniana* apresentou maior densidade microalgal em pH alcalino. A instabilidade do meio na manutenção do pH demonstra que essas variações possivelmente foram resultado da vinhaça em si, uma vez que nos meios com vinhaça diluída não houve inserção de produtos, apenas água destilada, e mesmo assim notou-se essa instabilidade, enquanto o controle não. O pH do meio de cultura é conhecido por ter grande influência no crescimento e na produção da biomassa de microalgas, uma vez que seu pH citosólico é neutro, ou ligeiramente alcalino, e suas enzimas celulares são sensíveis ao pH e podem se tornar inativas em condições ácidas (TRIPATHI et al., 2015).

Tabela 4. 4 Variação dos valores de potencial hidrogeniônico do meio de cultivo de *Chlorella sorokiniana* ao longo dos 35 dias de cultivo.

Meio de cultivo	Valores de pH em cada dia de cultivo							f	p
	1	7	14	21	28	35			
V1	8,51±0,11 A c	8,74±0,07 AB bc	9,17±0,06 BC a	9,12±0,06 EF ab	8,94±0,08 DEFG ab	9,27±0,16 DEF a	12,33	<0,05	
V2	5,07±0,05 DE c	7,02±0,58 D b	9,39±0,13 AB a	9,31±0,03 DE a	9,30±0,03 CD a	9,62±0,01 CDE a	57,26	<0,05	
V3	5,02±0,04E c	7,38±0,76 BCD b	8,83±0,04 DEF ab	9,08±0,01 EF a	8,79±0 FG ab	9,31±0,01 DEF a	27,52	<0,05	
V4	5,16±0,03DE d	7,22±0,25 CD c	8,93±0,05 CDE b	9,38±0,01 CDE ab	9,31±0,04 CD ab	9,47±0 CDE a	269,69	<0,05	
V5	5,10±0,02DE e	6,97±0,20 D d	8,75±0,06 EFG c	9,24±0,03 DEF b	9,28±0,02 CDE b	9,76±0,03 CD a	419,18	<0,05	
V6	5,53±0,05CDE c	8,45±0,06 ABCD b	8,79±0,10 DEFG ab	9,08±0,08 EF a	8,84±0,13 EFG ab	9,08±0,01 EF a	166,01	<0,05	
V7	5,21±0,01DE d	8,16±0,03 ABCD c	8,59±0,04 FG b	8,81±0,05 FG a	8,76±0,04 G ab	8,79±0,17 F ab	1129,40	<0,05	
V8	5,08±0,01DE c	8,28±0,01 ABCD b	8,20±0,04 H b	8,61±0,10 G a	8,80±0,02 FG a	8,80±0,05 F a	965,70	<0,05	
V9	5,01±0E f	8,17±0,01 ABCD e	8,49±0,01 GH d	8,99±0,01 EFG b	8,81±0,02 FG c	9,24±0,03 DEF a	26037,96	<0,05	
V10	6,57±0,13B d	9,03±0 A c	9,18±0,02 BC c	9,65±0,02 BCD b	9,54±0,07 BC b	10,70±0 A a	392,54	<0,05	
V11	6,06±0,01BC e	8,86±0,05 AB d	9,41±0,04 AB c	9,99±0,01 AB b	10,57±0,06 A a	10,71±0,08 A a	1160,67	<0,05	
V12	5,60±0,01CDE d	8,74±0,03 AB c	9,66±0,01 A b	10,32±0,06 A a	10,28±0,02 A a	10,33±0,08 AB a	4193,12	<0,05	
V13	5,65±0,07CD c	8,55±0,01 ABC b	9,34±0,10 B ab	9,78±0,27 BC a	9,82±0,26 B a	9,86±0,027 BC a	71,10	<0,05	
V14	8,93±0,39 A ns	8,32±0,44 ABCD ns	9,31±0,04 B ns	9,26±0,05 DE ns	9,21±0,05 CDEF ns	9,50±0,05 CDE ns	-	6,5	
f	115,06	5,63	42,94	29,28	44,25	33,50			
P	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05			

V1) vinhaça clarificada com 5 g.L⁻¹ de Hidróxido de cálcio; V2) vinhaça clarificada com 30 g.L⁻¹ de *Moringa oleifera*; V3) vinhaça clarificada com 5 g.L⁻¹ de Tanfloc MT; V4) vinhaça centrifugada (1792g 10min); V5) vinhaça filtrada em filtro de fibra de vidro (0,5µm); V6) 10% de vinhaça diluída V7) 25% de vinhaça diluída; V8) 40% de vinhaça diluída; V9) 50% de vinhaça diluída; V10) 10% de vinhaça diluída+1% de solução estoque de NPK; V11) 25% de vinhaça diluída+1% de solução estoque de NPK; V12) 40% de vinhaça diluída+1% de solução estoque de NPK; V13) 50% de vinhaça diluída+1% de solução estoque de NPK e um controle (V14) preparado com água destilada e NPK 1% (v / v)

*Médias seguidas de mesma letra maiúsculas não diferem estatisticamente entre si, comparando os meios de cultivo, na coluna. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente entre si, dentro de cada meio, entre os dias de cultivo, na linha. Pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dessa forma, *C. sorokiniana* não apresentou alta densidade microalgal em meio contendo vinhaça clarificada, mas sim em vinhaça diluída. Assim, afim de mitigar os impactos ambientais da vinhaça, ela pode ser utilizada no cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana*, diluída a 40% e acrescida de 1% de solução estoque de NPK (20:5:20). Os resultados sugerem novos estudos para a compreensão dos processos químicos pós clarificação necessários para o crescimento ótimo da microalga, criando um impulso para aprimorar essa tecnologia para geração de energia e bioprodutos.

4.6 REFERÊNCIAS

- Adamczyk M, Lasek J, Skawińska A. 2016. CO₂ Biofixation and growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis gaditana*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, 179,7, 1248-61. Doi: 10.1007/s12010-016-2062-3
- Andrade, M. D. R.; Costa, J. A. V. 2008. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. **Ciência E Agrotecnologia**, 32, 5, 1551-1556.
- Andruleviciute, V., Makareviciene, V., Skorupskaite, V., Gumbytė, 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**, 26, 83–90. Doi: 10.1007/s10811-013-0048-x.
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A. 1959. Rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiological**, 27, 8, 911-917. Doi: 10.1139/o59-099
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. 359/360 de 23 de dezembro de 2003. Carboidratos. Diário Oficial República Federativa do Brasil, Brasília dez/jan.2003. Site oficial www.anvisa.gov.br/legis/resol/.../360_03rdc.htm
- Bischoff, H.W., Bold, H. 1963. Phycological Studies IV. Some Soil Algae From Enchanted Rock and Related Algal Specie. **University Of Texas**, Austin, 6318, 1–95.
- Bold, H.C. 1949. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. **Bull. Torrey Botanical Club**. 76, 101–108.
- Candido, C., Lombardi, A. T. 2018. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. **Algal Research**, 30, 79–85. Doi:10.1016/j.algal.2018.01.005
- Carvalho, E. M. De; Ottonelli, F.; Ansilago, M.; Godoy, H. C.; Nakagaki, J. M.; Ramires, I. 2012. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. **Biochemistry And Biotechnology Reports**, 01, 02, 14-18. Doi: 10.5433/2316-5200.2012v1n2p14
- Cazzaniga, S., Dall'osto, L., Szaub, J., Scibilia, L., Ballottari, M., Purton, S. E., Bassi, R., 2014. Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves

light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology For Biofuels**, 7, 157. Doi: 10.1186/s13068-014-0157-z.

Chisti Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends Biotechnology**, 26, 3, 126-31. Doi: 10.1016/j.tibtech.2007.12.002

Chu, S.P. 1942. The influence of mineral composition of the medium of the growth of the planktonic algae. **Journal of Ecology**, 30, 284–325. Doi: 10.2307/2256574

Derner, R. B.; Ohse, S.; Villela, M.; Carvalho, S. M. De; Fett, R. 2006. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, 36, 06, 1959-1967. Doi: 10.1590/S0103-84782006000600050

Dos Santos, R. R., Araújo, O. De Q. F., De Medeiros, J. L., & Chaloub, R. M. 2016. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, 204, 38–48. Doi:10.1016/j.biortech.2015.12.077

Engin, I. K., Cekmecelioglu, D., Yücel, A. M., Oktem, H. A. 2018. Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium* sp. ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 251, 128–134. Doi:10.1016/j.biortech.2017.12.023

Feng, Y., Li, C., Zhang, D., 2011. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, 102, 101–105. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.016

Guilherme, L.R.G.; Marques, J.J.; Pierangeli, M.A.P.; Zuliani, D.Q.; Campos, M.L.; Marchi, G. 2005. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos em ciências do solo**, 4, 345-390. Doi: 10.13140/2.1.4821.1524

Higgins, B. T., Gennity, I., Samra, S., Kind, T., Fiehn, O., Vandergheynst, J. S., 2016. Cofactor symbiosis for enhanced algal growth, biofuel production, and wastewater treatment. **Algal Research**, 17, 308–315. Doi: 10.1016/j.algal.2016.05.024.

Ihnken, S. et al. 2014. Light acclimation and pH perturbations affect photosynthetic performance in *Chlorella* mass culture. **Aquatic Biology**, 22. Doi: 10.3354/ab00586.

Kumar, M.; Sharma, M.P. 2014 Potential assessment of microalgal oils for biodiesel production: A review. **Journal of Materials and Environmental Science**, 5, 3, 757-766.

Lizzul, A. M., Hellier, P., Purton, S., Baganz, F., Ladommatos, N., & Campos, L. 2014. Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. **Bioresource Technology**, 151, 12–18. Doi:10.1016/j.biortech.2013.10.040

Melo, R. G. De, Andrade, A. F. De, Bezerra, R. P., Correia, D. S., Souza, V. C. De, Brasileiro-Vidal, A. C., ... Porto, A. L. F. 2018. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. **Chemosphere**, 204, 344–350, 2018. Doi:10.1016/j.chemosphere.2018.04.039

Moreira, J. B., Terra, A. L. M., Costa, J. A. V., Morais, M. G. 2016. Utilization of CO₂ In semi-continuous cultivation of *spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass

composition. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, 33,3, 691-698. Doi: 10.1590/0104-6632.20160333s20150135

Pulz, O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, 65, 1, 635-648. Doi: 10.1007/s00253-004-1647-x

Quintero-Dallos, V., García-Martínez, J. B., Contreras-Roperro, J. E., Barajas-Solano, A. F., Barajas-Ferrerira, C., Lavecchia, R., & Zuorro, A. 2019. Vinasse as a sustainable medium for the production of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. **Water**, 11,8, 1526. Doi:10.3390/w11081526

Santana, H., Cereijo, C. R., Teles, V. C., Nascimento, R. C., Fernandes, M. S., Brunale, P., ... Brasil, B. S. A. F. 2017. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, 228, 133–140. Doi:10.1016/j.biortech.2016.12.075

Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. 2017. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal Of Biological**, 26, 9, 709-722. Doi:10.1016/j.sjbs.2017.11.003

Shabani, R.; Sayadi, M.H.; Rezaei, M.R. 2016. CO₂ bio-sequestration by *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* in response to different levels of salinity and CO₂. **Proceedings Of The International Academy Of Ecology And Environmental Sciences**, 6, 2,53-61.

