



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**POTENCIAL DE MICROALGAS REGIONAIS CULTIVADAS EM
MEIOS ALTERNATIVOS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

CLEDIANA DANTAS CALIXTO

JOÃO PESSOA – PB

NOVEMBRO/2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**Potencial de microalgas regionais cultivadas em meios
alternativos para produção de biodiesel**

CLEDIANA DANTAS CALIXTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Doutora em Química.

**Orientadores: Prof.^a Dr.^a Marta Maria da Conceição
Prof. Dr. Roberto Sassi**

**João Pessoa – PB
Novembro/2016**

C154p Calixto, Clediana Dantas.
Potencial de microalgas regionais cultivadas em meios
alternativos para produção de biodiesel / Clediana Dantas
Calixto.- João Pessoa, 2016.
155f. : il.
Orientadores: Marta Maria da Conceição, Roberto Sassi
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN
1. Química. 2. Microalgas. 3. Meios residuais.
4. Biocombustíveis. 5. Composição.

UFPB/BC

CDU: 54(043)

Potencial de microalgas regionais cultivadas em meios alternativos para produção de biodiesel



Tese de Doutorado apresentada pela aluna Clediana Dantas Calixto e aprovada pela banca examinadora em 21 de novembro de 2016.

Prof. Dra. Marta Maria da Conceição
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Roberto Sassi
2º. Orientador

Prof. Dra. Marta Célia Dantas Silva
Examinadora

Prof. Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira
Examinadora

Prof. Dra. Ilda Antonieta Salata Toscano
Examinadora

Prof. Dr. Petrónio Filgueiras de Athayde Filho
Examinador

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a Deus, instrumento de sabedoria, amor e confiança. À minha família, em especial a minha mãe Alexandrina, pelo amor incondicional a mim dedicado e por ser exemplo permanente de dignidade, honestidade e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os momentos vividos, pelo fortalecimento espiritual, pelo amor concedido, por me dar força e confiança para concluir etapas importantes na minha vida e por me carregar nos braços quando o cansaço já me impedia de caminhar;

Aos meus familiares, em especial aos meus pais e minhas irmãs pela dedicação, apoio, carinho e amor e pelo grande incentivo e encorajamento nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido Rene por todo amor, companheirismo, paciência e incentivo nos momentos difíceis. Pelos momentos felizes e pelas grandes contribuições em vários momentos deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Marta Maria pela orientação, sugestões e experiência compartilhada.

Ao Prof. Dr. Roberto Sassi, por me acompanhar em todas as fases deste trabalho, sempre compartilhando seu vasto conhecimento de forma tão generosa. Pela amizade construída durante estes anos de convivência e pela confiança depositada em vários momentos. Sou grata a Deus por poder desfrutar de sua orientação!

Ao Laboratório de Ambiente Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), nas pessoas do Prof. Dr. Roberto e da Prof^a. Dr^a. Cristiane, pelo acolhimento, orientações e espaço laboratorial cedido para realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza pela orientação e confiança, e por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Combustíveis e Materiais.

Aos amigos e companheiros do LARBIM: Jordana, Patrícia Petraglia, Aline, Viviane, Katharina, Giuseppe, Evandro, Ariane, Nathalie, Nyelson, Patrícia Almeida, Gabriel, Vilma, Vânia, pela acolhida e pelo esforço dispensado à realização de minhas pesquisas. Pela troca de experiências, pelo carinho e por me propiciaram uma excelente convivência e momentos inesquecíveis de descontração. Em especial a Jordana, pela imensa ajuda e parceria em todos os momentos deste doutorado.

Aos amigos: Manoel (Nel), Andréa Suame, Teta, Flávia, Sarah, Marco Aurélio, Anderson e Marcos Pequeno pela ajuda e incentivo em vários momentos.

Aos professores da banca pelas valiosas contribuições para melhoria desta pesquisa.

A CAPES pela bolsa concedida e a todos que direto ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao MCTi/FINEP (255709) e ao CNPq (407519/2013-0) pelos recursos financeiros concedidos aos projetos do LARBIM/UFPB, dos quais fez parte esta pesquisa.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

As microalgas são micro-organismos que podem apresentar elevados teores de lipídeos, proteínas, carboidratos e diversos metabólitos de interesse à indústria de biocombustível e de compostos nutracêuticos. Apesar das inúmeras indicações para sua utilização como fonte para produção de biodiesel, ainda existem entraves econômicos que inviabilizam esta produção em larga escala. Assim, essa pesquisa teve como objetivo avaliar a potencialidade de cepas de microalgas, isoladas da região Nordeste do Brasil, para a produção de biodiesel, levando em consideração suas taxas de crescimento celular, as propriedades combustíveis que cada biodiesel apresentaria e o desenvolvimento destas espécies em meios residuais oriundos de atividades humanas e agroindustriais. Além disto, foram analisadas as mudanças metabólicas ocorridas durante as fases de crescimento, de algumas espécies, através de técnicas convencionais e FTIR. Entre as 25 espécies estudadas foram identificadas 8 potenciais para produção de biodiesel: *Pediastrum tetras* (D121WC), *Scenedesmus acuminatus* (D115WC), *Chlamydomonas* sp. (D132WC), *Lagerheimia longiseta* (D133WC), *Amphora* sp. (M84C), *Monoraphidium contortum* (D173WC), *Chlorella* sp. (D101Z) e *Cosmarium* sp. (D174WC), com produtividade elevada em biomassa, variando de 0,28 a 0,95 g L⁻¹ d⁻¹, e teores de ésteres de até 2,9 vezes superiores à soja. Quanto à avaliação dos parâmetros combustíveis, de um possível biodiesel produzido pelas microalgas, a análise estatística discriminou a clorofícea D101Z como espécie promissora, por apresentar elevada produtividade lipídica, baixo valor de ponto de entupimento de filtro a frio e índice de iodo pouco acentuado. Entretanto, verificou-se que dentre as 12 espécies em estudo, apenas a clorofícea *Monoraphidium contortum* e a cianobactéria *Synechococcus nidulans* não atenderiam as especificações de qualidade combustíveis. Nos estudos sobre meios de cultivos alternativos, observou-se que as formulações com esgoto doméstico (ESG) e biocomposto hortifrutis (BH) mostraram-se muito promissoras especialmente para *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp. e *Lagerheimia longiseta* que apresentaram rendimento máximo celular superior ao cultivo controle. As concentrações mais elevadas de lipídeos foram obtidas em meio BH, e alterações na composição bioquímica e no perfil de ésteres das espécies foram observadas ao se variar os meios de cultivo. Constatou-se também, que o acúmulo de proteína, carboidrato e lipídeo ocorre de forma e em fases distintas do crescimento microalgal, principalmente quando se modifica o meio de cultivo. E é nessa perspectiva que a técnica de FTIR demonstrou eficiência no acompanhamento desses componentes, principalmente dos lipídeos, apresentando para todas as amostras uma relação direta com a técnica convencional. De forma geral, espécies viáveis para produção em larga escala, capazes de crescer em meios residuais foram propostas neste estudo.

Palavras-chaves: Microalgas. Meios residuais. Biocombustíveis. Composição bioquímica. Perfil de FAME.

ABSTRACT

Microalgae are microorganisms with high levels of lipids, proteins, carbohydrates and various metabolites of interest to biofuel and nutraceutical compounds industry. Despite numerous indications for its use as a source for biodiesel production, there are still scientific and technological obstacles that prevent this large-scale production. So this study aimed to evaluate the potential of microalgae strains, isolated from the Northeast of Brazil, for biodiesel production, taking into account their cell growth rates, fuel properties that each biodiesel present and the development of these species in waste media arising from human and agro-industrial activities. Besides analyzing the metabolic changes during the growth stages of some species through conventional and FTIR techniques. Were identified eight species potentials for biodiesel production: *Pediastrum tetras* (D121WC), *Scenedesmus acuminatus* (D115WC), *Chlamydomonas* sp. (D132WC) *Lagerheimia longiseta* (D133WC), *Amphora* sp. (M84C), *Monoraphidium contortum* (D173WC), *Chlorella* sp. (D101Z) and *Cosmarium* sp. (D174WC), whose biomass productivity was high, ranging from 0.28 to 0.95 g L⁻¹ d⁻¹ and the ester contents were up to 2.9 times higher than soybeans. As regards the evaluation of fuel parameters of a possible biodiesel produced by microalgae, statistical analysis discriminated chloroficea D101Z as promising species for all the high lipid productivity, low clogging point value filter cold and sharp little iodine value. However, it was found that among the twelve species studied, only chloroficea *Monoraphidium contortum* and cyanobacterium *Synechococcus nidulans* not meet the fuel quality specifications. In studies of alternative culture medium, it was observed that formulations with domestic sewage (MDS) and biocomposts of fruit/horticultural wastes (HB) demonstrated promising results for cultivation, especially of *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp., and *Lagerheimia longiseta*, which demonstrated productivities superior to those seen when grown on the control media. The highest concentrations of lipids were obtained in medium BH and changes in the biochemical composition and esters profile species were observed by varying the culture medium. It was also verified that the protein, carbohydrate and lipid accumulation occurs so distinct phases and the microalgal growth, particularly when modifying the culture medium. And from this perspective that the FTIR technique has demonstrated effectiveness in monitoring these components, especially lipids, which showed for all samples a direct relationship with the conventional technique. A general way species viable for large scale production, can grow in waste media have been proposed in this study.

Keywords: Microalgae. Alternative media. Biofuels. Biochemical composition. FAME profile.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Comparação de sistemas de cultivo de microalgas.....	24
Tabela 1.2 -	Fixação de CO ₂ por diferentes microalgas.....	25
Tabela 1.3 -	Remoção de compostos orgânicos e inorgânicos de águas residuais por diferentes espécies de microalgas.....	28
Tabela 1.4 -	Diferentes espécies de microalgas e suas aplicações biotecnológicas....	32
Tabela 1.5 -	Produtividade de biocombustíveis por diferentes microalgas.....	34
Tabela 1.6 -	Produtividade lipídica de diferentes espécies de microalgas.....	38
Tabela 1.7 -	Propriedades do biodiesel obtido de microalgas em comparação com as do óleo diesel e especificações da ASTM.....	46
Tabela 2.1 -	Dados de procedência e parâmetros de crescimento das cepas de microalgas estudadas.....	65
Tabela 2.2 -	Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos das vinte e cinco espécies de microalgas.....	69
Tabela 3.1 -	Dados de crescimento e características das cepas das microalgas em estudo.....	84
Tabela 3.2 -	Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos das microalgas estudadas..	87
Tabela 3.3 -	Valores de índice de iodo calculado por equações e analisado pelo método aocs.....	95
Tabela 4.1 -	Parâmetros físicos e químicos dos meios de cultura utilizados no cultivo das microalgas.....	107
Tabela 4.2 -	Parâmetros cinéticos de crescimento das microalgas estudadas nas diferentes condições testadas.....	110
Tabela 4.3 -	Perfil de ésteres metílicos dos ácidos graxos das microalgas avaliadas.	118
Tabela 5.1 -	Análises físicas e químicas do extrato de biocomposto hortifrutis.....	131
Tabela 5.2 -	Remoção de nutrientes pelas microalgas estudadas ao longo da fase <i>log</i> e ao final dos cultivos nas condições testadas.....	133
Tabela 5.3	Dados termogravimétricos da biomassa de <i>Chlamydomonas</i> sp. obtida do cultivo em meio sintético e BH e em diferentes fases de crescimento.....	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Esquema representativo do sistema reaceway (a) e fotobiorreator tubular horizontal (b).....	22
Figura 1.2 -	Sistema de produção de biodiesel de microalga com fixação de CO ₂ durante o cultivo.....	26
Figura 1.3 -	Cadeia produtiva do biodiesel e de outros produtos de microalga.	37
Figura 1.4 -	Taxa de produção de biodiesel de microalga e outras matérias-primas (L/ha).....	39
Figura 2.1 -	Microalgas isoladas de ambientes aquáticos do estado da Paraíba mantidas em condição de culturas unialgais no LARBIM/UFPB....	64
Figura 2.2 -	Rendimento de ésteres em relação ao teor encontrado na soja e relação com a produtividade de biomassa das microalgas isoladas..	67
Figura 3.1 -	Composição por grau de saturação das dezoito espécies de microalgas estudadas.....	89
Figura 3.2 -	Predição das propriedades do biodiesel de microalgas.....	91
Figura 3.3 -	Variação da produção lipídica das classes de microalgas com as propriedades preditas do biodiesel.....	93
Figura 4.1 -	Curvas de crescimento das quatro espécies de microalgas cultivadas nos diferentes meios alternativos e no meio controle.....	109
Figura 4.2 -	Componentes bioquímicos das quatro espécies de microalgas cultivadas nos diferentes meios alternativos testados e no meio controle.....	113
Figura 4.3 -	Relação entre os teores de ésteres e a concentração de biomassa obtida nos cultivos efetuados nos diferentes meios alternativos e no meio controle.....	116
Figura 5.1 -	Curvas de crescimento da <i>Chlorella</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp. e <i>Lagerheimia Longiseta</i> em meio sintético e biocomposto hortifrutis.....	132
Figura 5.2 -	Acompanhamento da acumulação de proteínas durante o cultivo das cepas.....	135
Figura 5.3 -	Acúmulo de carboidratos durante o crescimento das três cepas.....	137

Figura 5.4 -	Lipídeos e ésteres acompanhados no decorrer do cultivo por métodos convencionais e por FTIR.....	138
Figura 5.5 -	Curvas TG/DTA de amostras de biomassa provenientes do cultivo de <i>Chlamydomonas</i> sp. em meio sintético (a,c) e biocomposto hortifrutis (b,d).....	141

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
CAGEPA	Companhia de Água e Esgoto da Paraíba
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DTA	Análise Térmica Diferencial
DUFA	Ácido Graxo Di-insaturado
EMPASA	Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas
EN	Norma Européia
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FAME	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
HRGC-MS	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massa
MUFA	Ácidos Graxos Monoinsaturados
PCA	Análise de Componentes Principais
PUFA	Ácidos Graxos Poli-insaturados
SINDALCOOL	Sindicato dos Produtores de Açúcar e Alcool da Paraíba
TAG	Triacilglicerídeos
TG	Análise Termogravimétrica
TUFA	Ácidos Graxos Tri-insaturados

SUMÁRIO

Capítulo 1	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1 Características das microalgas.....	19
3.2 Processamento de microalgas para obtenção de bioprodutos.....	20
3.2.1 Cultivo de microalgas.....	20
3.2.2 Sistemas de cultivo de microalgas	22
3.3 Aplicações biotecnológicas das microalgas	24
3.3.1 Biomitigação de emissões de CO ₂	24
3.3.2 Potencial tratamento de resíduos.....	26
3.3.3 Utilização na alimentação humana.....	29
3.3.4 Uso em aquicultura e alimentação animal.....	30
3.3.5 Química fina e produtos bioativos	31
3.4 Biocombustíveis	32
3.4.1 Bioetanol	34
3.4.2 Biohidrogênio.....	35
3.4.3 Biometano	35
3.4.4 Biodiesel.....	36
3.5 Produção de biodiesel de microalgas.....	39
3.5.1 Separação da microalga.....	40
3.5.2 Secagem da biomassa microalgal.....	40
3.5.3 Extração do óleo de microalgas	41
3.6 Síntese e qualidade do biodiesel de microalgas.....	43
REFERÊNCIAS	46
Capítulo 2	58
BIOPROSPECÇÃO EM ALGUMAS ESPÉCIES DE MICROALGAS DO NORDESTE DO BRASIL EM RELAÇÃO AO SEU USO POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61

2.1 Coleta e isolamento das cepas de microalgas	61
2.2 Cultivo e produção de biomassa	62
2.3 Análise cromatográfica dos ácidos graxos	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1 Identificação das espécies e características do cultivo	63
3.2 Produtividade de biomassa e quantificação de ésteres	66
3.3 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos	68
4. CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS	73
<i>Capítulo 3</i>	<i>77</i>
PRODUTIVIDADE LIPÍDICA E PARÂMETROS DE QUALIDADE COMBUSTÍVEL DE DIFERENTES ESPÉCIES E GRUPOS DE MICROALGAS.....	78
1. INTRODUÇÃO	79
2. MATERIAIS E MÉTODOS	80
2.1 Cultivo e parâmetros cinéticos de crescimento das espécies de microalgas	80
2.2 Perfil de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos das Espécies	81
2.3 Predição das propriedades do biodiesel a partir do perfil de ésteres de ácidos graxos das microalgas.....	82
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.1 Parâmetros de crescimento e acumulação lipídica	83
3.2 Composição de ésteres de ácidos graxos dos grupos de microalgas	86
3.3 Predição das propriedades do biodiesel de microalgas	89
3.4 Comparação entre o índice de iodo calculado e analisado na amostra.....	94
4. CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS	96
<i>Capítulo 4</i>	<i>100</i>
COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E TEORES DE ÉSTERES EM QUATRO ESPÉCIES DE MICROALGAS CULTIVADAS EM ESGOTO DOMÉSTICO E EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	101
1. INTRODUÇÃO	102
2. MATERIAIS E MÉTODOS	104
2.1 Seleção de espécies e cultivo em condições controladas	104
2.2 Preparação dos meios de cultura	105

2.3 Análises físicas e químicas	105
2.4 Tratamento estatístico dos dados	106
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
3.1 Características físicas e químicas dos meios de cultivo	106
3.2 Parâmetros de crescimento das microalgas	108
3.3 Composição bioquímica	112
3.4 Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos	115
4. CONCLUSÕES.....	119
REFERÊNCIAS	120
Capítulo 5.....	125
ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA EM CULTURAS DE MICROALGAS USANDO TÉCNICAS EXTRATIVAS, FTIR E ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.....	126
1. INTRODUÇÃO	127
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	129
2.1 Seleção de espécies de microalgas e condições de cultivo.....	129
2.2 Remoção de nutrientes e composição bioquímica das microalgas nas condições de cultivo estabelecidas	130
2.3 Análise termogravimétrica da biomassa de <i>Chlamydomonas</i> sp.....	131
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
3.1 Características físicas e químicas do extrato de biocomposto.....	131
3.2 Crescimento das espécies e remoção de nutrientes nas condições testadas	131
3.3 Resultados das análises da composição bioquímica das espécies cultivadas por técnicas extrativas e FTIR	134
3.4 Perfil Térmico da biomassa da microalga <i>Chlamydomonas</i> sp. durante cultivo.....	140
4. CONCLUSÕES.....	143
REFERÊNCIAS	144
Capítulo 6.....	150
CONCLUSÕES GERAIS	151
ANEXOS	152

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por fontes energéticas que estejam atreladas a redução de impactos ambientais tem induzido ao desenvolvimento de ações que diminuam, em ritmo crescente, a utilização do petróleo, gás natural e carvão mineral, na busca de frear o aumento da concentração de dióxido de carbono na atmosfera, e consequentemente atender as políticas mundiais de redução das emissões dos gases do efeito estufa (NEJAT et al., 2015; SORANSO, 2008).

O biodiesel representa uma dessas alternativas, por apresentar grande potencial para substituição gradativa do óleo diesel, com a vantagem de ser renovável e minimizar as emissões de óxidos de carbono, material particulado, dos óxidos de enxofre e de grande parte dos hidrocarbonetos tóxicos (PERIN et al., 2015). Contudo, o biodiesel derivado de oleaginosas, bem como de óleos de fritura e de gordura animal, carrega a problemática de não poder atender sequer uma pequena parte da demanda global de combustíveis, uma vez que o seu uso exigiria a utilização de uma extensão proibitiva de áreas plantadas, mesmo para um país com dimensões continentais como o Brasil (DABDOUB et al., 2009). Assim, uma alternativa viável seria a utilização de microalgas como matéria-prima para atender à crescente demanda de combustível para geração de energia e transporte (GHOSH et al., 2016; AMARO et al., 2011), pois estudos demonstram que a produtividade de óleo de muitas microalgas, por unidade de área empregada para o processo, pode ser até 30 vezes superior do que a obtida com oleaginosas convencionais (MAITY et al., 2014). Por esta razão, muitos pesquisadores classificam as microalgas como a única fonte de lipídeos e/ou biodiesel com potencial para substituir completamente o diesel fóssil (SYDNEY et al., 2011; XU et al., 2006).

As microalgas necessitam de energia solar, CO₂ e alguns nutrientes para produzirem óleos com uma eficiência muito maior do que a obtida em plantações de oleaginosas (CHISTI, 2007). Assim, seu aproveitamento em processos produtivos torna-se uma justificativa importante no tocante à questão da minimização dos danos provocados pelo aquecimento global devido à queima dos combustíveis fósseis. Some-se a isto, o fato de que os óleos encontrados nas microalgas apresentam características físicas e químicas similares aos óleos vegetais (SYDNEY et al., 2011). Além disso, as microalgas possuem outras vantagens em relação às oleaginosas convencionais: apresentam ciclo de vida rápido e produção contínua durante todo o ano; exibem um crescimento exponencial quando em cultivo; o cultivo pode ser feito em regiões ensolaradas onde os solos são pouco agricultáveis

e, portanto, inviáveis para a produção de biodiesel a partir de plantas terrestres; os cultivos praticamente não geram danos ambientais e implicam em menores gastos de água, quando comparado ao cultivo de plantas; e a biomassa resultante após a extração pode ser utilizada na alimentação animal, como adubo orgânico, como fonte de corantes e antioxidantes naturais (MAITY et al., 2014; VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

Outra aplicação das microalgas reside em programas de biorremediação (ZENG et al., 2015; KUMAR et al., 2015, SIVA KIRAN et al., 2012), ou na produção de medicamentos e fármacos, alimento e intermediários químicos para o setor petroquímico, bioplásticos, bioquerosene e compostos bioativos diversos (AHMED et al., 2014; FRANCO et al., 2013; CHU et al., 2010; CABRITA et al., 2010; LA BARRE et al., 2010), cujas pesquisas sobre esses assuntos poderiam resultar em agregação de valor na cadeia produtiva do biodiesel derivado das microalgas, e consequente viabilização econômica desta produção.

De acordo com Zhu (2015), estes microrganismos fotossintetizantes são também utilizados em aquicultura, para a produção de suplemento alimentar e na produção de outros tipos de biocombustíveis, além do biodiesel, como o biohidrogênio, bioetanol, biometano e o bio-óleo. Todavia, biocombustíveis a partir das microalgas ainda encontram entraves tecnológicos dos quais depende a sua expansão à escala comercial como: (a) dificuldades na logística de produção em larga escala; (b) dificuldades no uso de organismos geneticamente modificados em sistemas abertos; (c) alto custo na formulação dos meios de cultura; (d) complexidade no escalonamento industrial de fotobiorreatores; (e) alto custo de produção em sistemas heterotróficos; (f) alta demanda energética para secagem e extração; e (g) alta acidez do material lipídico isolado (GREENWELL et al., 2010; LEITE et al., 2013). Assim, para que o potencial do biodiesel de microalgas se concretize é necessário que sejam desenvolvidas pesquisas biotecnológicas aplicáveis a todas as etapas do processo produtivo, desde a seleção, cultivo e manejo das microalgas até o processo de transesterificação do óleo extraído das mesmas, no sentido de otimizá-las e/ou baixar os seus custos.

No Brasil, o cultivo em massa de microalgas é um campo de investigação promissor e necessita de atenção urgente. Considerando-se a existência de regiões com condições climáticas potencialmente adequadas, com temperaturas amenas e sol em abundância, sua prática parece ser uma possibilidade sócio-econômica muito promissora para praticamente todas as regiões (SYDNEY et al., 2011). Neste contexto, a seleção de espécies adequadas à produção de biodiesel é um aspecto importante a considerar, visto que isso pode levar à redução dos custos do processo produtivo, e que diversas regiões brasileiras são praticamente

inexploradas quanto à diversidade de espécies de microalgas existentes, especialmente as regiões Norte e Nordeste.