Sipaúba-Tavares, L. H., Berchielli-Morais, F. A., & Scardoeli-Truzzi, B. 2015. Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. **Brazilian Journal Of Biology**, 75, 4, 796–803. Doi:10.1590/1519-6984.23013

Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 2003. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2 ed. São Carlos: RiMa. 106.

Solovchenko, A., Pogosyan, S. I., Chivkunova, O. B., Selyakh, I., 2014. Phycoremediation of alcohol distillery wastewater with a novel *Chlorella sorokiniana* strain cultivated in a photobioreactor monitored on-line via chlorophyll fluorescence. **Algal Research**, 6, 234–241. Doi: 10.1016/j.algal.2014.01.002.

Spolaore, P. et al. 2006. Commercial applications of microalgae. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, Osaka, 101, 2, 87-96. Doi: 10.1263/jbb.101.87

Sueoka, N., Chiang, K., & Kates, J. 1967. Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardi*. **Journal Of Molecular Biology**, 25, 1, 47–66. Doi: 10.1016/0022-2836(67)90278-1

Tew, K.S., Conroy, J.D., Culver, D.A., 2006. Effects of lowered inorganic phosphorus fertilization rates on pond production of perch fingerlings. **Aquaculture**, 255, 1-4,436-444. Doi:10.1016/j.aquaculture.2006.01.003.

Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. 2005. **Microbiologia**. 8º Edição, Porto Alegre, 894.

Tripathi, R; Singh, J.; Thakur, I. S. 2015. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. **Renewable Energy**, 74,774-781. Doi: 10.1016/j.renene.2014.09.005

Waltz, E. 2009, Biotech's green gold? **Nature Biotechnology**, 27, 15–18. Doi: 10.1038/nbt0109-15

Wojciechowski, J.; Straube, A.; Cavalcante, K. P. 2013. **Isolamento e cultivo de microalgas**. 80. Doi:10.13140/2.1.3353.3767.

Xu L., Wim Brilman, D. W., Withag, J. A., Brem, G., Kersten, S., 2011. Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: energy balance analysis. **Bioresource Technology** 102, 5113-5122. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.066

CAPÍTULO 5

ANÁLISE DA RELAÇÃO FUNCIONAL ENTRE AS VARIÁVEIS DE QUANTIFICAÇÃO CELULAR DA MICROALGA *Chlorella sorokiniana*

RESUMO: Dada a ampla gama de aplicações da biotecnologia, a pesquisa com microalgas tem se intensificado. O cultivo destes em condições artificiais também aumenta, tornando importante a análise de métodos de quantificação e avaliação da cinética de crescimento. O objetivo deste trabalho foi verificar a existência de uma relação funcional entre as variáveis utilizadas para quantificar a microalga *Chlorella sorokiniana*. Para tanto, a análise de regressão linear foi aplicada às variáveis de densidade celular, densidade óptica e biomassa seca obtida pelo cultivo de microalgas em diferentes concentrações. Usando as equações geradas a partir da análise de regressão para a microalga *C. sorokiniana* foi possível obter valores de densidade celular entre 3 a $38 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ e valores de biomassa seca entre $0,1$ e $4,3 \text{ mg mL}^{-1}$ a partir dos valores de densidade óptica com alta precisão e maior praticidade.

Palavras-chave: Densidade celular, peso seco, densidade óptica.

5.1 INTRODUÇÃO

A quantificação da densidade microalgal em rotinas padrões é realizada por métodos de densidade celular por microscopia (ARAGAW, 2017). Tal técnica permite também observação da taxa de crescimento celular, tal como de mutações citológicas, porém além da demanda de tempo para análise, há perda da precisão quando há diluições na amostra (CORCINI, 2011). Outros métodos de quantificação envolvem o cálculo de massa ou volume, porém demandam longos períodos, apresentando, muitas vezes, procedimentos com vários passos de preparação e mesmo assim, possuem alta probabilidade de erros sistemáticos (RODRIGUES, 2011). Ainda assim, o cálculo de massa ou volume são os mais utilizados para análises quantitativas destes organismos, principalmente quando o interesse é produção e obtenção de biomassa.

Em contrapartida, existem métodos como a quantificação por espectrofotometria, que oferecem maior economia de tempo, menor quantidade de amostra, simplificação do procedimento e baixa probabilidade de erro (SOBRINHO, 2008), a espectrofotometria é uma técnica baseada no grau de absorbância de luz, que permite leitura rápida e de fácil manuseio, vem sendo muito utilizada como metodologia alternativa ao invés de metodologias complexas e dispendiosas. Paschoal et al. (2003), utilizaram a espectrofotometria como alternativa para a cromatografia líquida de alta eficiência e Brito et al. (2013) realizaram monitoramento da qualidade de água residual por espectrofotometria *in situ*. Em experimentos onde, tem-se como objetivo quantificar metabólitos celulares, como é o caso de Barbarino e Lourenço (2005), Marxen et al. (2007) e Leite et al. (2016) a técnica de espectrofotometria já é altamente difundida, enquanto que trabalhos que visam analisar o crescimento microalgal ou velocidade de crescimento predomina-se a utilização da densidade.

A técnica de quantificação de biomassa seca, apesar de ser mais trabalhosa e demandar de mais tempo para a secagem das amostras, ainda é muito utilizada, principalmente quando se tem o objetivo de produção ou caracterização de biomassa como feito por Hosseinizand et al. (2018).

Buscando obter os valores de densidade celular a partir da quantificação microalgal por densidade ótica, para as espécies *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus communis*, *Cryptomonas phaseolus* e *Selenastrum rinoi* Valer e Glock (1998), apresentaram equações que permitem estimar a concentração microalgal a partir de dados de absorbância para densidades celulares entre 10^4 e 10^5 células mL⁻¹. Enquanto Rodrigues et al. (2011), propuseram uma curva de calibração para correlacionar os

valores de absorvância (684 nm) e densidade celular de *Pseudokirchneriella subcapitata* de até 5×10^6 células mL^{-1} . Assim, cada espécie de microalga apresenta características intrínsecas, tornando-se necessários estudos específicos com cada espécies, em altas e baixas densidades celulares. Selecionando entre as técnicas a que apresenta menor custo, simplificação do procedimento, adequação ao escopo do trabalho e às necessidades intrínsecas da unidade de quantificação.

5.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre as técnicas adotadas para estimar densidade celular, densidade ótica e biomassa seca da microalga *Chlorella sorokiniana*.

5.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a relação entre as técnicas adotadas para estimar densidade celular, densidade ótica e biomassa seca da microalga *Chlorella sorokiniana*.
- ✓ Selecionar entre as técnicas a que apresenta menor custo, simplificação do procedimento, adequação ao escopo do trabalho e às necessidades intrínsecas da unidade de quantificação

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas cepas da microalga *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae) adquirida da Fundação André Tosello (Ref. 211-32), cultivada *in vitro* no laboratório do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio) na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS).

A microalga foi cultivada no laboratório em frasco Erlenmeyer de 2.000 mL, e suplementada com fertilizante químico NPK (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2003; CARVALHO et al., 2012) e vinhaça, mantida em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo controlado (12 h luz / 12 h escuro).

Na preparação da solução inicial utilizou-se uma proporção entre 80% e 20% (v/v) do meio de cultivo e o inóculo de microalga, respectivamente. Para suplementação foram adicionados 1% de vinhaça de cana-de-açúcar e 1% da solução estoque de N:P:K, ambas sobre a alíquota total de 2000 mL. A solução estoque NPK foi preparada com 0,70 g.L^{-1} de adubo químico NPK (20:5:20 g.L^{-1}) para cada 1000 mL (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2003).

A partir da solução inicial, foram então preparadas cinco diluições seriada, com três réplicas cada, sempre corrigindo as concentrações dos suplementos NPK e vinhaça. O experimento teve duração de 35 dias, onde coletou-se a cada cinco dias amostras para realizar as respectivas quantificações descritas abaixo.

5.3.1 Quantificação em câmara de Neubauer

Uma alíquota foi retirada de cada tratamento e contada em câmara de Neubauer (hemocítômetro) para obtenção da densidade microalgal.

5.3.2 Quantificação em espectrofotometria

Através do método de varredura, foram tomadas a distribuição espectral da absorbância nas cinco concentrações, num intervalo 200-800nm, a fim de verificar os picos de absorção de luz. Posteriormente tomou-se as leituras de absorbância para cada amostra no comprimento de onda no qual ocorreram os picos de absorção (686nm). O equipamento foi calibrado com “branco”, representado pelo próprio meio de cultivo utilizado na produção microalgal.

5.3.3 Quantificação da biomassa

Para se determinar o peso de biomassa seca, utilizou-se tubos Eppendorf de volume 2 mL previamente secos e tarados. Dessa maneira retirou-se uma alíquota de 2 mL dos respectivos cultivos em duplicata e os mesmos foram repassados para o tubo Eppendorf. As amostras foram submetidas ao processo de centrifugação em micro centrífuga refrigerada a 13500 rpm (18.574 x g) durante 5 min a 5° C. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e os tubos Eppendorfs com a biomassa foram colocados na estufa de circulação *overnight* a 60 °C até obtenção de peso constante (24-48 h). Após a secagem os tubos Eppendorf foram pesados novamente e peso seco foi obtido através da diferença entre peso final e peso inicial.

5.3.4 Análise dos dados

Com o objetivo de verificar a existência de uma relação funcional entre as variáveis utilizadas para quantificação da microalga *C. sorokiniana* empregou-se a análise de regressão linear. A equação gerada pela análise tende a explicar a variação da variável dependente pela variação do(s) nível(eis) da(s) variável(eis) independente(s).

Para verificar a correlação entre as variáveis analisadas utilizou-se o teste não-paramétrico de Spearman com probabilidade de 95% de confiança ($p < 0,05$).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da leitura de absorvância indicaram que o pico máximo variou entre 670 e 690 nm (Figura 5.1). Dessa forma, foi selecionado o comprimento de onda de 686 nm para a realização da leitura de densidade óptica da microalga *C. sorokiniana*.