Nessa perspectiva, o presente estudo visa realizar uma bioprospecção de microalgas isoladas da região Nordeste potencialmente produtoras de lipídeos, ésteres e outros compostos bioquímicos de interesse que possam ser utilizados na indústria de biocombustíveis, e avaliar a produtividade desses micro-organismos quando cultivados em meios residuais provenientes de esgoto humano e atividades agroindustriais, visando minimizar custos produtivos e, ao mesmo tempo, mitigar impactos ambientais. As hipóteses que nortearam esta pesquisa foram: a) É possível encontrar espécies nativas de microalgas da região Nordeste do Brasil que produzem lipídeos em quantidades adequadas à produção de biodiesel e que ainda não foram estudadas a esse respeito; b) Espécies de microalgas que compõem um mesmo grupo taxonômico podem apresentar diferenças na composição dos ácidos graxos constituintes, o que propiciará variações nas propriedades combustíveis do biodiesel produzido por cada microalga; c) Algumas espécies de microalgas podem crescer de forma acentuada em meios residuais; d) Pode-se observar a cinética de síntese de alguns componentes bioquímicos das microalgas ao longo do cultivo através de métodos convencionais ou por indicadores apontados pela técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Efetuar bioprospecção de microalgas potencialmente produtoras de lipídeos, ésteres e outros compostos bioquímicos de interesse que possam ser utilizados na indústria de biocombustíveis, e avaliar a produtividade desses micro-organismos quando cultivados em meios residuais provenientes de esgoto humano e atividades agroindustriais, visando minimizar custos produtivos e, ao mesmo tempo, mitigar impactos ambientais.

2.2 Objetivos Específicos

- avaliar cepas de microalgas isoladas da região Nordeste do Brasil quanto ao seu potencial para produção de biodiesel, levando em consideração as taxas de crescimento celular e a composição em ésteres de ácidos graxos;
- analisar o biodiesel produzido a partir da biomassa das microalgas, em relação aos parâmetros de qualidade combustíveis normatizados, preditos a partir de equações matemáticas baseadas na composição em ésteres de ácidos graxos;
- observar o crescimento de espécies regionais de microalgas (*Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp., *Lagerheimia longiseta* e *Pediastrum tetras*) em cinco meios alternativos formulados a partir de esgoto municipal e diferentes resíduos de origem agroindustrial, visando avaliar a influência destes meios na composição química e produtividade da biomassa obtida;
- acompanhar as mudanças na composição bioquímica das microalgas nas diferentes fases da curva de crescimento, usando os métodos extrativos tradicionais, espectrofotometria de infravermelho e análise termogravimétrica, contrastando com a assimilação de nitrato e fosfato presente nos meios.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Características das microalgas

Algas são reconhecidas como uma das mais antigas formas de vida. Dentre esse grupo, as microalgas podem ser definidas como organismos microscópicos fotossintéticos que podem ser encontrados em diversos ecossistemas: água doce, salobra, marinho, e hipersalino, além de ambientes que apresentam condições extremamente variáveis e/ou com amplas faixas de temperatura e pH (ZHU et al., 2013; MATA et al., 2010).

As microalgas constituem a base das cadeias tróficas aquáticas. Suas características taxonômicas e a dinâmica espaço-temporal são estabelecidas pelo regime meteorológico, circulação e características geomorfológicas regionais, podendo ser alteradas por impactos antropogênicos e por fatores biológicos (HONDULA et al., 2014; BRANDINI et al., 1997). Adicionalmente, as microalgas consistem em uma variedade de organismos, cuja classificação baseia-se em características como a estrutura da parede celular, tipo de mobilidade quando existente e tipos de pigmentos, responsáveis pela coloração variada e por mecanismo fotoautotrófico (DELABARY, 2012). Dois tipos de estrutura celular podem ser definidas: procariótica, com representantes Cyanophyta e Prochlorophyta; e eucariótica, com representantes nas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta, Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta. (BAWEJA e SAHOO, 2015; DERNER et al., 2006).

As diversas espécies de microalgas podem ser autotróficas ou heterotróficas; as primeiras requerem apenas compostos inorgânicos, como CO₂, sais e luz (fonte de energia) para o crescimento; enquanto as últimas não são fotossintéticas. Por conseguinte, requerem nutrientes e compostos orgânicos externos como fonte de energia. Algumas microalgas são ainda, mixotróficas, ou seja, têm a capacidade tanto de realizar a fotossíntese quanto de assimilar nutrientes orgânicos exógenos (BRENNAN e OWENDE, 2010).

A estrutura unicelular das microalgas permite que estas convertam facilmente a energia solar em energia química. Essa conversão está sendo aproveitada comercialmente para a obtenção de biomassa e, conseqüentemente, de produtos de aplicação comercial. Já que as células microalgais possuem uma composição bioquímica diversificada (carboidrato, proteína, lipídeos, ácidos graxos, etc.) e essa composição está relacionada à natureza de cada

espécie, bem como aos fatores ambientais intrínsecos à região onde o cultivo está sendo realizado e ao meio de cultura utilizado (JUNEJA et al., 2013; ZAMALLOA et al. 2011).

Apesar da classificação das microalgas em diferentes divisões devido às diferenças estruturais e morfologias, deve-se ressaltar que estes organismos são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo ao das plantas (BARSANTI e GUALTIERI, 2014). Além disso, são responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta a partir da fotossíntese (GEIDER, 2013).

O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido, contudo na literatura encontram-se citações relatando que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de bioprodutos (NORTON et al., 1996; PULZ e GROSS, 2004).

3.2 Processamento de microalgas para obtenção de bioprodutos

3.2.1 Cultivo de microalgas

O cultivo de microalgas constitui processo tecnológico que utiliza o rápido crescimento celular para produzir biomassa. Assim, tanto no ambiente natural quanto em cultivos controlados, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos (JUNEJA et al., 2013). Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, a possível influência de outros organismos e a idade do inoculo (MATA et al., 2010). Quanto aos fatores físicos e químicos são principalmente reportados estudos sobre luz, temperatura, aeração, disponibilidade de nutrientes, salinidade e pH. Esses fatores podem vir a influenciar tanto no valor nutricional das microalgas, incluindo forma e tamanho, quanto na composição bioquímica (nutrientes, enzimas, toxinas, lipídeos, etc.) (PANCHHA et al., 2014; COLLA et al., 2007; CONVERTI et al., 2006).

A luz é um dos principais parâmetros de influência no desenvolvimento das microalgas, por ser esta a responsável direta pelo fenômeno da fotossíntese. Assim, cultivos em altas intensidades luminosas podem propiciar fenômenos reversos ao crescimento celular, como a foto-oxidação e a foto-inibição. Em termos gerais a luz tem influência sobre estas

espécies quanto a diversos parâmetros, que devem ser monitorados, dentre estes se destacam: o fotoperíodo, a intensidade, a qualidade e o tipo de luz (LOURENÇO, 2006)

A temperatura é considerada outro fator interferente no desenvolvimento microalgal, exercendo forte influência sobre as reações metabólicas, sobre a taxa de fixação de CO₂ e respiração, e consequentemente sobre a taxa de crescimento. Muitas microalgas podem tolerar facilmente temperaturas de 8 a 15 °C mais baixas do que a sua temperatura ótima de crescimento, no entanto, elevações de temperaturas, de aproximadamente 4° C acima do ponto ótimo de crescimento podem resultar na perda da cultura (BROCK, 2012; DERNER, 2004).

A movimentação e aeração constituem outro parâmetro importante, por proporcionar a homogeneização do cultivo, do calor, e dos metabólitos, além de facilitar a transferência de gases, prevenir a sedimentação e ajudar para um melhor contato entre as células e os nutrientes (ANDRADE e COSTA, 2008).

O pH é outra variável fundamental a ser analisada durante o crescimento celular, visto que influencia diretamente na absorção dos componentes do meio de cultura e na disponibilidade de vários elementos químicos. O pH do meio é influenciado pelas proporções entre formas de carbono dissolvidas no meio, onde o consumo do CO₂ afeta o crescimento de microalgas, aumentando o pH do sistema, que pode atingir níveis muito elevados (KESAANO et al., 2015).

Em linhas gerais, para um crescimento otimizado das microalgas deve-se considerar as necessidades nutricionais destas espécies, que variam quantitativamente no meio de acordo com a espécie em estudo e das distintas condições ambientais que serão impostas. Em geral, a composição do meio de cultura é uma simulação do meio natural em que a espécie se encontra, contendo numerosos sais minerais, alguns elementos traço e, em determinados meios, vitaminas. Os nutrientes requeridos podem ser classificados em duas categorias: os macronutrientes, compostos por C, H, O, N, P, S, K, Mg, Si e Fe e os micronutrientes Mn, Cu, Zn, Mo, V, B, Co, Ca, Na, Se e Ni (CONVERTI et al., 2006).

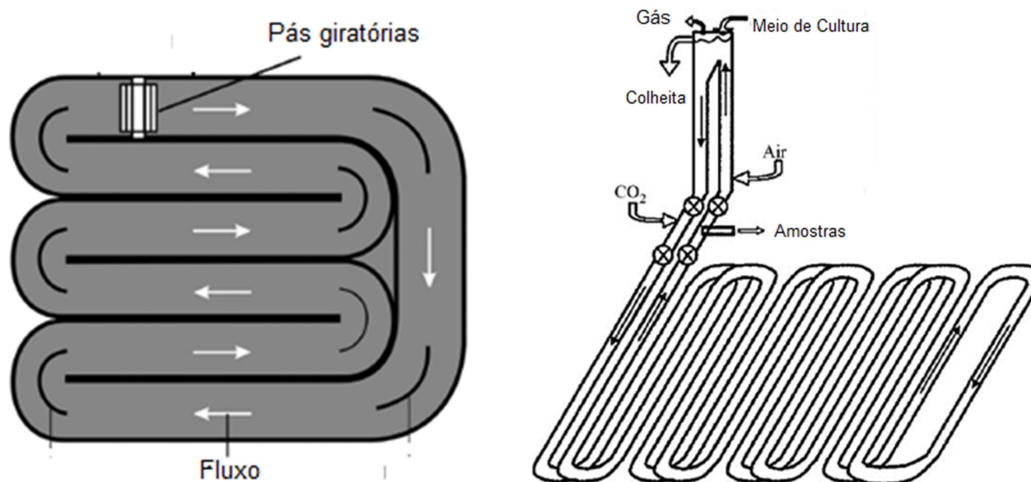
Os primeiros cultivos comerciais de microalgas foram para fins alimentícios e surgiram no início dos anos 60, no Japão, com o uso da clorofícea *Chlorella*, seguido de cultivos de cianofícea *Spirulina* nos anos 70, no México. No entanto, os primeiros relatos referentes ao consumo de microalgas pelo homem datam de 2000 anos atrás, quando chineses em tempos de escassez alimentar consumiam a microalga *Nostoc* (SPOLARE et al, 2006). Há ainda relatos do consumo de diferentes espécies de cianobactéria *Spirulina*, por povos Astecas, no México, e em tribos da África (FAO, 2008).

Atualmente já são encontradas algumas empresas que cultivam em grande escala biomassa de microalgas. Contudo, esse processo carece ainda de vários estudos visando à minimização de custos para serem expandidos. Lourenço (2006) relata que a maioria das espécies utilizadas na atualidade permaneceu na obscuridade por muito tempo e só a partir do século XIX passaram a ser estudadas com maior intensidade, mas somente após a 2ª Guerra Mundial surgiu um grande interesse na produção comercial de microalgas, principalmente, em decorrência da grande crise internacional na indústria petrolífera ocorrida na década de 1970. O crescimento rápido e a produtividade elevada das microalgas vêm estimulando, há algumas décadas, pesquisas para o aproveitamento de sua biomassa, sendo considerado um recurso renovável e, com a viabilização de empreendimentos comerciais, também como fonte de renda (MOREIRA, 2010).

3.2.2 Sistemas de cultivo de microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em diversos sistemas de produção, com volume variando desde poucos até bilhões de litros. Os sistemas comumente empregados são os abertos, cujos cultivos são realizados sob condições naturais de iluminação e temperatura, e os fechados, desenvolvidos com iluminação natural ou artificial, denominados de fotobiorreatores, Figura 1.1.

Figura 1.1 – Esquema representativo do sistema raceway (a) e fotobiorreator tubular horizontal (b).



Fonte: Adaptado de Bahadar e Khan, (2013); Brennan e Owende, (2010).

A viabilidade técnica de cada sistema é influenciada pelas propriedades intrínsecas das espécies de microalgas selecionadas, assim como pelas condições climáticas e os custos associados ao terreno e à água utilizados (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Os sistemas de produção abertos são realizados nos chamados tanques que podem ser construídos em vários formatos, sendo os mais conhecidos os chamados “raceways”. Independentemente da área do tanque, a profundidade varia de 20 a 30 cm, para não prejudicar o aproveitamento da luz. A agitação constante é essencial para promover uma distribuição uniforme e iluminação das células. (SUALI et al., 2012).

Os tanques abertos são talvez os sistemas mais adequados para o cultivo fotoautotrófico de microalgas para a produção de biodiesel, devido ao seu baixo custo operacional e à fonte de carbono poder ser obtida diretamente da atmosfera (BAHADAR e KHAN, 2013). Por outro lado, essas condições naturais limitam o uso desses sistemas, visto que fatores climáticos influenciam diretamente em alguns parâmetros de crescimento. Além do risco de contaminação por outros organismos, que podem vir a competir com a espécie selecionada, o que faz com que esses sistemas exijam ambientes seletivos (HARUN et al., 2010).

Os sistemas fechados denominados fotobiorreatores são projetados para superar as limitações dos sistemas abertos. Apresentam-se em diferentes gamas de modelos, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato (HARUN et al, 2010; SINGH e SHARMA, 2012). Têm elevada eficiência e altos índices de produtividade de biomassa, cerca de 30 vezes mais do que nos sistemas abertos; requerem menor tempo para o cultivo devido às condições controladas que possui; apresentam uma redução nos riscos de contaminação quando equiparado a cultivos abertos. Além disso, esses sistemas podem utilizar águas residuais ou gases de combustão de usinas de energia, fornecendo benefícios ambientais adicionais (ZHU et al., 2013; CARLSSON e BOWLES, 2007). No entanto, são limitados quanto ao custo, pois são extremamente mais caros do que os sistemas abertos. A Tabela 1.1 apresenta uma breve comparação quanto a parâmetros intrínsecos entre os dois sistemas de cultivo abordados.

Tabela 1.1 – Comparação de sistemas de cultivo de microalgas.

Parâmetro	Sistema Aberto	Sistema Fechado
Concentração de biomassa	Baixo, 0,1-0,5 g/L	Alto, 2-8 g/L
Espaço requerido	Alto	Baixo
Custos de construção	Baixo	Alto
Risco de contaminação	Alto	Baixo
Perda de água	Alto	Quase não ocorre
Perda de CO ₂	Alto	Baixo
Qualidade da biomassa	Difícil de controlar	Fácil controle
Dependência do clima	Alto	Baixo
Repetibilidade	Baixa	Alta
Período do cultivo	Longo	Relativamente curto

Fonte: Adaptado de Zhu et al., (2013)

Alguns autores têm sugerido que a combinação de sistema aberto e/ou fechado e entre cultivos autotróficos e heterotróficos deve ser a configuração mais eficaz para o cultivo em massa. A exemplo disso Han et al. (2010) na primeira etapa do cultivo utilizou um fotobiorreator, a fim de obter uma elevada densidade celular, e em seguida, expôs as microalgas a uma privação de nutrientes, em um sistema aberto com a finalidade de aumentar o teor de lipídeos. Liu et al. (2010) utilizou também um sistema híbrido para o cultivo de *Nannochloropsis*, obtendo um aumento de 75% na biomassa final.

Contudo, os custos de um sistema híbrido são susceptíveis de serem significativamente maior do que para um reator, bem como as necessidades de área.

3.3 Aplicações biotecnológicas das microalgas

3.3.1 Biomitigação de emissões de CO₂

A redução das emissões de gases do efeito estufa é um problema internacional. A mitigação por métodos biológicos (biomitigação), particularmente a fotossíntese de microalgas, vêm apresentando diversas vantagens e vários méritos, como a maior taxa de fixação de CO₂ quando comparado às plantas terrestres e metabolização do CO₂ em carboidratos e lipídeos, viáveis principalmente para a produção de biocombustíveis (WANG et al., 2008; BRUNE et al., 2009; YOO et al., 2010; HO et al., 2011).

As microalgas podem tipicamente ser utilizadas para capturar o CO₂ a partir de três diferentes fontes: o CO₂ atmosférico; a partir da emissão da queima de combustíveis e processos industriais; e o CO₂ proveniente de carbonatos solúveis (WANG et al., 2008).

A seleção de cepas de microalgas adequadas para biomitigação de CO₂ tem efeito significativo sobre a eficácia e competitividade de custos desse processo, visto que apenas um reduzido número de microalgas são tolerantes aos altos níveis de SO_x e NO_x que estão presentes nos gases de combustão. Assim, as propriedades desejáveis das microalgas para fixação desse gás incluem: maior crescimento das espécies a altas taxas de assimilação de CO₂; alta tolerância de constituintes vestigiais de gases de combustão, tais como SO_x e NO_x; possibilidade de incremento da biomassa para obtenção de valiosos subprodutos e co-produtos, por exemplo, biodiesel e biomassa para bioprodutos; tolerância a temperatura para minimizar o custo de resfriamento dos gases de combustão e ser capaz de crescer em meios constituídos de águas residuais com injeção de CO₂ (BRENNAN e OWENDE, 2010; WANG et al., 2008). Algumas espécies de microalgas que apresentam eficiência quanto a remoção de CO₂ são apresentadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Fixação de CO₂ por diferentes microalgas

Espécies de Microalgas	Taxa de fixação de CO₂ (g/m³/h)
<i>Chlorogleopsis</i> sp.	0,8-1,9
<i>Chlorella vulgaris</i>	80-260
<i>Euglena gracilis</i>	3.1
<i>Porphyridium</i> sp.	3-18
<i>Spirulina platensis</i>	38,3-60

Fonte: Maity et al., (2014)

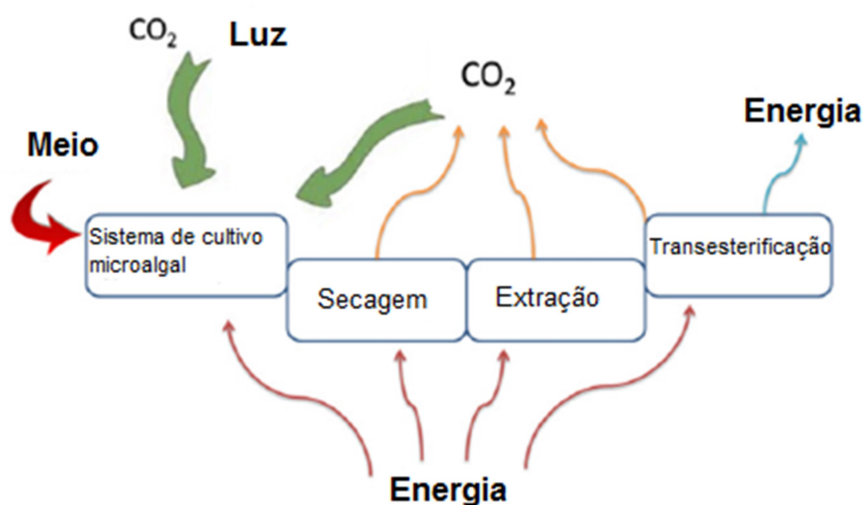
As microalgas constituem uma via atóxica para mitigar as emissões de gases de efeito estufa, e produzir grandes quantidades de biomassa. Nesse sentido, vários estudos relatam o poder de assimilação dessas espécies, a exemplo de Rodolfi et al., (2009) que afirmam que para cada 1,8 kg de CO₂ capturado são produzidos 1 kg de biomassa seca de microalgas. Morais e Costa, (2007) observaram que as espécies de microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella kessleri* são capazes de crescer em meios contendo até 18% (v/v) de CO₂. Enquanto Chang e Yang, (2003) constataram que certas espécies de *Chlorella* podem crescer numa atmosfera contendo CO₂ a 40% (v/v).

Ao comparar *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp., sob condições de mitigação de gases de combustão, Yoo et al., (2010) propôs que a espécie

Scenedesmus sp. apresenta-se como a mais adequada para mitigação de CO₂ devido às altas taxas de produção de biomassa, enquanto *Botryococcus braunii* e *Scenedesmus* sp. apresentaram melhor crescimento quando utilizado gás de combustão, em comparação com o cultivo com adição de misturas de ar e CO₂. O que corrobora com os estudos de Brown, (1996) que concluiu que diversas microalgas são bastante tolerantes a gases de combustão.

O alto custo do processo tecnológico e a falta de competitividade econômica para produção de biodiesel de microalgas em relação ao diesel de petróleo são os principais obstáculos para a exploração comercial desse biocombustível (CHISTI, 2008). Nesse sentido, a biomitigação das emissões de CO₂ nos cultivos de microalgas proporciona uma vertente que pode ser explorada para reduzir o custo e para permitir a utilização sustentável de microalgas como fonte de biocombustíveis, Figura 1.2.

Figura 1.2 – Sistema de produção de biodiesel de microalga com fixação de CO₂ durante o cultivo



3.3.2 Potencial tratamento de resíduos

Um requisito importante no tratamento de águas residuais é a remoção de nutrientes e metais tóxicos para enquadramento em limites aceitáveis antes de seu descarte ou reutilização. No entanto, a maior parte dos tratamentos convencionais baseia-se em métodos físicos e químicos. As microalgas tem se mostrado eficazes na remoção de nitrogênio, fósforo, metais pesados (selênio, cromo, chumbo, entre outros) e metalóides (arsênio), de uma ampla

variedade de águas residuais (GATTULLO et al., 2012; CHRISTENSON e SIMS, 2011), o que possibilita sua utilização em processos de biorremediação.

Uma variedade de estudos aponta o crescimento de microalgas em resíduos agrícola, industrial e esgoto municipal (GAN et al., 2014; GRIFFITHS e HARRISON, 2009). Além de meios constituídos de efluentes de biodigestores, vinhaça de cana-de-açúcar e de manipueira (RAMIREZ et al., 2014; BORGHETI, 2009; BERTOLDI et al., 2008), resíduos proveniente das atividades agropecuárias (MARKOU, 2016; GAN et al., 2014; RODRIGUES e FILHO, 2004), de indústria de laticínios (LU et al., 2015; WOERTZ et al., 2009), de destilaria (TRAVIESO et al., 2008), entre outros.

Além disso, estes organismos são utilizados como bioindicadores para detecção de nutrientes e substâncias tóxicas (detergentes, herbicidas, etc.) (LOBO et al. 2004; KIRK e BEHRENS, 1999; GROBBELAAR, 2004). Sendo utilizados também na remoção de compostos orgânicos tóxicos, como fenóis e clorofenóis (DINIS et al. 2004) e na remoção e recuperação de alguns metais pesados.