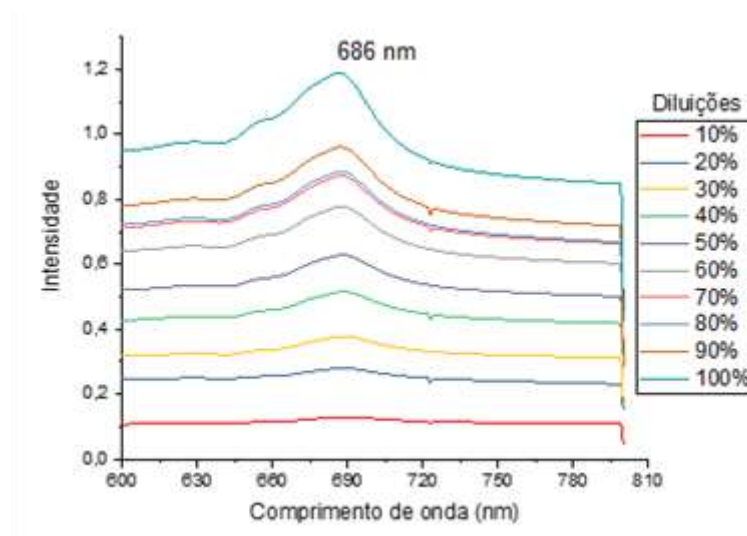


Figura 5. 1 Padrão de absorção de luz para as diluições com *Chlorella sorokiniana* rastreada entre 200 e 800 nm.

Posteriormente foi analisada a regressão linear (R^2) entre as variáveis de densidade óptica, densidade celular e biomassa seca. Os resultados indicaram a melhor regressão linear entre a densidade óptica do cultivo de *Chlorella sorokiniana* com a densidade celular, seguido por densidade celular com biomassa seca, e densidade óptica com biomassa seca (Figura 5.2). Todos os cruzamentos apresentam correlação significativa pelo teste de Spearman, com probabilidade de 95% de confiança ($p < 0,05$): densidade óptica com densidade celular apresentou a maior correlação ($r = 0,96$; $p < 0,05$), seguido por densidade celular x biomassa seca ($r = 0,87$; $p < 0,05$) e densidade óptica x biomassa ($r = 0,75$; $p < 0,05$). A partir destes resultados é possível obter a mensuração da densidade microalgal, densidade celular e biomassa da microalga *C. sorokiniana* a partir de somente uma técnica de mensuração, com maior confiança entre densidade óptica para densidade celular e vice-versa.

A regressão linear gerou as seguintes equações:

Para regressão da densidade óptica para densidade celular (número células x 10⁵ m L⁻¹)

$$DC = (15,602 \cdot N_{DO}) + 5,1905$$

Equação 5.1

Onde: 15,602 é a constante de regressão; N_{DO} é a variável independente (densidade óptica), 5,1905 é o coeficiente de regressão.

Para regressão de densidade celular para densidade óptica

$$DO = (0,0598 \cdot N_{DC}) - 0,2556$$

Equação 5.2

Onde: 0,0598 é a constante da regressão; N_{DC} é a variável independente (densidade celular). 0,2556 é o coeficiente de regressão. $y = 0.0598x - 0,2556$

Para regressão de biomassa seca (g.L⁻¹) para densidade celular

$$DC = (0,0843 \cdot N_{BS}) - 0,0758$$

Equação 5.3

Onde: 0,0843 é a constante da regressão; N_{BS} é a variável independente (biomassa seca). 0,0758 é o coeficiente de regressão. $y = 0.0843x - 0.0758$

Para regressão de densidade celular para biomassa seca

$$BS = (10,109 \cdot N_{DC}) + 3,582$$

Equação 5.4

Onde: 10,109 é a constante da regressão; N_{DC} é a variável independente (densidade celular). 3,582 é o coeficiente de regressão. $y = 10,109x + 3,582$

Para regressão de densidade óptica para biomassa seca

$$BS = (1,999 \cdot N_{DO}) + 0,2531$$

Equação 5.5

Onde: 1,999 é a constante da regressão; N_{DO} é a variável independente (densidade óptica). 0,2531 é o coeficiente de regressão. $y = 1,999x + 0,2531$

Para regressão de biomassa seca para densidade óptica

$$DO = (0,6116 \cdot N_{BS}) + 0,1027$$

Equação 5.6

Onde: 0,616 é a constante da regressão; N_{BS} é a variável independente (biomassa seca). 0,1027 é o coeficiente de regressão. $y = 0,6116x + 0,1027$

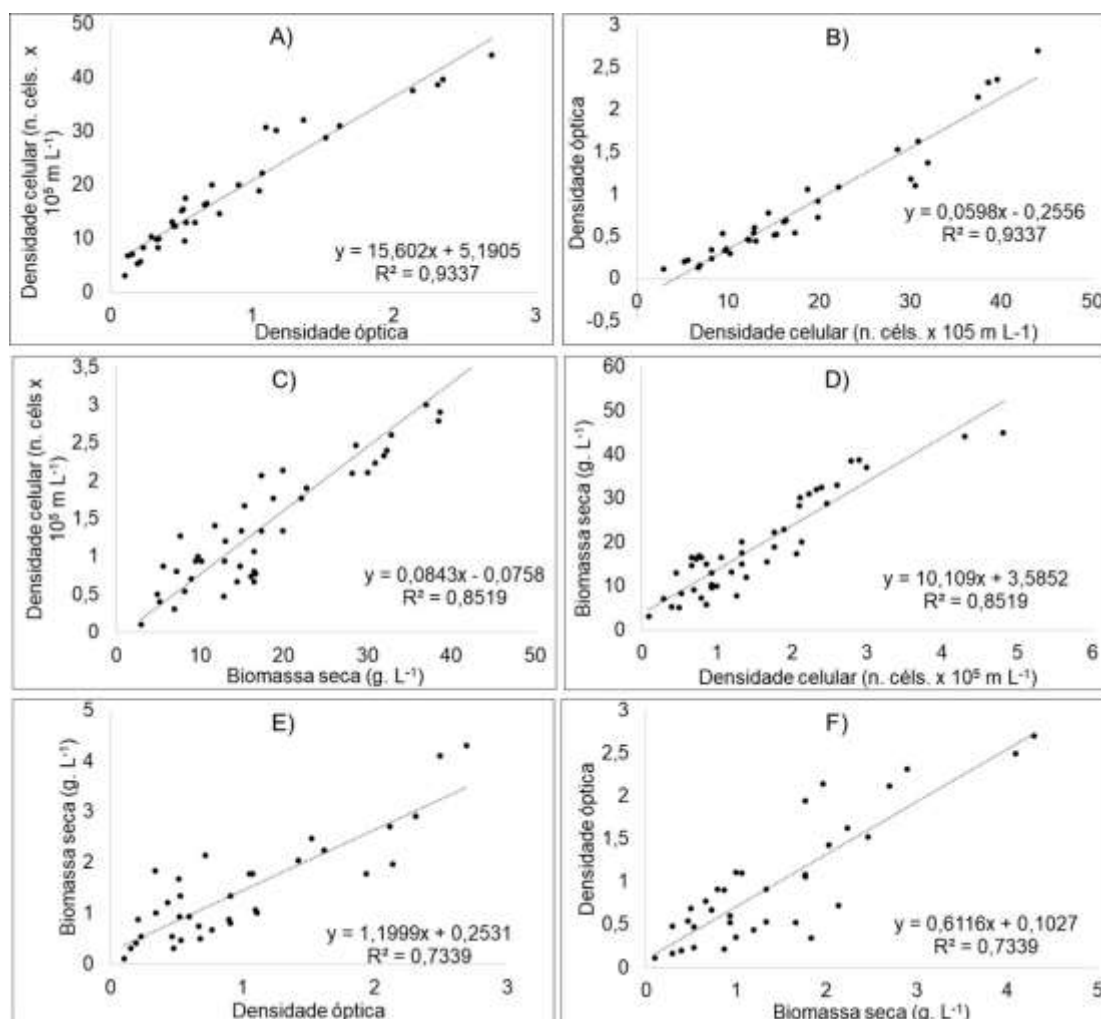


Figura 5. 2 Correlação entre as variáveis. A) densidade óptica (absorbância 686nm) x densidade celular (n° células $\times 10^5 \text{ m L}^{-1}$); B) densidade celular x densidade óptica; C) biomassa seca (g. L^{-1}) x densidade celular; D) densidade celular x biomassa seca; E) densidade óptica x biomassa seca; F) biomassa seca x densidade óptica.

Quando a absorbância espectrofotométrica é a técnica escolhida, é comum verificar a adoção do comprimento de onda de 750 (*e.g.* EPA, 1994; EATON et al., 1995). Entretanto, valores de 687 nm (VALER; GLOCK, 1998), 684 nm (RODRIGUES et al., 2011) e 686 nm (DZIOSA; MAKOWSKA, 2016) também sejam verificados na literatura. De qualquer forma, todos estes valores de leitura estiveram representados dentro do comprimento de onda estimado no presente trabalho.

Para se estimar a quantificação microalgal podem ser incluídas técnicas como contagens celulares diretas, quantificação de biomassa seca e a densidade óptica por absorbância em espectrofotometria. No entanto, algumas técnicas exigem mais tempo,

esforço e apresentam maior probabilidade de erro. Entre as técnicas apresentadas, a densidade óptica permite analisar um número maior de amostras, demandando menos trabalho e menor probabilidade de erro. No entanto, as estimativas mais empregadas na literatura são biomassa seca e densidade celular.

Com base nos resultados supracitados será possível comparar os dados da produção microalgal com diferentes dados da literatura. A densidade óptica é uma metodologia que já tem sido utilizada para a quantificação de parâmetros de crescimento de cepas de microalgas (CEREIJO et al., 2015; BAUMGARTNER et al., 2013; RODRIGUES et al., 2011). Neste trabalho corroboramos que a quantificação através da densidade óptica é correspondente às outras técnicas utilizadas, como a densidade celular ou a biomassa seca. Esta técnica pode ser usada para simplificar a aquisição dos dados usados para preparar inóculo para uma cultura inicial ou estimar a produtividade da biomassa de microalgas (CEREIJO et al., 2015). No entanto, para que esta técnica seja viável é necessário um espectrofotômetro nas proximidades do local de cultivo, o qual poderá requerer um investimento inicial.

Apesar das vantagens e desvantagens de cada técnica de quantificação, o que vai demandar sua utilização é o tipo de aplicação que se deseja da microalga. Nas pesquisas recentes realizadas com microalgas em cultivo em laboratório verifica-se que tanto os métodos de quantificação por densidade celular em câmara de Neubauer (densidade) quanto métodos indiretos como leitura em espectrofotometria (densidade óptica) e peso seco (biomassa), são importantes para validar os resultados.