A ideia do uso de microalgas em processos de biorremediação foi inicialmente proposta por Oswald e Gotaas em 1957, mas ganhou impulso a partir da década de 80. O cultivo de microalgas em águas residuais apresenta, além dos efeitos ambientais positivos, diversas vantagens, tais como: um tratamento eficaz em termos de custos, baixa exigência de energia, redução na formação de outros resíduos e produção de biomassa de microalgas para a produção de biocombustíveis com custo reduzido (MAITY et al., 2014).

Entre as espécies utilizadas para a remoção do excesso de nutrientes de efluentes, assim como para a produção de biomassa para fins de bioenergia, ou para extração comercial, têm-se as clorofíceas (*Chlorella* sp., *Scenedesmus dimorphus*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*) e algumas cianobactérias (*Spirulina* sp., *Arthrospira* sp.) (BOROWITZKA, 1999). Essas e outras espécies que foram avaliadas e apresentam potencial de remoção de compostos com caráter poluidor são representadas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 - Remoção de compostos orgânicos e inorgânicos de águas residuais por diferentes espécies de microalgas.

Espécies de Microalgas	Compostos removidos
<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Spirulina</i> , <i>S. platensis</i> <i>Anabaena</i> sp	NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} 2,4,6-trinitrotolueno
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	Hg (II), Cd(II), Pb(II) NH_4^+ , PO_4^{3-} , Cd, Zn, P
<i>Scenedesmus rubescens</i> , <i>Chlorella salina</i> <i>Coelastrum proboscideum</i>	Co, Zn, Mn Pb
<i>Ochromonas danica</i> <i>Phormidium bigranulatum</i>	Fenóis Pb(II), Cu(II), Cd(II)
<i>Phormidium laminosum</i> <i>Spirulina platensis</i>	Cu(II), Fe(II), Ni(II), Zn(II) Cr(VI)

Fonte: Adaptado de Maity et al., (2014).

Cultivos em grande escala de microalgas podem contribuir de forma significativa na redução da eutrofização resultante da ação antrópica. Charity et al., (2009) cultivaram a microalga *Scenedesmus* sp. em efluente de cultivo de peixes visando avaliar a remoção de nutrientes, crescimento e rendimento de biomassa. Os cultivos foram realizados em tanques com aeração constante e em condições naturais de fotoperíodo e temperatura. As microalgas removeram 94,44% (23,80 mg L⁻¹) de amônia, 77,54% (7,04 mg L⁻¹) de fosfatos e 35,59% (26,09 mg L⁻¹) de matéria orgânica.

Martínez et al., (2000) obtiveram uma remoção significativa nas concentrações de fósforo e nitrogênio de esgoto urbano utilizando a microalga *Scenedesmus obliquus*. Esta foi capaz de absorver 98% do fósforo e 100% de nitrogênio amoniacal em cultivo fechado com agitação constante.

Em outro estudo, Chojnacka et al. (2005) observaram que a *Spirulina* sp. agiu como um bioissorvente, sendo capaz de absorver íons de metais pesados (Cr^{3+} , Cd^{2+} e Cu^{2+}). O autor observou ainda que a bioissorção pelas microalgas dependia fortemente das condições de cultivo. Assim, dependendo do tipo e concentração de resíduo utilizado como meio de cultivo para produção de microalgas pode-se obter biomassa com distintas composições, visto que esta varia de acordo com a quantidade de nutrientes que são disponibilizados para as microalgas durante seu crescimento.

3.3.3 Utilização na alimentação humana

Várias espécies de microalgas são cultivadas comercialmente em alguns países e a biomassa produzida tem sido utilizada como fonte de produtos para aplicação na indústria de alimentos. Segundo Pulz e Gross (2004), o mercado de alimentos funcionais, utilizando microalgas em massas, pães, iogurtes e bebidas, apresenta rápido desenvolvimento em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia. As principais microalgas cultivadas comercialmente são *Chlorella* e *Arthrospira* para a adição em alimentos naturais, *Dunaliella salina*, para a obtenção de betacaroteno e *Haematococcus pluvialis* para a obtenção de astaxantina (AMBROSI et al., 2008; SILVA, 2008; CHU et al., 2010).

O consumo humano de biomassa de microalgas é restrito a poucas espécies, devido às estritas normas de segurança alimentar, a fatores comerciais, a demanda do mercado e a preparação específica. *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella* dominam o mercado de microalgas com aplicação alimentícia, sendo a biomassa comercializada na forma de comprimidos ou em pó e como aditivos alimentares no mercado de alimentos saudáveis (SPOLAORE et al., 2006).

A grande maioria das microalgas destaca-se principalmente por apresentarem elevado valor protéico (50–70%), aminoácidos essenciais, vitaminas, sais minerais, além de pigmentos (carotenóides, ficocianinas e clorofilas), ácidos graxos poliinsaturados, incluindo ômega-3 e outros compostos biologicamente ativos (BOROWITZKA, 1999; COLLA et al., 2007).

A *Spirulina platensis* é uma microalga com composição apropriada para uso como complemento alimentar, podendo ser empregada no combate à desnutrição (MADHU e SATYANARAYANA, 2015). Em sua composição destacam-se os altos teores de proteínas (64-74%), ácidos graxos poliinsaturados e vitaminas, além de compostos antioxidantes (PIGNOLET et al., 2013).

Em estudo Figueira et al., (2011) elaborou um pão sem glúten com adição da biomassa seca da microalga *Spirulina platensis*, na faixa de 2 a 5%. Foi verificado que a adição de *Spirulina platensis* provocou uma melhoria da qualidade nutricional dos pães, confirmada pelo aumento significativo de 39,04% do conteúdo protéico, além de vários aminoácidos essenciais.

As microalgas também são fontes de pigmentos que se constituem como compostos de alto valor e que podem ser usados como aditivos alimentares em suplementos (SPOLAORE et al., 2006). Semelhantemente ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta. Os

três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal são as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas (KOLLER et al., 2014).

Os carotenóides, pigmentos de grande interesse comercial, funcionam como fotoprotetores e como pigmentos fotossintéticos secundários, sendo que cada espécie pode conter entre 5 e 10 tipos de um universo de aproximadamente 60 diferentes carotenóides presentes nas células microalgais. Diversas espécies podem acumular grande concentração de betacaroteno, astaxantina ou cantaxantina, por exemplo, os quais têm uma ampla aplicação como corantes naturais e como antioxidantes (CHRISTAKI et al., 2013).

3.3.4 *Uso em aquicultura e alimentação animal*

Na aquicultura, as microalgas são empregadas como fonte primária de alimento para larvas, juvenis, e até de adultos de moluscos, crustáceos e peixes, bem como do zooplâncton, usado como alimento para crustáceos e peixes (GUEDES e MALCATA, 2012). Outra função das microalgas na aquicultura é proporcionar estabilidade e melhoria da qualidade da água, através da absorção de produtos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito) (LAVENS e SORGELOOS, 1996) e combate a bactérias patogênicas pela produção de substâncias antibióticas (REITAN et al. 1994). Além de apresentarem grande importância quanto sua elevada produção de oxigênio e consumo de dióxido de carbono (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Nas últimas décadas, centenas de espécies de microalgas foram testadas na alimentação direta e indireta como alimento larval para espécies aquáticas e diversos organismos forrageiros (rotíferos, copépodes e artemia) os quais são comumente utilizados em larviniculturas (COSTA e MORAIS, 2011), entretanto não mais do que vinte espécies tiveram seu uso disseminado na aquicultura.

As espécies de microalgas que atualmente são apontados como adequadas para a preparação de alimentos para suplementos animais são a *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina* (PULZ e GROSS, 2004).

A *Spirulina platensis* tem sido utilizada na coloração de peixes, devido à quantidade de pigmentos (BAGRE et al., 2012) e na substituição de componentes importantes na formulação de rações para animais (GUROY et al., 2012; AHMADZADENIA et al., 2011; SIRAKOV et al., 2012), pelo seu alto teor de proteínas, significativa quantidade de ácidos

graxos essenciais, vitaminas, minerais e carboidratos (CHIATTONI et al., 2015) e com a função de atratabilidade (SILVA-NETO, 2010).

Recentes estudos têm sido realizados avaliando a composição bioquímica de várias espécies de microalgas que podem ser usadas como suplemento alimentar para animais ou como alimento primário para gado (HARUN et al., 2010).

3.3.5 Química fina e produtos bioativos

Dependendo da espécie de microalga, vários compostos químicos de alto valor podem ser extraídos, dentre estes são destacados: os metabólitos secundários como os carotenóides, e os polissacarídeos com diversas atividades biológicas dependentes da sua estrutura química, Tabela 1.4. Além desses, merecem destaque os pigmentos, os triglicerídeos, ácidos graxos essenciais, as vitaminas, dentre outros, que são largamente utilizados, por exemplo, em produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos funcionais, e etc. (ZHU et al., 2013).

Os metabólitos secundários são, em geral, os principais componentes com aplicação comercial devido às suas propriedades benéficas à saúde, fazendo parte muitas vezes da composição de alimentos funcionais ou suplementos nutricionais, ou ainda utilizados na indústria cosmética. Os metabólitos secundários mais abundantes em microalgas são os carotenóides, aos quais se atribui o potencial antioxidante destes organismos (CARDOZO et al., 2007; PLAZA et al., 2008).

Os polissacarídeos encontrados em microalgas podem ser armazenados como material de reserva, e apresentam como principais atividades biológicas, as imunomoduladora, antiviral, antitumoral, antibacteriana e anticoagulante, entre outras (BOHN e BEMILLER, 1995).

Tabela 1.4 - Diferentes espécies de microalgas e suas aplicações biotecnológicas, segundo

Espécie	Produto	Área de aplicação
<i>Arthrospira</i> sp. (<i>Spirulina</i>)	Ácido γ -linolênico	Suplemento alimentar, alimentação para nutriz
<i>Spirulina platensis</i>	Biomassa, ficocianina	Alimento natural, alimentação humana e animal, suplemento alimentar, cosméticos
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomassa	Alimento natural, alimentação humana e animal, suplemento alimentar, aquicultura e cosméticos
<i>Dunaliella salina</i>	Carotenóides, β -caroteno	Alimento natural, alimentação humana e animal, suplemento alimentar, cosméticos
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Carotenóides, astaxantina	Produtos farmacêuticos, aditivo alimentar (corante natural)
<i>Odontella aurita</i>	Ácidos graxos	Produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentação para nutrízes.
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polissacarídeo, ácido araquidônico	Produtos farmacêuticos cosméticos, alimentação animal
<i>Isochrysis galbana</i>	Ácidos graxos	Alimentação animal
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Lipídeos, ácidos graxos	Alimentação animal, biocombustível
<i>Lyngbya majuscula</i>	Imunomoduladores	Produtos farmacêuticos e alimentação animal
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Ácido eicosapentaenóico (EPA)	Suplemento nutricional e aquicultura
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Biomassa	Alimentação animal, cosméticos

Fonte: Pulz e Gross, (2004); Spolaore et al., (2006).

As microalgas também são fontes primárias de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) que constituem os ômega de alto valor nutricional utilizados para aplicações diversas na indústria nutracêutica, tais como aditivos para leite de fórmula infantil, e no enriquecimento de ovos através da adição da biomassa rica em ômega na ração de frangos (PULZ e GROSS, 2004).

3.4 Biocombustíveis

Nos últimos anos, o potencial e a perspectiva de desenvolvimento sustentável de fontes de energias renováveis têm sido extensivamente revisados para se garantir combustível no futuro. Os biocombustíveis representam uma alternativa energética promissora, cujo uso vem crescendo rapidamente, sendo responsável por mais de 20% da energia primária mundial

(EIA, 2010). Por serem renováveis, biodegradáveis e produzirem menores quantidades de emissões de CO₂ para a atmosfera, tem recebido cada vez mais atenção (CHISTI, 2007).

De acordo com Barnabè et al., (2013), os biocombustíveis atualmente disponíveis ou em desenvolvimento são divididos em três ou quatro grupos, designados "gerações", sendo portanto, classificados de acordo com sua progressiva introdução no mercado ao longo dos últimos 20-30 anos.

Os biocombustíveis de primeira geração são baseados em matérias-primas que têm sido tradicionalmente utilizadas como alimento, como o milho ou cana-de-açúcar para produção de etanol e óleos vegetais comestíveis e gordura animal para a produção de biodiesel (BARBNABÈ et al., 2013). Os biocombustíveis derivados da agricultura apresentam custos cumulativos muito mais altos se comparados com os dos combustíveis fósseis, devido à conversão de áreas naturais para a produção de matéria prima, por ocasionarem a fragmentação de habitats naturais, extinções de espécies de seres vivos, redução da biodiversidade, perda de fertilidade do solo e outros efeitos adversos ao meio ambiente, além do aumento nos preços das *commodities* agrícolas, estes são alguns dos pontos quentes em seu debate sobre a sustentabilidade.

Os biocombustíveis de segunda geração têm sua matéria-prima proveniente de biomassa lignocelulósica, bem como resíduos de óleos vegetais e gorduras animais, e quaisquer materiais orgânicos residuais, impróprios para uso na indústria alimentícia ou florestal (BIERNAT, 2013).

Biocombustíveis de terceira geração podem ser originados de biomassa cultivada para este propósito e que não tenha nenhuma competição com a produção de alimentos, a exemplo das microalgas. O aproveitamento do lixo urbano orgânico como matéria-prima se enquadra, também, em algumas definições desta categoria. (MOTA e MONTEIRO, 2013).

Na verdade, os biocombustíveis derivados de microalgas se apresentam atualmente como um dos campos líder das pesquisas mundiais que podem trazer enormes benefícios para os seres humanos e principalmente para o meio ambiente.

Quando processadas através de reações químicas ou biológicas, as microalgas podem fornecer diferentes tipos de biocombustíveis, Tabela 1.5. Estes incluem biodiesel, biohidrogênio, bioetanol, bioquerosene e biometano. Contudo, o foco atualmente concentra-se na produção de biodiesel. A produção de biohidrogênio também tem se popularizado com o seu potencial em aplicações modernas, como as células a combustível. Os outros dois, o bioetanol e o biometano, são considerados como parte de processos integrados (ONCEL, 2013).

Tabela 1.5 – Produtividade de biocombustíveis por diferentes microalgas.

Microalga	Biocombustível	Produtividade
<i>Arthrospira maxima</i>	Hidrogênio, Biodiesel	40-69%
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Hidrogênio	2.5 mL h ⁻¹ /11,73g/L
<i>Chlorella</i>	Biodiesel, Etanol, Metanol	-
<i>Chlorococcum</i>	Biodiesel, Etanol,	7,2 g/l - 10 g/L
<i>Dunaliella sp.</i>	Biodiesel, Etanol,	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Biodiesel	420 GJ/ha/ano
<i>Neochlorosis oleabundans</i>	Biodiesel	56,0 g g ⁻¹
<i>Platymonas subcordiformis</i>	Hidrogênio	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Metanol, Hidrogênio	-
<i>Spirogyra</i>	Etanol	-
<i>Spirulina platensis</i>	Hidrogênio, metano	-

Fonte: Adaptada de Maity et al., (2014).

3.4.1 Bioetanol

O bioetanol pode ser produzido a partir de microalgas através da fermentação; bactérias ou leveduras fermentam carboidratos, como a glicose e amido (BRENNAN e OWENDE 2010, HARUN et al. 2010, SINGH e GU 2010).

Entretanto, a produção de etanol de microalgas ainda está sob investigação e esta tecnologia ainda não tem sido comercializada, visto que o processo de obtenção de etanol a partir de microalgas é o mesmo utilizado quando da obtenção de etanol a partir de biomassas amiláceas e celulósicas e a obtenção da biomassa de microalgas ainda é um processo economicamente inviável. Além disso, antes da fermentação, deve ocorrer um rompimento celular, pois assim tanto os carboidratos presentes na membrana celular e no meio intracelular (armazenados no cloroplasto, por exemplo) estarão disponíveis para a fermentação, aumentando o rendimento (HARUN et al., 2009).

Microalgas como *Chlorella vulgaris* constituem boa fonte de etanol devido ao seu elevado teor de amido (cerca de 37% em peso seco), e para os quais até já foi constatada eficiência de 65% de conversão (HIRANO et al., 1997). *C. littorale* produziu 450 mmol de etanol por grama de biomassa de algas durante a fermentação a 30 °C (UENO et al., 1998). A fermentação de *Spirogyra* produziu uma média de 14-17% de bioetanol (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2008)

Recentemente, a Algenol, empresa que utiliza engenharia genética, registrou patente (US6699696 B2) para produção de bioetanol a partir da fermentação intracelular do piruvato

em uma cianobactéria (<http://algenol.com>), onde o etanol é excretado pela célula para o meio de cultivo. O que aponta que já são grandes os avanços para viabilização do bioetanol através das microalgas.

3.4.2 Biohidrogênio

Microalgas também vêm chamando atenção para seu uso como fonte de produção de biohidrogênio, que atualmente se constitui como uma importante fonte de energia do futuro (SKJÅNES et al., 2013; SAKURAI et al., 2007; TAMAGNINI et al., 2007).

A produção do biohidrogênio a partir de microalgas é realizada pelo uso de sistemas fotobiológicos em fotobiorreatores com condições de cultivo (concentração de CO₂ e O₂ dissolvido, pH, nitrogênio, temperatura, luz e agitação) controladas para favorecer a produção do hidrogênio pelas células.

Melis e Happe, (2001) descobriram que utilizando o processo da fotossíntese em duas fases, a produção de H₂ por clorofíceas atingiria um rendimento máximo teórico de hidrogênio cerca de 198 kg ha⁻¹ dia⁻¹.

3.4.3 Biometano

O processo tecnológico para a obtenção de metano através de microalgas tem recebido considerada atenção por esta produzir compostos de valor agregado no mercado, como o biogás, por exemplo, que consiste principalmente de uma mistura de metano (55-75%) e CO₂ (25-45%) produzidos por microrganismos durante a digestão anaeróbica. O metano da digestão anaeróbica pode ser utilizado como gás combustível e também ser convertido para a geração de eletricidade. Já o CO₂ proveniente da digestão anaeróbia e da queima do metano poderia ser utilizado para o cultivo das microalgas (MORAIS e COSTA 2007; WANG et al. 2008).

A biomassa residual do processo de anaerobiose pode também ser reprocessada para produção de fertilizante. O que agrega alto valor, pois além de ser renovável e sustentável, haveria o estímulo às práticas agrícolas sustentáveis e reduziria os custos da produção das microalgas.

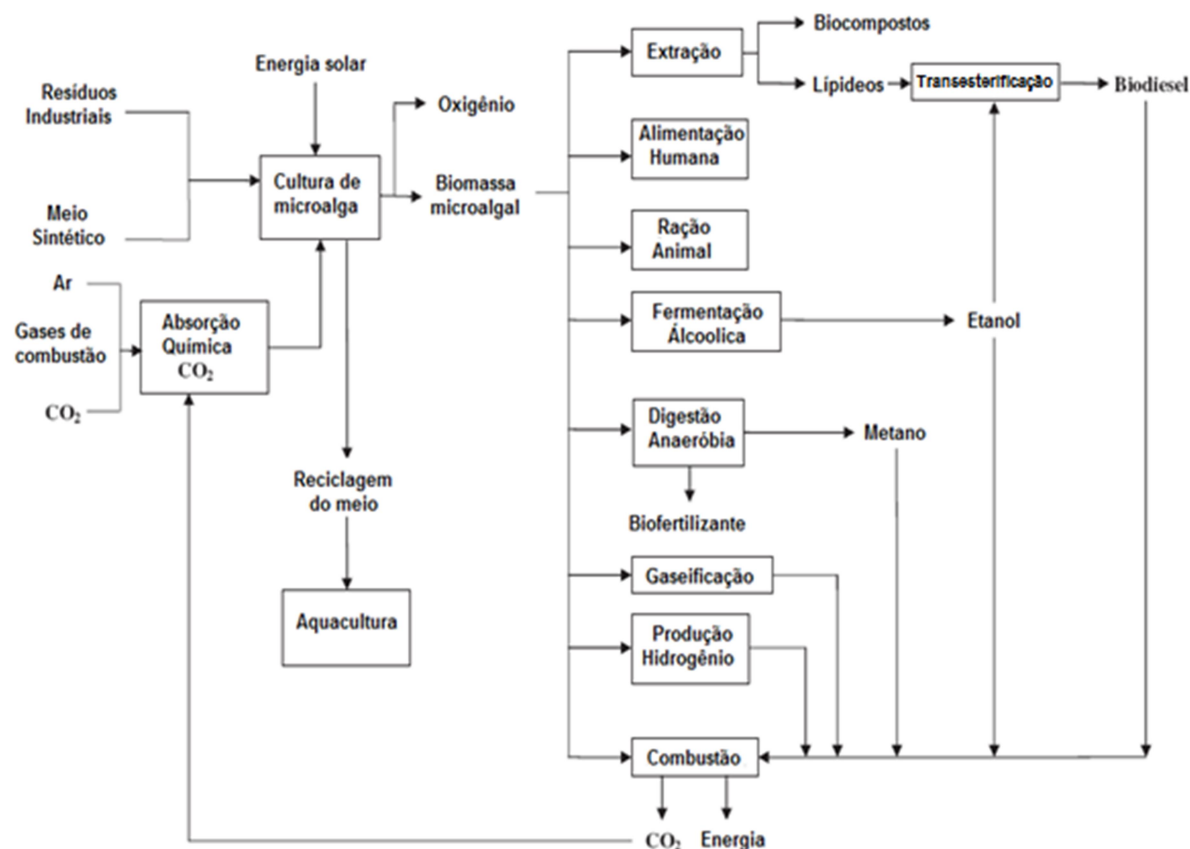
O baixo teor de lignina e celulose presente nas microalgas proporciona ao processo boa estabilidade e alta eficiência na conversão a biogás (BRENNAN e OWENDE 2010, HARUN et al., 2010, SINGH e GU 2010).

3.4.4 Biodiesel

Tecnicamente o biodiesel é um combustível alternativo constituídos por monoalquilésteres de ácidos graxos produzidos comercialmente a partir de algumas fontes oleaginosas vegetais comuns incluindo soja, girassol, algodão, cártamo, colza, palma, dentre outros. Contudo, devido à crescente desaprovação pública sobre o uso de culturas alimentares para a produção de combustível, os pesquisadores voltaram sua atenção para substitutos alternativos não relacionados com a alimentação, como as microalgas (KNOTHE, 2010; AIKINS et al., 2010).

O potencial de produção de biodiesel a partir de microalgas é bastante promissor. Visto que sua produção lipídica pode chegar até 75-80% da biomassa seca, dependendo da espécie e estado fisiológico em que esta se encontra. Além disso, várias outras vantagens justificam o uso das microalgas na produção de biodiesel, tais como a elevada produtividade em lipídeos por área cultivada, quando comparadas com culturas oleaginosas; crescimento em ambientes inóspitos, os quais não são agriculturáveis; utilização de fontes de nutrientes, tais como nitrogênio e fósforo, de uma variedade de fontes de águas residuais, produção de co-produtos de elevado valor agregado; crescimento em fotobiorreatores durante todo o ano (HU et al., 2008; WIJFFELS e BARBOSA, 2010; SCOTT et al., 2010). Tais vantagens estão apresentadas na Figura 1.3, que engloba o processo produtivo do biodiesel, e outros biocombustíveis e produtos potenciais que se agregam a produção do biodiesel.

Figura 1.3 – Cadeia produtiva do biodiesel e de outros produtos de microalga.



Muitas espécies de microalgas podem ser induzidas para acumular quantidades substanciais de lipídeos (NEGI et al., 2016), contribuindo assim para um alto rendimento de óleo. O teor médio de lipídeos na biomassa microalgal varia de 1 a 70%, mas sob certas condições algumas espécies podem atingir até 90% do peso seco (LI et al., 2008; CHISTI, 2007).