A densidade celular é uma técnica de baixo custo, mas a desvantagem é que pode ser exaustivamente trabalhosa e pode apresentar maior variabilidade de erro. Dependendo do tipo de contaminante utilizado no ensaio ou até mesmo mudanças na temperatura poderá ocorrer uma aglutinação das células de microalgas levando a uma superestimação ou subestimação da densidade celular. Além disso, para a contagem das células é necessário o investimento de um bom microscópio binocular, câmara de Neubauer (hemocitômetro) e mão de obra com treinamento em microscopia.

Já a quantificação através da biomassa seca exige considerável tempo e trabalho, uma vez que as amostras devem ser preparadas e totalmente secas. A microalga em suspensão deve passar por centrifugação para separação do sobrenadante e secar em estufa a 60°C por aproximadamente 24 horas até peso constante. Devido a sequência de processos poderá ocorrer erros desde o preparo do recipiente da microalga para centrifugação e secagem, o qual deve estar previamente tarado e pesado, até mesmo por

interferências no tempo para secagem e troca de amostras, diminuindo assim a exatidão da técnica. Além disso, é preciso ter como investimento uma balança analítica de precisão, centrífuga e estufa de secagem.

Com os resultados obtidos foi possível inferir que a regressão linear entre densidade celular e densidade óptica apresentou elevada correlação, indicando menor probabilidade de erro. Assim, torna-se possível substituir a técnica de densidade celular pela densidade óptica. A transformação dos valores se dá através da equação de regressão, permitindo realizar a quantificação microalgal a partir da densidade óptica, com rapidez e segurança (VALER; GLOCK, 1998). Apesar da menor correlação entre biomassa seca e densidade óptica, o valor ainda é significativo e a equação de regressão linear pode ser utilizada para a quantificação por densidade óptica, em detrimento da biomassa seca. O processo para se obter a biomassa seca de microalgas é demorado, além de mais caro, pois requer uma grande quantidade de energia (HOSSEINIZAND et al., 2018). De acordo com Silva et al. (2007), ao correlacionarem a densidade celular em hemocítmetro com a contagem eletrônica a partir de plaquetas em esfregaço, foi obtido índice de correlação de $r: 0,60$, o qual consideraram esse valor como confiável. No entanto, nosso menor índice de correlação ainda foi superior aos valores encontrados pelos autores supracitados.

Utilizando as equações geradas a partir da análise de regressão para a microalga *Chlorella sorokiniana* é possível obter valores da densidade celular entre 3 a $38 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ a partir da densidade óptica e valores de biomassa seca entre $0,1$ e $4,3 \text{ mg mL}^{-1}$ a partir também dos valores de densidade óptica com alta precisão. Valores fora desse espectro podem apresentar um erro maior, o qual requer novas análises.

Dessa forma foi possível obter uma relação funcional por regressão linear para as três técnicas de quantificação da concentração de microalgas: densidade celular, densidade óptica e biomassa seca. Assim, foi possível quantificar as microalgas através de uma técnica e transformar tais valores através das equações geradas pela regressão linear.

Dentre as técnicas apresentadas, a densidade óptica se mostrou a mais apropriada em função da praticidade e rapidez na manipulação das amostras e obtenção dos valores em menor tempo. Diante dos resultados foi possível estimar valores de densidade celular e biomassa microalgal seca utilizando-se apenas a técnica por espectrofotometria para obtenção da densidade óptica.

5.5 REFERÊNCIAS

- Aragaw, T. A.; Asmare, A. M. 2017. Experimental Identifications of Fresh Water Microalgae Species and Investigating the Media and PH Effect on the Productions of Microalgae. **Journal Of Environmental Science And Technology**, 5, 124-131.
- Barbarino, E.; Lourenço, S. O. 2005. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro-and microalgae. **Journal Of Applied Phycology**, 17, 5. 447-460. Doi: 10.1007/s10811-005-1641-4
- Baumgartner, T. R. S.; Burak, J. A. M.; Kogikoski, M.E. Sebastien, N. Y.; Arroyo, P. A. 2013. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira De Biociências**, Porto Alegre, 11, 2, 250-255.
- Brito, R. S.; Ferreira, F.; Lourenço, N. D.; Pinheiro, H. M.; Matos, J. S. 2013. Espectrofotometria para monitorização da qualidade de água residual em drenagem urbana. Recursos Hídricos. **Associação Portuguesa Dos Recursos Hídricos**, 34, 01. Doi: 10.5894/rh34n1-1
- Carvalho, E. M. De; Ottonelli, F.; Ansilago, M.; Godoy, H. C.; Nakagaki, J. M.; Ramires, I. 2012. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. **Biochemistry And Biotechnology Reports**, 01, 02. Doi: 10.5433/2316- 5200.2012v1n2p14
- Cereijo; C. R.; Santana; H.; Siqueira, F. G.; Brasil, B. 2015. Spectrophotometry as a Method for Microalgae Cultivation Analysis. **Anais do IV SOLABIAA**, 2015.
- Corcini, C. D.; Junior, A. S. V.; Pigozzo, R.; Bongalhardo, D. C.; Junior, L. T. 2011. Comparação de diferentes diluentes na mensuração da concentração espermática de suínos em espectrofotômetro Comparison of different diluents to measure swine sperm concentration on the spectrophotometer. **Semina: Ciências Agrárias**, 32, 1, 1965-1968. Doi: 10.5433/1679-0359.2011v32Suplp1965
- Dziosa, K.; Makowska, M. 2016. Monitoring of *Chlorella* sp. growth based on the optical density measurement. **Problemy Eksploatacji. Maintenance Problems** 2, 197-206.
- Eaton, A.D.; Clesceri, L.S; Greenberg, A.E. 1995. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. ed. American Public Health Association, Washington. 19
- Environmental Protection Agency (EPA) 1994. United States. Shortterm methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3^a ed. Cincinnati, OH.: U.S. Environmental Protection Agency, EPA 600/4-91/002.
- Hosseinizand, H.; Sokhansanj, S.; Jim Lim, C.2018. Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. **Drying Technology**, 36 9, 1049-1060. Doi: 10.1080/07373937.2017.1369986

Leite, G. B.; Paranjape, K.; Hallenbeck, P. C. 2016. Breakfast of champions: fast lipid accumulation by cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* induced by xylose. **Algal Research**, 16, 338-348. Doi: 10.1016/j.algal.2016.03.041

Marxen, K.; Vanselow, K. H.; Lippemeier, S.; Hintze, R.; Ruser, A. Hansen, U. P. 2007. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. **Sensors**, 7, 10, 2080-2095. Doi: 10.3390/s7102080

Paschoal, L. R.; Ferreira, W. A.; Prado, M. R. D.; Vilela, A. P. O. 2003. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas**, 39, 1, 105-113. Doi: 10.1590/S1516-93322003000100011

Rodrigues, L. H.; Arenzon, A.; Raya-Rodriguez, M. T.; Fontoural, N. F. 2011. Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Journal Of Environmental Chemistry And Ecotoxicology**, 3, 8. Doi: 10.5897/JECE2011.025

Silva, P. F. N.; Balarin, M. R. S.; Maruchi, H. P.; Flaiban, K. K. M. C.; Rodrigues Moroz, L. R. 2007. Correlação entre o hemocítômetro e outras técnicas de rotina para a contagem do número de plaquetas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL). **Seminário: Ciências Agrárias**, 28, 4.

Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 2003. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2 ed. São Carlos: RiMa.106.

Sobrinho, T. J. D. S. P.; Da Silva, C. H. T. P.; Do Nascimento, J. E.; Monteiro, J. M.; De Albuquerque, U. P.; De Amorim, E. L. C. 2008. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas**, 44, 4. Doi: 10.1590/S1516-93322008000400015

Valer, R.M., Glock, L. 1998. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 11, 2, 149 – 156.

CAPÍTULO 6

TRANSESTERIFICAÇÃO ETÍLICA *in situ* A PARTIR DA BIOMASSA DE *Chlorella sorokiniana*

RESUMO: Como uma solução promissora para atender as necessidades de energia e combustíveis tem-se as microalgas, organismos microscópicos unicelulares e fotoautotróficos encontrados principalmente em ambientes aquáticos. Para se obter biodiesel sustentável e limpo, com viabilidade comercial, mais ênfase deve ser dada aos solventes verdes e técnicas de extração mais ecológicas, como menor uso de solvente, melhoria na qualidade do biocombustível e redução da energia e tempo das etapas de processamento. Assim, o objetivo foi realizar a transesterificação etílica *in situ* da biomassa seca da microalga *Chlorella sorokiniana*. A identificação e quantificação dos ácidos graxos foi realizada através de cromatografia gasosa e as propriedades dos ésteres etílicos foram determinadas por equações empíricas. Assim, os ésteres etílicos produzidos através da transesterificação etílica *in situ* da biomassa de *Chlorella sorokiniana*, com a melhor relação entre ácidos graxos saturados em maior quantidade e poli-insaturados em menor quantidade, como é preferível, em 12h de reação com ultrassom, apresentando 24,34% de ácidos graxos saturados, 56,63% de ácidos graxos monoinsaturados e 18,95% de ácidos graxos poli-insaturados. Quanto as propriedades avaliadas empiricamente, a maioria atendeu os padrões de controle de qualidade do biodiesel.

Palavras-chave: microalga, ácidos graxos, éster etílico, biodiesel, etanolise.

6.1 INTRODUÇÃO

Como uma solução promissora para atender as necessidades de energia e combustíveis tem-se as microalgas, organismos microscópicos unicelulares e fotoautotróficos encontrados principalmente em ambientes aquáticos. As microalgas podem ser utilizadas como matéria prima de terceira geração para a obtenção de biocombustíveis. Elas apresentam cultivo simples, com rápido crescimento, elevada produtividade de biomassa e alto teor lipídico, podem ser cultivadas em águas residuais e em áreas pequenas, em regiões onde a terra já não possui capacidade em gerar outros produtos, sendo assim não compete com a produção de alimentos (BOROWITZKA et al 2012).

Os lipídios, na forma de triacilglicerol, são transformados em biodiesel. Os teores de lipídios de microalgas encontrados na literatura podem variar, os gêneros relatados como aqueles com maior o conteúdo lipídico são *Chlorella* sp., de 20% a 30%; *Dunaliella* sp., de 17,5% a 67%, e *Scenedesmus* sp., de 11% a 55% (ISLAM et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; SYDNEY et al., 2011). Apresentam em sua composição ácidos graxos de 14 a 22 átomos de carbono, que é semelhante aos óleos vegetais utilizados na produção de biodiesel, além das características físicas e químicas semelhantes aos de biomassas tradicionais e do diesel, porém com um impacto ambiental significativamente menor do que o diesel derivado de fósseis (ADESANYA et al., 2014).

A transesterificação *in situ* é uma alternativa para a produção de biodiesel a partir de biomassa microalgal em etapa única. Nesse processo, a biomassa é misturada com um solvente na presença de um catalisador adequado por um certo período de tempo e em determinada temperatura. Esse processo, portanto, minimiza o uso de grande quantidade de solventes, reduz os tempos de processamento e reduz os riscos ambientais e de saúde. Sorgatto et al. (2019) um método aprimorado de transesterificação *in situ* adequado para a análise quantitativa de múltiplas amostras secas quanto ao seu teor de ácidos graxos, usando uma quantidade mínima de biomassa e reagentes.

Metanol é o solvente mais utilizado na produção de biodiesel, porém é tóxico e de fonte não sustentável, já o etanol apresenta diversas vantagens, pois é biodegradável, apresenta baixa toxicidade (comparado com o metanol), e a substituição do metanol como solvente não afeta o rendimento de ácidos graxos (D'OCA et al., 2011a, 2011b). Foram observados em *Chlorella* sp. rendimentos semelhantes de ácidos graxos com 11,6% na transesterificação *in situ* com etanol e 11,0% transesterificação convencional com metanol (LEMÕES et al., 2016). Assim, o uso de solventes verdes para a produção de

biocombustíveis a partir de biomassa microalgal é decisiva para um sucesso econômico, produção ambiental e social de múltiplos produtos em detrimento de processos, sob o conceito de biorrefinaria (MENEGAZZO e FONSECA, 2019).

Quanto aos métodos de rompimento celular e extração de lipídios, o desempenho do ultrassom como método de pré-tratamento proporciona resultados satisfatórios para algumas espécies de microalgas. Em estudo utilizando *Chlorella* sp., *Nostoc* sp. e *Tolypothrix* sp. foram testados diferentes métodos de rompimento celular para extração de lipídios, o ultrassom se apresentou como melhor sistema (PRABAKARAN e RAVINDRAN, 2011). Já para *Chlorella pyrenoidosa* não houve diferença significativa quando utilizado agitação e ultrassom assistido pela mistura clorofórmio:metanol 2:1 (D'OCA, et al., 2011b).

Alguns autores avaliaram a produção de biodiesel de microalgas utilizando catalisadores alcalinos convencionais, e estes não foram adequados à transesterificação dos lipídios de microalgas devido a reação paralela de saponificação que ocorre em decorrência dos elevados teores de ácidos graxos livres (MIAO et al., 2006; SUALI et al., 2012). A transesterificação *in situ* a partir de biomassa microalgal exige um catalisador com carga mais alta quando comparada à transesterificação de óleos extraídos (CHEN et al., 2015). Assim, para microalgas, a catálise ácida é geralmente usada (RAWAT et al., 2013; HALIM et al., 2011).

Quanto as propriedades do biodiesel, o padrão de qualidade americano, elaborado pela ASTM (*American Society of Testing and Materials*), através da norma ASTM D6751, e o estabelecido na União Europeia através da norma EN 14214 do Comitê Europeu de Normalização (*Comité Européen de Normalisation* - CEN) figuram como os mais conhecidos e são geralmente usados como referência ou base para outros padrões no controle de qualidade do biodiesel (KNOTHE, 2006). Assim, no Brasil o Regulamento Técnico da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) nº 45 de 2014 dispõe sobre a especificação do biodiesel e as obrigações quanto ao controle da qualidade, com base nas normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), nas normas internacionais da "*American Society for Testing and Materials*" (ASTM), da "*International Organization for Standardization*" (ISO) e do "*Comité Européen de Normalisation*" (CEN).

É necessário obter biocombustíveis que atendam aos padrões de qualidade, que sejam sustentáveis e limpos, com viabilidade comercial, portanto mais ênfase deve ser dada aos solventes verdes e técnicas de extração mais ecológicas, como menor uso de

solvente, melhoria na qualidade do biocombustível, redução da energia e tempo das etapas de processamento. Dessa forma, o uso do etanol na transesterificação *in situ* da biomassa microalgal tornará o processo mais ecológico e com o uso do ultrassom espera-se maior eficiência na reação, com a quebra da estrutura celular que permitirá maior liberação de lipídios.

6.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o processo de transesterificação etílica *in situ* da biomassa seca da microalga *Chlorella sorokiniana*.

6.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a composição dos ácidos graxos a partir da transesterificação etílica *in situ* da microalga *Chlorella sorokiniana*;
- ✓ Verificar as características empíricas dos ésteres etílicos obtidos por transesterificação etílica *in situ* da microalga *Chlorella sorokiniana*.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 Obtenção da biomassa microalgal

Foi utilizada cepa da microalga *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae) adquirida da Fundação André Tosello (Ref. 211-32), que após recebida foi cultivada *in vitro* no Laboratório de Bioengenharia da UFGD. Para tal, utilizou-se meio definido (SUEOKA et al., 1967) em galões de polipropileno, com aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo controlado (12 h luz / 12 h escuro), a colheita microalgal foi realizada durante a fase estacionária. A biomassa foi separada por eletrofloculação e depois liofilizada.

6.3.2 Transesterificação *in situ*

O biodiesel foi produzido a partir da transesterificação etílica *in situ* da biomassa de *Chlorella sorokiniana* de acordo com a metodologia proposta por Sorgatto et al. (2019), com adaptações. A reação foi realizada mantendo a proporção: 1:20 (p / v) com 0,1 g de biomassa seca em 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 0,2 mol. L^{-1}) em etanol. As suspensões foram submetidas ao ultrassom (40 khz) por 30 min. (T1, T2, T4, T6), enquanto que T3, T5 e T7 não foram submetidos ao ultrassom. Todas as amostras foram

agitadas por 2 min e submetidas a aquecimento sob a temperaturas de 70°C em *dry block*, com exceção do T1 que após a ultrassom a reação já foi concluída (Figura 6.1). A reação foi catalisada em tubos de vidro de 15ml, fechados e bem lacrados, submetidos a vórtice periodicamente (3 min a cada 4h). A cada 4h a amostra em triplicata de cada tratamento foi retirada, até completar 20h de reação, sendo T2 e T3- 4h; T4 e T5-12h; T6 e T7-20h (Figura 6.2).

Depois que as reações foram concluídas, as suspensões foram resfriadas à temperatura ambiente e misturadas com 2 ml de água destilada para aumentar a polaridade da fase etanólica e para dissolver o excesso de ácidos e glicerol. Foram adicionados 4 mL de solvente (hexano) e os tubos centrifugados a 2.688 g por 10 min para acelerar a separação de fases. A camada superior, que contém os FAEE, foi extraída e submetida a filtração em filtro de fibra de vidro ($0,5\mu\text{m}$) para a análise cromatográfica.

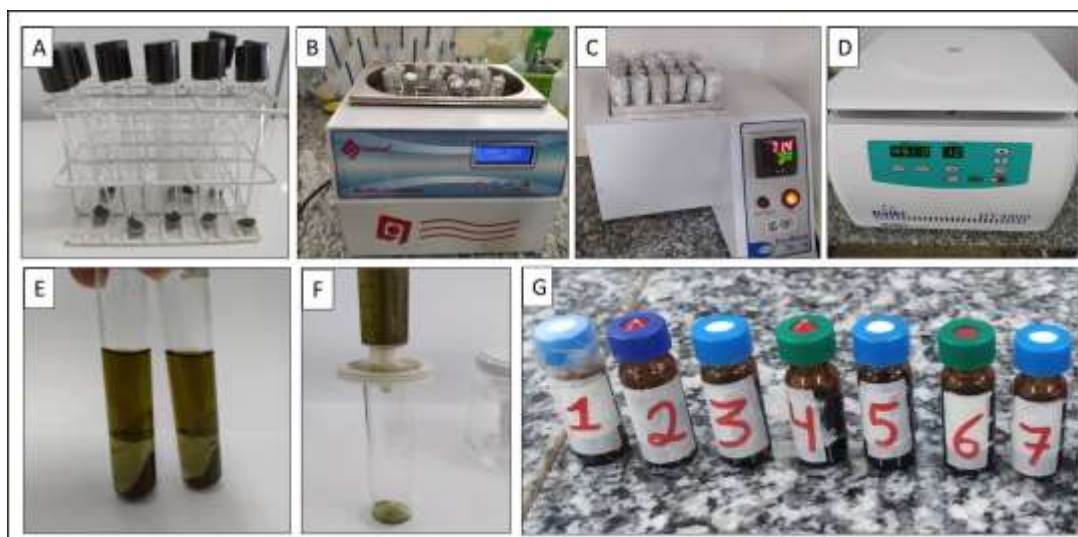


Figura 6. 1 Etapas da produção do biodiesel. A) biomassa de microalgas em tubo de ensaio; B) suspensões submetidas ao ultrassom; C) amostras em aquecimento sob temperaturas de 70°C em *dry block*; D) amostras sendo centrifugadas para acelerar a separação de fases; E) separação de fases; F) filtração da amostra e G) armazenamento das amostras em vials

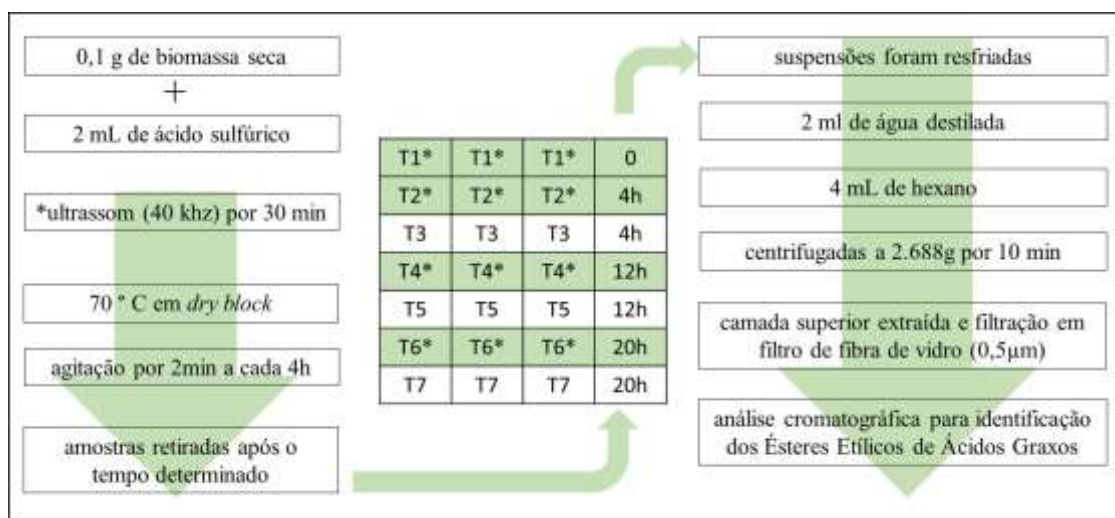


Figura 6. 2 Fluxograma metodológico da transesterificação in situ etílica a partir da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana*.