A Tabela 1.6 apresenta as variações no conteúdo lipídico e de produtividade de biomassa de diferentes espécies de microalgas marinhas e de água doce.

É possível observar que o teor de óleo em microalgas pode chegar a 75% em peso de biomassa seca, a exemplo da *Botryococcus braunii*. A maioria das microalgas (*Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) tem níveis de óleo entre 20 e 50%. Contudo maiores valores de produtividade podem ser alcançadas quando utilizados cultivos com fatores limitantes de nutrientes.

Tabela 1.6 – Produtividade lipídica de diferentes espécies de microalgas.

Microalga	% Lipídeo	Produtividade Lipídica (mg/L/d)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	24,0–31,0	ND
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0–75,0	ND
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6–16,4/39,8	17,6
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0–63,0	10,3–50,0
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6–57,8	1214
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0–58,0	11,2–40,0
<i>Chlorella</i> sp.	10,0–48,0	42,1
<i>Dunaliella salina</i>	6,0–25,0	116,0
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0–40,0	-
<i>Nannochloris</i> sp.	20,0–56,0	60,9–76,5
<i>Nitzschia</i> sp.	16,0–47,0	ND
<i>Oocystis pusilla</i>	10,5	ND
<i>Pavlova salina</i>	30,9	ND
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0–57,0	44,8
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0–55,0	ND
<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6–21,1	40,8–53,9
<i>Skeletonema costatum</i>	13,5–51,3	17,4
<i>Spirulina platensis</i>	4,0–16,6	ND
<i>Spirulina máxima</i>	4,0–9,0	ND
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20,6	17,4
<i>Tetraselmis</i> sp.	12,6–14,7	43,4

Fonte: Adaptado de Mata et al., (2010)

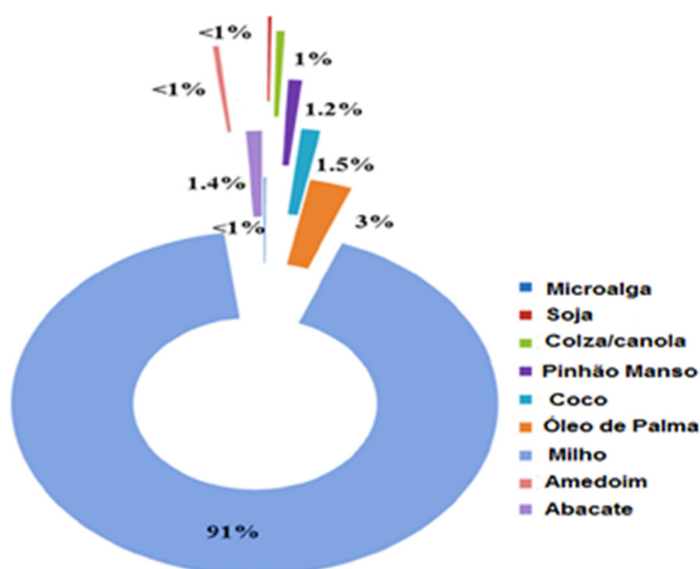
Várias espécies podem se apresentar como viáveis para produção do biodiesel. No entanto, além da eficiência e produtividade, a seleção das espécies deve levar em conta fatores como, a capacidade das microalgas se desenvolverem utilizando os nutrientes disponíveis sob condições específicas ou sob condições ambientais. E também quanto à composição de ácidos graxos, pois estes podem ter um efeito significativo sobre as características do biodiesel produzido.

As microalgas apresentam composição similar às oleaginosas convencionais, apresentando basicamente ácidos graxos saturados e insaturados com cadeias variando entre 12-22 carbonos, alguns deles das famílias ω -3 e ω -6. Thomas et al., (1984) analisaram as composições de ácidos graxos de sete espécies de microalgas de água doce e observaram que todas sintetizavam C14:0, C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3, variando apenas a concentração de cada ácido para cada grupo de espécies. Diferentes fatores nutricionais e ambientais, além das diferentes fases de crescimento das microalgas podem afetar a composição de ácidos graxos. Por exemplo, a privação de nitrogênio e estresse salino induziu a acumulação de C18:1 em todas as espécies tratadas e, até certo ponto a acumulação de C20: 5 em *B. braunii*. Outros

autores também relataram uma diferenciação entre a composição de ácidos graxos de várias espécies de algas (MATA et al., 2010).

Embora o rendimento de óleo de microalgas seja dependente da espécie, este geralmente é elevado quando comparado a culturas vegetais, tal como mostrado na Figura 1.4.

Figura 1.4 – Taxa de produção de biodiesel de microalga e outras matérias-primas.



Fonte: Maity et al., (2014).

3.5 Produção de biodiesel de microalgas

Atualmente, as microalgas são vistas como matéria-prima alternativa para produção de biodiesel, sendo alvo de um grande número de investimentos de organizações públicas e privadas que objetivam utilizar tecnologias mais eficazes e baratas para produzir grandes quantidades de óleo. Embora o biodiesel de microalgas não seja rentável ainda para competir com o diesel fóssil, investigações estão sendo feitas para transformá-lo em um produto economicamente viável. E a principal rota de investigação é a produção do biodiesel, que consiste na separação e secagem da biomassa, extração do óleo e/ou processo de síntese do biodiesel.

3.5.1 Separação da microalga

Após o cultivo, seja em fotobiorreatores ou em sistemas *raceways*, a biomassa de microalgas deve ser separada do meio de cultura para que seja aproveitada. O método adequado para a remoção de elevadas quantidades de água e o processamento de grandes volumes de biomassa de microalgas pode envolver uma ou mais etapas, e podem ser utilizados diferentes métodos físicos, químicos e biológicos para executar a separação sólido-líquida desejada, visto que dependendo do processo podem ser introduzidas substâncias que limitam o desencadeamento da obtenção do produto esperado (BRENNAN e OWENDE 2010, MATA et al. 2010). Os métodos de coleta comumente utilizados incluem a sedimentação, centrifugação, filtração, ultra-filtração, às vezes com uma etapa adicional de floculação ou uma combinação de flotação com floculação (WANG et al., 2008). Meios de cultura são geralmente diluídos, com isso, a recuperação da biomassa do meio tem sido responsável por contribuir com 20-30% do total de gastos para a produção de biomassa (MILLEDGE e HEAVEN, 2013; GRIMA et al., 2003).

Nesse sentido, a literatura vem reportando o uso de biofloculantes como etapa intermediária no processo de separação da biomassa, com o propósito de reduzir o dispendioso processo de centrifugação. Teixeira et al., (2012), por exemplo, utilizaram sementes de *Moringa Oleífera* como agente floculante de *Chlorella vulgaris*, obtendo 89% de floculação em apenas 120 minutos.

A seleção de espécies que são facilmente colhidas viabiliza o processo de produção do biodiesel e de outros produtos de interesse.

3.5.2 Secagem da biomassa microalgal

A etapa de secagem é extremamente importante, visto que elementos intracelulares tais como óleos são difíceis de serem extraídos da biomassa úmida através do uso de solventes, sem uma ruptura prévia da célula. Sendo este extraído com melhores resultados de biomassa liofilizada (MOLINA et al., 2003).

A biomassa úmida obtida após o processo de separação é perecível e deve ser processado rapidamente após a colheita; desidratação ou secagem são comumente utilizadas para esta finalidade, dependendo do produto final desejado. Vários métodos de secagem da biomassa já foram testados, dentre estes se destacam a secagem ao sol, com *spray-drying*

(pulverização da amostra em uma câmara submetida a uma corrente de ar quente), tambor de secagem (*drum-drying*) (transferência de calor para a amostra através das paredes internas do cilindro do tambor), liofilização (congelamento da amostra e remoção da umidade por sublimação), secagem por atomização, por leiteo fluidizado, dentre outras (CARDOSO et al., 2011).

A secagem ao sol é o método mais barato de desidratação. Mas, apresenta desvantagens quanto ao tempo de secagem, exigência de grandes superfícies para secagem, e o risco de perda de material (PRAKASH et al., 1997). A atomização é comumente usada para a extração de produtos de alto valor, mas é relativamente cara e pode causar uma deterioração significativa em alguns pigmentos (DESMORIEUX e DECAEN, 2006). A liofilização é uma das técnicas mais utilizadas, mas também se constitui como um processo caro, para operações em grande escala. Entretanto, seu processo propicia facilitação na extração de óleos.

3.5.3 Extração do óleo de microalgas

Após a secagem, ou em alguns casos utilizando biomassa úmida, segue-se para a ruptura celular das células de microalgas para a liberação dos metabólitos de interesse. Vários métodos de extração podem ser usados dependendo da parede da microalga e, sobretudo da natureza do produto a ser obtido. A extração pode ocorrer por ação mecânica (homogeneizadores, moinhos, ultrassom, autoclave e pulverização) ou ação não-mecânica (congelamento, solventes orgânicos, choque osmótico, hidrólise ácida, básica e reações enzimáticas), ou ainda a combinação de ambas as técnicas visando uma extração eficiente, além da extração por dióxido de carbono supercrítico (SHOW et al., 2015; APARIA et al., 2015).

Idealmente, uma tecnologia de extração de lipídeos para produção de biodiesel de microalgas tem de exibir um nível elevado de especificidade para triacilglicerídeos, a fim de minimizar a co-extração de não-lipídeos contaminantes, ou outras frações de lipídeos que não são tão facilmente convertidos em biodiesel (RAMLUKAN et al., 2014; KIM et al., 2013).

A extração usando solventes orgânicos apresenta-se como o método mais utilizado. O solvente selecionado teve ter como base a seletividade e eficiência na quebra entre as ligações dos lipídeos com as outras organelas das células que apresentam tanto interações de van der Waals quanto ligações covalentes e de hidrogênio. Assim, utiliza-se na extração, solventes

orgânicos polares e apolares para assegurar uma extração completa dos lipídeos das microalgas (HALIM et al., 2012).

Métodos gravimétricos baseados na extração com hexano em *Soxhlet* ou no método de Bligh e Dyer (extração com mistura clorofórmio/metanol) são comumente empregados para extração de lipídeos totais. Contudo, estes apresentam diferentes respostas dependendo do tipo de parede celular constituinte da espécie trabalhada. Além destes, existe uma variedade de solventes que foram testados para essa finalidade com resultados satisfatórios (HALIM et al., 2012). Os utilizados comumente são o hexano, clorofórmio, éter de petróleo, metanol, etanol, isopropanol, diclorometano e a mistura destes.

De forma geral, após a extração são obtidos os lipídeos totais, que compreendem ácidos graxos, hidrocarbonetos, esteróides, acilgliceróis, pigmentos e os glico- e fosfolipídeos. Os lipídeos neutros, que são a fração conversível em biodiesel, são obtidos pela redissolução dos lipídeos totais em hexano, seguida da filtração em carvão ativado para remoção de pigmentos (KROHN et al., 2011).

Têm sido realizados estudos com o emprego de extração assistida por ultrassom ou micro-ondas, buscando-se o máximo de remoção dos lipídeos (RANJAN et al., 2010). Santos et al., (2015) compararam diferentes métodos de extração de lipídeos na biomassa de *Chlorella vulgaris*. Utilizando como solventes: etanol, hexano e misturas de clorofórmio: metanol e distintos mecanismos de ruptura celular, tais como, o uso de homogeneizador Potter e ultrassom. Os mesmos observaram que entre os métodos testados, a mistura clorofórmio: metanol (2:1) assistida por ultrassom foi o mais eficiente, extraindo cerca de 19% do total de lipídeos, das quais 55% eram triglicéridos.