6.3.3 Derivatização

Foi realizada a derivatização dos óleos utilizando metanol e ácido para-tolueno sulfônico (PTSA). A mistura reacional foi colocada num agitador térmico em tubos Falcon de 15 mL e mantidos a 60 °C durante 1h. Em seguida, foi adicionado certa quantidade de água deionizada e hexano (a baixo), e o sobrenadante (fração apolar) foi coletada. A fração orgânica foi aquecida para a remoção do hexano, por fim, o conteúdo restante (determinação do perfil lipídico) foi analisado por cromatografia em fase gasosa (CG).

Quantidades:

- Óleo vegetal: 0,6 g
- PTSA: 0,036 g
- Metanol: 1 mL
- H₂O: 1,5 mL
- Hexano: 1,5 mL

6.3.4 Análise cromatográfica

6.3.4.1 Equipamento

Todas as análises foram realizadas num cromatógrafo a gás da Shimadzu modelo GC 2010, com detecção por ionização de chama (FID) e amostrador automático (AOC-20i). Para a análise foi usada a coluna cromatográfica CARBOWAX-20M (0,32 mm x 0,25 µm x 30 m).

6.3.4.2 Preparo da amostra

A um frasco de vidro de 10 mL foram adicionados cerca de 100 mg da amostra de biodiesel (óleo derivatizado), em seguida, foi adicionado ao mesmo frasco 10 mL de tolueno (solvente). Após a homogeneização, 1 µL da amostra foi injetada no cromatógrafo, e, após a eluição dos picos, procedeu-se a identificação dos mesmos através de uma curva de calibração previamente injetada no cromatógrafo, contendo uma série de ésteres distintos.

6.3.5 Predição de propriedades do biodiesel

A composição de ácidos graxos foi detalhada e utilizada para determinar as características do biodiesel como grau de instauração (GI), número de cetano (NC), índice de iodo (II), índice de saponificação (IS), ponto de nuvem (PN), ponto de entupimento de filtro à frio (PEFF), poder calorífico (PC), viscosidade cinemática (V) e densidade (D). Todas estas propriedades de combustível foram determinadas por equações empíricas e a precisão e a confiabilidade dessas equações já foram comprovadas (TALEBI et al., 2014, SHEKH et al., 2015, RAMOS et al., 2009).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da transesterificação etílica *in situ* da biomassa de *Chlorella sorokiniana*, os ácidos graxos foram identificados e quantificados através de análise cromatográfica e as frações em massa foram normalizadas a porcentagem a partir do total de ácidos graxos.

A transesterificação *in situ* minimiza o tempo de processamento por eliminar a etapa de extração do óleo, que ocorre simultaneamente no processo, dessa forma, a produção de biodiesel com o uso do ultrassom promoveu maior eficiência, pela maior quantidade de AGMI quando comparados ao tratamento sem ultrassom. A ação das ondas ultrassônicas se propaga em meio líquido e em ciclos de alta e baixa pressão, onde microbolhas a vácuo são produzidas nos ciclos de baixa pressão e, em seguida, colapsam durante o ciclo de alta pressão, resultando em cavitação, que quebra mecanicamente a estrutura celular, permitindo a liberação de lipídios (MUBARAK et al., 2015; NETO et al., 2013), potencializando a transesterificação *in situ*.

O perfil de ácidos graxos do biodiesel de *C. sorokiniana* mostrou diferentes composições de acordo com o tempo de reação e com pré-tratamento (ultrassom ou não), com predominantemente maior porcentagem dos ácidos graxos C16 ao C18. De forma geral, foram observadas as cadeias carbônicas C16:0 (20,27 a 10,93%), C 17:0 (2,14 a

1,02%), C 18:0 (7,04 a 2,84%), C18:1n9c (50,05 a 16,52%), C18:2n6c (35,42 a 15,80%) e C18:3n3 (33,94 a 2,55%). As cadeias carbônicas C14:0, C20:4n6, C22:0, C24:0 e C24:1 não excederam a 3% cada uma e C 22:6n3 não excedeu 10% (Tabela 6.1).

Tabela 6. 1 Composição de ácidos graxos obtidos a partir da transesterificação etílica in situ da biomassa seca da microalga *Chlorella sorokiniana*.

Ácidos Graxos	Tempo de reação (horas)							
	0		4		12		20	
	Com ultrassom	Com ultrassom	Sem ultrassom	Com ultrassom	Sem ultrassom	Com ultrassom	Sem ultrassom	
C 14:0	-	2,41±0,02	1,18±0,01	2,18±0,01	-	-	1,39±0,04	
C16:0	12,32±0,06	13,81±0,02	12,87±0,02	14,09±0,02	10,93±0,01	20,27±0,02	11,79±0,05	
C16:1	1,76±0,04	4,88±0,04	3,04±0,02	5,25±0,03	4,64±0,01	2,84±0,02	5,38±0,02	
C17:0	-	1,02±0,01	1,30±0,02	-	2,14±0,03	-	-	
C18:0	4,22±0,01	5,00±0,03	4,42±0,02	6,33±0,02	2,84±0,02	7,04±0,02	5,40±0,04	
C18:1n9c	17,49±0,08	30,20±0,03	36,76±0,05	50,05±0,04	16,52±0,01	28,18±0,01	41,58±0,03	
C18:2n6c	22,95±0,02	15,80±0,02	24,50±0,05	16,11±0,03	16,22±0,02	35,42±0,01	19,72±0,02	
C18:3n3	33,94±0,03	21,46±0,01	11,15±0,03	2,55±0,04	28,06±0,01	4,59±0,01	13,35±0,06	
C20:4n6	1,11±0,02	1,02±0,01	1,30±0,03	0,29±0,02	1,72±0,01	0,88±0,01	0,45±0,04	
C22:0	1,08±0,01	1,08±0,01	0,75±0,01	0,54±0,02	2,53±0,01	0,80±0,02	0,29±0,03	
C22:6n3	0,84±0,01	0,82±0,01	0,50±0,01	-	9,55±0,01	-	0,22±0,02	
C24:0	2,92±0,01	-	1,83±0,02	1,22±0,02	-	-	0,57±0,02	
C24:1	1,30±0,03	-	-	1,36±0,1	-	-	-	
AGS	20,54±0,05	23,31±0,01	22,33±0,03	24,34±0,01	18,44±0,02	28,10±0,06	19,43±0,01	
AGMI	20,55±0,10	35,08±0,01	39,79±0,03	56,63±0,04	21,16±0,01	31,02±0,04	46,96±0,01	
AGPI	58,83±0,08	39,11±0,01	37,45±0,04	18,95±0,09	55,55±0,01	40,89±0,04	33,73±0,14	
NI	-	-	0,43±0,01	-	4,81±0,11	-	-	

C 14:0- ácido mirístico; C16:0- ácido palmítico; C16:1- ácido palmitoléico; C17:0- ácido heptadecenóico; C18:0- ácido esteárico; C18:1n9c- ácido oleico; C18:2n6c- ácido linoleico; C18:3n3- ácido linolênico; C 20:4n6- ácido araquidônico; C 22:0- ácido behênico; C 22:6n3- ácido docosa-hexaenóico; C 24:0- ácido lignocérico; C 24:1- ácido nervônico. AGS: Ácido graxo saturado; AGMI: Ácido graxo monoinsaturado; AGPI: Ácido graxo poli-insaturado. NI: não identificado

Os ácidos graxos identificados e quantificados, palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9c) e linoleico (C18:2n6c) são reconhecidos como os principais ácidos graxos no biodiesel (KNOTHE, 2005). A presença de ácidos graxos monoinsaturados na mistura de biodiesel melhora a estabilidade oxidativa e o desempenho a baixas temperaturas. Os ácidos graxos saturados na mistura aumentam o índice cetano e a estabilidade do biodiesel (RAMOS et al., 2009; ASHRAFUL et al., 2014).

A composição de ésteres etílicos obtidos entre os tempos de reação analisados, apresentaram a maior porcentagem de ácidos graxos saturados (AGS) em 20h de reação com pré-tratamento no ultrassom com 28,05% de AGS, enquanto que sem a utilização do ultrassom apresentaram apenas 19,42% de AGS. Quanto aos valores de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), em 12h de reação com ultrassom apresentaram 56,63%, mais que o dobro da quantidade sem ultrassom (21,15%), os menores valores para os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) com 18,95%, também foram quantificados em 12h de reação com ultrassom (Tabela 6.1).

Há na literatura poucas pesquisas de transesterificação etílica microalgal para corroborar com os resultados do presente trabalho (BATISTA et al., 2018; JAZIE et al., 2019; GUMBYTE et al., 2013; LEMÕES et al., 2016; SORGATTO et al., 2019; TOBAR e NÚNEZ 2018). Através da transesterificação etílica convencional de *Chlorella* sp. aplicando um método enzimático, Gumbyte et al. (2013), identificaram ácidos graxos com as seguintes cadeias carbônicas: C 14:0 0,31%, C16:0 31,09%, C16:1 2,28%, C17:0 0,47% C 18:0 4,11%, C18:1 43,01% C18:2 10,95% e C18:3 6,03%, C20:0 0,57%, C20:1 0,51%, C22:0 0,24% e C 24:1 0,02%, o conteúdo de AGS de 36,91% foi mais elevado do que o obtido no presente trabalho (28,05%), assim como o teor de AGI com 63,09%.

O trabalho de Batista et al. (2018) através da transesterificação etílica convencional de *Chlorella protothecoides*, em catálise alcalina, obteve a composição das cadeias carbônicas com C16:0 4,79%, C16:1 0,23%, C 18:0 1,72%, C18:1 62,17%, C18:2 22,33% e C18:3 6,66%, C20:0 0,55%, C20:1 1,55% e valores inferiores na quantificação dos AGS 7,06%, quando comparados ao do presente trabalho e valores muito elevados de AGI 92,94%. Quando determinadas as propriedades do biodiesel os autores supracitados concluíram que o biodiesel etílico de microalgas apresentou propriedades semelhantes a outros biodieseis derivados de óleos vegetais, demonstrando a viabilidade dessa matéria-prima para a produção deste biocombustível.

No presente trabalho, houve o aumento das cadeias monoinsaturadas com a utilização do ultrassom e o aumento das cadeias poli-insaturadas sem o ultrassom, ambos em 12h de reação. Nota-se na literatura que a utilização de diferentes catalizadores, temperaturas e métodos, influenciam diretamente a reação e conseqüentemente a composição das cadeias carbônicas. Dessa forma, a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados varia dependendo das condições operacionais utilizadas em cada experimento, o que afeta suas propriedades físicas e químicas (HOEKMAN et al., 2012).

Para avaliar a qualidade dos ésteres etílicos produzidos a partir da transesterificação etílica *in situ* da biomassa de *C. sorokiniana*, comparou-se as propriedades empíricas obtidas com os padrões de qualidade brasileiro (ANP 45/2014), americano (ASTDM D6751) e europeu (EN 14214) (Tabela 6.2).

Os valores do índice de iodo apresentaram-se dentro dos padrões de qualidade para ésteres etílicos produzido em 4h de reação sem ultrassom, em 12h com ultrassom e 20h com e sem ultrassom. Quanto ao número de cetano estiveram dentro dos padrões os ésteres etílicos obtidos em 4h de reação sem ultrassom e em 12 e 20h com ultrassom. Para os valores de densidade, os ésteres etílicos de todos os tratamentos estiveram dentro dos padrões. Já para os valores de viscosidade, nenhum dos tratamentos esteve dentro dos padrões de qualidade exigidos. Para as demais propriedades avaliadas, não há padrões determinados (Tabela 6.2).

A densidade e a porcentagem de cada ácido graxo, juntamente com número de duplas ligações afetam os índices de iodo e saponificação, que simultaneamente, impactam no número de cetano, ou seja, na capacidade do combustível em queimar rapidamente após ser injetado; quanto maior o número de cetano mais curto será o tempo de ignição, refletindo na qualidade da ignição do combustível (LOBO et al., 2009; WANG et al., 2012). É preferível que haja predominância de AGS, que possuem alto número de cetano e são menos propensos à oxidação que os compostos insaturados (CANAKCI, 2007).

O maior valor de AGS de cadeias carbônicas C16:0 e C18:0 e AGMI, predominantemente C18:1, estiveram relacionados com o maior valor para o número de cetano, pois quanto mais longa a cadeia de ácidos graxos e mais cadeias saturadas, maior o número de cetano. De acordo com Knothe et al. (2003), altos números de cetano foram observado para AGS, como palmítico (C16:0) e ácidos esteáricos (C18:0). Ramos et al., (2009) estudaram a influência da composição de ácidos graxos na qualidade do biodiesel e a alta quantidade de AGMI: C18: 1, C20: 1 e C22: 1 deram um alto índice de cetano aos biodieseis, portanto, as melhores propriedades para o biodiesel estão relacionadas com o alto teor oleico C18:1, porque esses têm o maior conteúdo monoinsaturado.

Altos valores de AGPI, promoveram valores do índice de iodo acima dos recomendados pelos padrões de qualidade do biodiesel, em 12h de reação sem ultrassom. Assim, a limitação de ácidos graxos insaturados é necessária devido ao fato de que o

Tabela 6. 2 Propriedades dos ésteres etílicos obtidos a partir da transesterificação etílica in situ da biomassa seca da microalga *Chlorella sorokiniana*.

Propriedades dos ésteres etílicos	Tempo de reação (horas)								Padrões de qualidade do biodiesel		
	0		4		12		20		Brasil ANP 45/2014	EUA ASTM D6751	EU EM 14214
	Com ultrassom	Sem ultrassom	Com ultrassom	Sem ultrassom	Com ultrassom	Sem ultrassom	Com ultrassom	Sem ultrassom			
GI	138,45±0,61	113,30±0,01	114,68±0,04	94,52±0,23	132,25±0,02	113,30±0,59	114,42±0,28	-	-	-	
IS	199,49±0,26	198,38±0,04	200,50±0,04	201,89±0,28	189,26±0,08	203,10±0,04	202,78±0,29	-	-	-	
II	160,40±0,32	126,65±0,10	117,63±0,02	88,28±0,28	175,70±0,02	107,83±0,14	117,51±0,43	-	-	120 máx.	
NC	37,58±0,11	45,32±0,01	47,06±0,01	53,47±0,10	35,61±0,01	48,90±0,06	46,78±0,13	-	47 mín.	51 mín.	
FSCL	10,80±0,02	5,50±0,01	8,27±0,03	7,81±0,02	6,31±0,01	6,74±0,04	5,45±0,11	-	-	-	
PEFF*	17,44±0,06	0,80±0,04	9,51±0,09	8,05±0,06	3,34±0,02	4,70±0,13	0,63±0,34	Por região	Por região	Por região	
PN	1,49±0,03	2,27±0,01	1,78±0,01	2,42±0,01	0,76±0,01	5,67±0,01	1,21±0,03	-	-	-	
PC	39,39±0,05	38,38±0	39,30±0,01	39,48±0,06	37,46±0,01	39,44±0,01	39,48±0,05	-	-	-	
V	1,25±0	1,23±0	1,31±0	1,37±0,01	1,14±0	1,31±0	1,30±0	3,00-6,00	1,90-6,00	3,50-5,00	
D	0,88±0,01	0,85±0	0,87±0	0,87±0	0,84±0	0,87±0	0,87±0	0,85-0,90	-	0,86-0,90	

GI- Grau de insaturação; IS- Índice de saponificação (mg g⁻¹); II- Índice de iodo (g I₂/100g); NC- Número de cetano; FSCL- Fator saturado de cadeia longa; PEFF- Ponto de entupimento do filtro à frio (° C), PN: Ponto de nuvem (° C); PC: poder calorífico, (MJ kg⁻¹), V- Viscosidade (mm² s⁻¹); D- Densidade (g cm⁻³). PEFF*variável sazonal.

aquecimento de ácidos graxos insaturados mais elevados resulta na polimerização de glicerídeos, a correlação entre o índice de iodo e o grau de insaturação é dada por Ramos et al. (2009), como o índice de iodo é uma medida da insaturação total de um ácido graxo, um aumento linear com o grau de insaturação foi observado, portanto, quanto mais insaturação maior o índice de iodo.

Um dos maiores valores para o ponto de entupimento do filtro à frio (PEFF) esteve relacionado com a alta quantidade dos ácidos graxos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0). Ácidos graxos insaturados atuam essencialmente como solventes, nos quais os ácidos graxos saturados são dissolvidos e a partir dos quais precipitam por efeito da temperatura (LOPES et al., 2008). Desta forma, Ramos et al. (2009) relataram que é possível prever uma relação direta dos valores do PEFF do biodiesel com o conteúdo de ácidos graxos saturados, dando mais peso àqueles com cadeia de carbono mais longa.

Os valores de viscosidade não atenderam os padrões de qualidade, com valores bem inferiores. Os fatores que influenciam a viscosidade são o comprimento da cadeia, posição, número e natureza das ligações duplas, bem como a natureza das porções oxigenadas, assim, possivelmente a presença das insaturações, que alteram a geometria das cadeias e ácidos graxos, tornando as forças intermoleculares menos efetivas, reduziram a viscosidade (KNOTHE; STEIDLEY 2005). O controle da viscosidade visa garantir um funcionamento adequado dos sistemas de injeção e bombas de combustível. Sua determinação é relevante também para monitorar indiretamente a contaminação do biodiesel, pois os sabões residuais, bem como os glicerídeos não reagidos (mono-, di- e triglicerídeos) e os produtos da degradação oxidativa do biodiesel, aumentam a viscosidade do biodiesel (LOBO et al., 2009).

As equações empíricas para avaliar as propriedades dos ésteres etílicos podem ser utilizadas quando se é difícil obter uma amostra suficientemente grande, a partir de uma matriz emergente para análises detalhadas, como é o caso do biodiesel de microalgas, portanto, utilizar a estimativa empírica permitiu uma abrangente avaliação da qualidade do biodiesel (TALEBI et al., 2014, SHEKH et al., 2015, RAMOS et al., 2009). Assim o próximo passo é produzi-lo em maior escala para realizar as análises seguindo as normas das regulamentações, pois essas análises manuais requerem uma grande quantidade de amostra e levam muito tempo para serem realizadas, além dos gastos com os materiais e reagente necessários para tais análises.

Desta forma, os ésteres etílicos produzidos a partir da transesterificação etílica *in situ* da biomassa de *Chlorella sorokiniana*, que apresentou a melhor relação entre ácidos

graxos saturados em maior quantidade e poli-insaturados em menor quantidade, como é preferível, em 12h de reação com o uso do ultrassom, com 24,34% de AGS, 56,63% de AGMI e 18,95% de AGPI. Quanto as propriedades avaliadas empiricamente, com exceção da viscosidade, estas apresentaram-se consistentes com a regulamentação brasileira (ANP 45/2014), americana (ASTDM D6751) e europeia (EN 14214).

Assim, os ésteres etílicos produzidos atenderam a maioria dos padrões de controle de qualidade. Torna-se necessário apenas mais estudos que avaliem a formação e a quantidade das cadeias carbônicas insaturadas, afim de produzir um biodiesel que atenda os padrões de viscosidade exigidos pelas regulamentações brasileira (ANP 45/2014), americana (ASTDM D6751) e europeia (EN 14214).

6.4 REFERÊNCIAS

Adesanya, V. O., Cadena, E., Scott, S. A., Smith, A. G., 2014. Life cycle assessment on microalgal biodiesel production using a hybrid cultivation system. **Bioresource Technology**, 163, 343–55. Doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.051.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. Resolução ANP Nº 45 DE 25/08/2014. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=27406>. Acesso em 14/04/2021.

Ashraful, A. M., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., Rizwanul Fattah, I. M., Imtenan, S., Shahir, S. A., & Mobarak, H. M. 2014. Production and comparison of fuel properties, engine performance, and emission characteristics of biodiesel from various non-edible vegetable oils: A review. **Energy Conversion And Management**, 80, 202–228. Doi:10.1016/j.enconman.2014.01.037

ASTM D6751-20a, 2020. Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels, **ASTM International**, West Conshohocken, PA. Disponível em: www.astm.org Acesso em 14/04/2021. Doi: 10.1520/D6751-20A

Batista, F. R. M., Lucchesi, K. W., Carareto, N. D. D., Costa, M. C. D., Meirelles, A. J. A. 2018. Properties of microalgae oil from the species *Chlorella protothecoides* and its ethylic biodiesel. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, 35, 4, 1383–1394. Doi:10.1590/0104-6632.20180354s20170191

Borowitzka, M. A., Bouruff, B. J., Moheimani, N. R., Pauli, N., Cao, Y., Smith, H. 2012. Identification of the Optimum Sites fo Industrial-scale microalgae Biofuel Production. In: WA using a GIS Model. **The Centre For Research Into Energy For Sustainable Transport (CREST)**. Murdoch University & The University of Western Australia. 40.

Canakci, M. 2007. The potencial of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. **Bioresource Technology**, Essex, 98, 183-190. Doi: 10.1016/j.biortech.2005.11.022

Chen, C. L., Huang, C. C., Ho, K. C., Hsiao, P. X., Wu, M.-S., Chang, J. S. 2015. Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet

extraction/transesterification and direct transesterification processes. **Bioresource Technology**, 194, 179–186. Doi:10.1016/j.biortech.2015.07.021

D'Oca, M. G. M., Haertel P. L., Moraes, D. C., Callegaro, F. J. P., Kurz, M. H. S, Primel, E. G., et al.. 2011a. Base/acid-catalyzed FAEE production from hydroxylated vegetable oils. **Fuel**, 90, 2, 912-916. Doi: 10.1016/j.fuel.2010.10.030

D'oca, M. G M, Viêgas, C. V., Lemões, J. S., Miyasaki, E. K., Morón-Villarreyes, J. A., Primel, E. G., Abreu P. C. 2011b. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass And Bioenergy**, 35, 4, 1533-1538. Doi: 10.1016/j.biombioe.2010.12.047

European Committee for Standardization CEN - EN 14214:2012+A2:2019. 2020. Liquid petroleum products. Fatty acid methyl esters (FAME) for use in diesel engines and heating applications. **Requirements And Test Methods**, 30p. ISBN 978 0 539 14964 7

Gumbyté, M., Makareviciene, V., Skorupskaite, V., Sendzikiene, E., Kondratavicius, M. 2018. Enzymatic microalgae oil transesterification with ethanol in mineral diesel fuel media. **Journal Of Renewable And Sustainable Energy**, 10, 1, 013105. Doi:10.1063/1.5012939

Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K., Webley, P. A. 2011. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 102, 1, 178–185. Doi:10.1016/j.biortech.2010.06.136

Hoekman, S. K., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., Natarajan, M. 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, 16 (1), 143–169. Doi:10.1016/j.rser.2011.07.143

Islam, M. A., Magnusson, M., Brown, R.J., Ayoko, G.A., Nabi, M.N., Heimann, K. 2013. Microalgal species selection for biodiesel production based on fuel properties derived from fatty acid profiles. **Energies**, 6, 5676–5702. Doi: 10.3390/en6115676

Jazie, A. A., Alshebaney, E. J., Abed, S. A. 2019. In-situ dodecylbenzenesulfonic acid catalyzed transesterification of micro algae *Chlorella* sp. for biodiesel production. In 2019 **International Conference On Power Generation Systems And Renewable Energy Technologies (PGSRET)** 1-6.

Knothe, G. 2006. Analyzing biodiesel: standards and other methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 83(10), 823–833. Doi:10.1007/s11746-006-5033-y

Knothe, G. 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, 86, 1059–1070. Doi: 10.1016/j.fuproc.2004.11.002

Knothe, G., Steidley, K. R. 2005. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. **Fuel**, 84 (9), 1059–1065. Doi:10.1016/j.fuel.2005.01.016

Knothe, G., Matheaus, A.C., Ryan III, T.W., 2003. Cetane numbers of branched and straight chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel**, 82, 71– 975. Doi: 10.1016/S0016-2361(02)00382-4

- Lemões, J. S., Sobrinho R. C. M. A., Farias, S. P., Moura, R. R., Primel, E.G., Abreu, P. C., Martins, A. F., D'Oca, M. G. M., 2016. Sustainable production of biodiesel from microalgae by direct transesterification. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, 3, 33–38. Doi: 10.1016/j.scp.2016.01.002
- Lobo, I. P.; Ferreira, S. L. C.; Cruz, Serpa, R. 2009. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, 32, 6, 1596-1608. Doi: 10.1590/S0100-40422009000600044
- Lopes, J.C.S., Boros, L., Krähenbühl, M.A., Meirelles, A.J.A., Daridon, J.L., Pauly, J., Marrucho, I.M., Coutinho, J.A.P. 2008. Prediction of cloud points of biodiesel. **Energy And Fuels** (Special issue: 8th Petroleum Phase Behavior and Fouling) 22, 747–752. Doi: 10.1021/ef700436d
- Menegazzo, M. L., Fonseca, G. G., 2019. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, 107, 87–107. Doi: 10.1016/j.rser.2019.01.064.
- Miao, X.; Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, 97, 6, 841–846. Doi: 10.1016/j.biortech.2005.04.008
- Mubarak, M., Shaija, A., Suchithra, T.V. 2015. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, 7:117–23. Doi: 10.1016/j.algal.2014.10.008
- Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., De Souza, C. O., Vich, D. V., De Carvalho, G. C., Nascimento, M. A. 2013. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenergy Resource**; 6:1–13. Doi: 10.1007/s12155-012-9222-2
- Neto, A. M. P., de Souza, R.A.S., Leon-Nino, A. D., da Costa, J. D. A., Tiburcio, R. S., Nunes, T. A., de Mello, T. C. S., Kanemoto, F. T., Saldanha-Corrêa, F. M. P., Giancesella, S. M. F. 2013. Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. **Renew Energy**, 55, 525–31. Doi: 10.1016/j.renene.2013.01.019
- Prabakaran, P., Ravindran, A. D. 2011. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters In Applied Microbiology**, 53, (2)150–154. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03082.x
- Ramos, M. J., Fernández, C. M., Lourdes, A. C., Pérez, R. A. 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, 100, 1, 261–8. Doi: 10.1016/j.biortech.2008.06.039
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F. 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, 103, 444–467. Doi:10.1016/j.apenergy.2012.10.004
- Shekh, A. Y., Shrivastava, P., Gupta, A., Krishnamurthi, K., Devi, S. S., Mudliar, S. N. 2015. Biomass and lipid enhancement in *Chlorella* sp. With emphasis on biodiesel quality assessment through detailed FAME signature. **Bioresource Technology**, 201, 276–286. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.11.058

- Sorgatto, V. G., Carvalho, J. C. de, Sydney, E. B., Medeiros, A. B. P., Vandenberghe, L. P. de S., Soccol, C. R. 2019. Microscale direct transesterification of microbial biomass with ethanol for screening of microorganisms by its fatty acid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 62. Doi:10.1590/1678-4324-2019180178
- Suali, E., Sarbatly, R. 2012. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 16, 6, 4316–4342. Doi: 10.1016/j.rser.2012.03.047
- Sueoka, N., Chiang, K., Kates, J. 1967. Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal Of Molecular Biology**, 25, 1, 47–66. Doi: 10.1016/0022-2836(67)90278-1
- Sydney, E. B., Da Silva, T. E., Tokarski, A., Novak, A. C., De Carvalho, J. C., Woiciechowski, A. L., Larroche, C., Soccol, C. R. 2011. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, 88, 3291–3294. Doi: 10.1016/j.apenergy.2010.11.024
- Talebi, A. F.; Tabatabaei, M.; Chisti, Y. 2014. Biodiesel Analyzer: A User-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, 2, 2 55–57. Doi: 10.18331/BRJ2015.1.2.4
- Tobar, M., Núñez, G. A. 2018. Supercritical transesterification of microalgae triglycerides for biodiesel production: Effect of alcohol type and co-solvent. **The Journal Of Supercritical Fluids**, 137, 50–56. Doi:10.1016/j.supflu.2018.03.008
- Wang, L. Yu, H., He, X., Liu, R. 2012. Influence of fatty acid composition of woody biodiesel plants on the fuel properties. **Journal Of Fuel Chemistry And Technology**, 40, 4, 397–404. Doi:10.1016/s1872-5813(12)60018-8

CAPÍTULO 8

CONCLUSÃO GERAL

A partir da revisão dos biocombustíveis produzidos de biomassa microalgal, observou-se que as microalgas são potencialmente uma forma sustentável de produzir biocombustíveis, necessitando apenas da adequação metodológica das tecnologias de produção para cada espécie, a fim de potencializar a geração do biocombustível que deseja obter.

Para realizar o cultivo microalgal em vinhaça foi necessária a clarificação da mesma, para redução de cor e turbidez. Como produto alternativo a semente de *Moringa oleifera* + filtro de vidro foi eficiente na clarificação da vinhaça com maior percentual de redução de cor e turbidez obtido utilizando 30 g.L⁻¹ de semente, com 68,92% e 78,78% de redução, respectivamente. Dessa forma, não há razão para se desperdiçar a vinhaça, seja descartando ou armazenando-a, já que devidamente tratada, a sua utilização como fonte de nutrientes para o cultivo microalgal poderá ser uma alternativa.

Posteriormente utilizou-se a vinhaça com os melhores resultados de clarificação como meio para o cultivo microalgal. Os valores ótimos de densidade foram verificados para microalgas cultivadas em vinhaça diluída e suplementada com fertilizante NPK. Apesar da vinhaça clarificada ter sido eficiente em estudos na literatura, no presente trabalho se mostrou um fator de inibição para o crescimento de *C. sorokiniana*, esses resultados sugerem novos estudos para a compreensão dos processos químicos pós clarificação necessários para o crescimento ótimo da microalga.

Dada a relevância da análise de métodos de quantificação e avaliação da cinética de crescimento, foi possível quantificar as microalgas através de uma técnica e transformar tais valores através das equações geradas pela regressão linear às variáveis de densidade celular, densidade óptica e biomassa seca obtida pelo cultivo de microalgas em diferentes concentrações.

Quanto as aplicações da biomassa microalgal, os ésteres etílicos produzidos através da transesterificação etílica *in situ* da biomassa de *Chlorella sorokiniana* atenderam a maioria dos padrões de controle de qualidade. Torna-se necessário apenas mais estudos que avaliem a formação e a quantidade das cadeias carbônicas insaturadas, afim de produzir um biodiesel que atenda os padrões de viscosidade exigidos pelas regulamentações brasileira (ANP 45/2014), americana (ASTDM D6751) e europeia (EN 14214).

A produção de biofilmes pelo método de *casting* com a microalga *C. sorokiniana*, gelatina e glicerol, demonstrou excelentes características para embalagens de alimentos nas concentrações contendo 0,5g de microalga, 2,5g de gelatina e 1,5 g de glicerol em 100 mL⁻¹ (F3) e 1,5g de microalga, 2,5g de gelatina e 1,5g de glicerol em 100 mL⁻¹ (F4), além do controle 1,0g de microalga, 2,0g de gelatina e 2,0g de glicerol em 100 mL⁻¹ de água (F9). Os filmes demonstraram ser uma barreira, em todas as concentrações de biomassa microalgal avaliadas para o desenvolvimento dos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*.

Assim, a clarificação da vinhaça aumentou as perspectivas de tratamento para este resíduo, sendo possível o aumento do seu ciclo de vida, com a possibilidade de utilização da mesma para o cultivo de microalgas. No entanto, os resultados do cultivo de *C. sorokiniana* em vinhaça, sugerem novos estudos para a compreensão dos processos químicos pós clarificação necessários para o crescimento ótimo da microalga, criando um impulso para aprimorar essa tecnologia para geração de energia e bioprodutos. Como também mais pesquisas que avaliem a formação e a quantidade das cadeias carbônicas insaturadas dos ésteres etílicos, a fim de atender os padrões para viscosidade exigidos pelas regulamentações brasileira (ANP 45/2014), americana (ASTDM D6751) e europeia (EN 14214).