Balasubramanian e colaboradores, (2011) realizaram comparações entre extrações utilizando hexano como solvente extrator, com e sem irradiação de micro-ondas. Segundo os autores, a extração assistida por micro-ondas possibilitou uma maior recuperação de lipídeos, com uma maior proporção de ácidos graxos poliinsaturados. Foram também realizadas comparações entre métodos de rompimento celular, incluindo, além de micro-ondas e ultrassom, a moagem com nitrogênio líquido e lise enzimática. Os resultados apontaram uma melhor eficiência para a moagem com nitrogênio, seguida da lise enzimática. Uma avaliação quanto à viabilidade econômica deve, contudo, ser realizada, principalmente no que diz respeito à obtenção das enzimas (ZHENG et al., 2011).

Um método bastante inovador é a extração por fluido supercrítico, onde o gás carbônico sofre pressão e aquecimento, adquirindo ambas as propriedades de líquido e gás. Este fluido liquefeito atua como solvente, extraindo o óleo da biomassa microalgal. Neste

processo é possível capturar mais energia da célula lipídica, favorecendo a conversão, sendo substancialmente melhor quando comparado ao processo convencional (MORIOKA et al., 2014). Uma restrição ao uso do CO₂ supercrítico é que a amostra deve estar completamente seca, pois a umidade pode servir como barreira à difusão do CO₂, além do custo operacional para cultivos em larga escala (MERCER e ARMENTA, 2011).

Estimativas mais rápidas para quantificação de lipídeos neutros intracelulares *in vivo* podem ser obtidas por citometria em fluxo, utilizando o corante vermelho do Nilo (CHEN et al., 2013). Esta técnica baseia-se na medida da fluorescência do corante dissolvido em lipídeos neutros e da fluorescência da clorofila, com picos de emissão em 570 e 675 nm, respectivamente. Por se tratar de um método rápido e menos laborioso, tem sido muito empregado para seleção de espécies de algas de alta produtividade em triacilgliceróis (MONTERO et al., 2011).

3.6 Síntese e qualidade do biodiesel de microalgas

A produção de biodiesel proveniente de óleo de microalgas ocorre em sua grande maioria a partir processo de transesterificação. Esse processo pode ocorrer via ação de catalisadores, ou em condições supercríticas, com ou sem a presença dos catalisadores (SHARMA e SINGH, 2009). A utilização de catalisadores homogêneos (KOH, NaOH) que é utilizado na transesterificação de óleos convencionais apresenta a desvantagem de que a água deve ser totalmente eliminada das etapas anteriores para que não ocorra reações paralelas, como a saponificação e diminuição do rendimento final do processo (JOTHIRAMALINGAM e WANG, 2009). Sendo que a transesterificação com catalisador ácido pode ser uma alternativa viável por este não apresentar sensibilidade aos ácidos graxos livres.

A transesterificação enzimática catalisada por lipase é outra alternativa, pois esta também não apresenta tal desvantagem além de ocorrer em condições suaves, o que pode também reduzir os custos operacionais (FJERBAEK et al., 2009). Alternativas adicionais podem ser a esterificação seguida de transesterificação, hidroesterificação, ou, ainda, a realização da transesterificação *in situ*. Este último processo facilita a conversão de ácidos graxos para alquil ésteres diretamente no interior da biomassa, eliminando a etapa de extração com solvente. A alcóolise do óleo diretamente na matriz da biomassa conduz a um rendimento em biodiesel maior do que a extração convencional e a geração de resíduos é

reduzida (AMARO et al., 2011). Estes processos podem ser conduzidos ainda com a aplicação de ultrassom ou micro-ondas.

A transesterificação também pode ser conduzida na ausência de catalisador, usando condições supercríticas de álcool. Este processo, no entanto, apesar de conduzir a um menor tempo de reação e reduzir significativamente os processos de separação e purificação dos produtos, requer altas temperaturas e pressão, onerando em termos materiais e energéticos (DEMIRBAS, 2002).

A hidroesterificação se compõe como uma alternativa ao processo convencional de transesterificação, por não requerer tanta seletividade na escolha da matéria-prima. Podendo ser empregada fontes graxas com alto teor de água, como biomassa úmida de microalgas, e/ou elevada acidez (ARCEO, 2012). Segundo Bueno (2007), o processo consiste numa reação de hidrólise que converte triglicerídeos em ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos, e glicerol. Sendo o glicerol removido ao final deste processo, evitando interação com o álcool ou com o biodiesel. Seguidamente tem-se a etapa da esterificação dos ácidos graxos com metanol ou etanol, gerando biodiesel (produto) e água (subproduto).

Vários estudos demonstram a capacidade de transformação do óleo de microalga em biodiesel por diversas rotas de síntese, pois esse campo é bastante recente e carece de desenvolvimento de metodologias que propiciem rendimentos satisfatórios para que a produção de biodiesel de microalgas seja concretizada e economicamente viável.

Xu e colaboradores (2006) avaliaram a espécie *Chlorella protothecoides*, quanto ao seu potencial de produção de biodiesel utilizando transesterificação por catálise ácida. Foram determinadas algumas propriedades do biodiesel e estas foram comparadas com a Resolução vigente da ANP. Observou-se que houve uma conversão satisfatória do óleo em biodiesel e que este se enquadrava em todos os parâmetros avaliados.

Umdu e colaboradores (2009) realizaram a produção de biodiesel a partir da microalga *Nannochloropsis oculata*. A transesterificação ocorreu via catalítica (Al_2O_3 , CaO e MgO) e a mistura de óxidos mostrou alta atividade na conversão de ésteres, obtendo-se um rendimento de biodiesel em torno de 97%. Aliado a isso, o catalisador utilizado na reação de transesterificação pôde ser empregado por mais duas vezes, tornando o processo economicamente rentável.

Visando superar as limitações da etapa de extração do óleo de microalgas, Johnson e Wen, (2009) avaliaram o potencial de produção de biodiesel a partir da *Schizochytrium limacinum* através da transesterificação *in situ* da biomassa algal utilizando como solventes, clorofórmio, hexano ou éter de petróleo. Produziu-se biodiesel através de dois métodos:

extração do óleo das células de microalgas, seguida por transesterificação, e transesterificação direta (*in situ*) da biomassa microalgal. Os autores obtiveram o maior rendimento em biodiesel, quando utilizaram a transesterificação direta. Os principais ésteres metílicos de ácidos graxos contidos no biodiesel foram ésteres de ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido docosa-pentaenóico (C22:5) e ácido docosa-hexaenoico (C22:6). E apenas os valores para água e sedimentos e o teor de enxofre se enquadraram na norma, em relação aos parâmetros avaliados.

A transesterificação *in situ* em duas etapas para a produção de biodiesel também foi avaliada por Xu e Mi, (2011) a partir da biomassa seca de *Spirulina*, usando-se cossolvente: tolueno, diclorometano e dietiléter, bem como as combinações destes. Dentre as opções avaliadas, o sistema tolueno: metanol na proporção 2:1 apresentou a uma maior eficiência, com rendimento em biodiesel de 76% no primeiro ciclo de transesterificação *in situ* e 10% no segundo ciclo.

Além disso, deve ser dado destaque para a utilização de técnicas assistidas por ultrassom, que através do efeito da cavitação podem promover reações eficientes, como no caso da obtenção de biodiesel por transesterificação *in situ* derivado da *Chlorella vulgaris*. No experimento foi empregada uma sonda de ultrassom de 500 W, proporcionando a obtenção direta do biodiesel. O percentual de ésteres obtido foi de 60% (HOBBUS et al., 2011).

Diante do exposto o biodiesel de microalgas tende a se tornar uma alternativa promissora apropriada para substituir os combustíveis fósseis, contudo é necessário avaliar a qualidade final do biodiesel produzido, para que este esteja apto para inserção no mercado. A Tabela 1.7 apresenta uma comparação entre os parâmetros físico-químicos do biodiesel obtido a partir de microalgas com as propriedades do óleo diesel. As propriedades foram avaliadas de acordo com as normas estabelecidas pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM). Como pode ser observado, o biodiesel obtido de microalgas apresentou características semelhantes às do diesel.

Tabela 1.7 – Propriedades do biodiesel obtido de microalgas em comparação com as do óleo diesel e especificações da ASTM.

Propriedades	Biodiesel de microalgas	Óleo diesel	Normas ASTM
Densidade (kg/L)	0,864	0,838	0,84-0,90
Viscosidade (mm ² /s, 40 °C)	5,2	1,9-4,1	3,5-5,0
Ponto de fulgor (°C)	115	75	Mín 100
Ponto de solidificação (°C)	-12	-50-10	-
Acidez (mg KOH/g)	0,374	máx 0,5	máx 0,5
Poder calorífico (J/kg)	41	40-45	-

Fonte: Adaptado de Johnson e Wen, (2009).

Johnson e Wen, (2009) avaliaram parâmetros como glicerol livre, número de acidez, conteúdo saponificável, viscosidade, material particulado, dentre outros, no biodiesel obtido a partir do óleo da microalga *Schizochytrium limanicum*. A partir desta avaliação, os autores enfatizaram que a biomassa microalgal não só é uma fonte sustentável do ponto de vista sócio-econômico para a produção de biodiesel, como também o produto obtido possui as características físico-químicas apropriadas para utilização como fonte de bioenergia.

REFERÊNCIAS

AHMADZADENIA, Y.; NAZERADL, K.S.; HEZAVE, G.M.; HEJAZI, A.; HASSANPOUR, S.; CHAICHISEMSARI, M.; RIYAZI, S. R. Effect of replacing soybean meal with Spirulina on carcass composition of rainbow trout. **J. Agric. Biol. Sci.**, v.6, n.6, p. 66-71, 2011.

AHMED, F.; FANNING, K.; NETZEL, M.; TURNER, W.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity os microalgae from subtropical coastal and brackish water. **Food Chemistry**, v. 165, p. 300-306, 2014.

AIKINS, G.P.; NADIM, A.; EL-HALWAGI, M.M.; MAHALEC, V. Design and analysis of biodiesel production from algae grown through carbon sequestration. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v.12, p.239–54, 2010.

AMARO, H.M.; GUEDES, A.C.; MALCATA, F.X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v.88, n.10, p.3402-3410, 2011.

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde da microalga *Spirulina*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.2, p.115-123, 2008.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V.; Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v.32, n.5, p.1551-1556, 2008.

APARIA, T.; MVSS, M.; MEHROTRA, R.; SHUKLA, P.; MEHROTRA, S. Developments and challenges in biodiesel production from microalgae: A review. **Biotechnology and applied biochemistry**, 2015.

ARCEO, A. A. Produção de biodiesel mediante o processo de hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata*. 2012. 205f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro. 2012.

BAGRE, P.; PARASHAR, A.; VYAS, V.; BHARGAVA, S.; SAROCH, J.D. Comparative study of different percentage of natural carotenoid source *Spirulina platensis* on growth and survival of *Puntius sophore*. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS)**, v.2, n.4, p.2210, 2012.

BAHADAR, A.; KHAN, M.B. Progress in energy from microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.27, p.128–148, 2013.

BALASUBRAMANIAN, S.; ALLEN, J. D.; KANITKAR, A.; BOLDOR, D. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system–design, optimization, and quality characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3396-3403, 2011.

BARNABÈ, D.; BUCCHI, R.; RISPOLI A.; CHIAVETTA, C.; PORTA, P.L.; BIANCHI C.L.; PIROLA, C.; BOFFITO, D.C.; CARVOLI, G. Land Use Change Impacts of Biofuels: A Methodology to Evaluate Biofuel Sustainability. INTECH Open Access Publisher, 2013.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC press, 2014.

BAWEJA, P.; SAHOO, D.. Classification of Algae. In: **The Algae World**. Springer Netherlands, 2015. p. 31-55.

BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; ILVEIRA, J.L.B.; Revisão: Biotecnologia de microalgas. **B.CEPPA**, v.26, n.1, p.9-20, 2008.

BIERNAT, K.; MALINOWSKI, A.; GNAT, M. The Possibility of Future Biofuels Production Using Waste Carbon Dioxide and Solar Energy, 2013.

BOHN, J.A.; BEMILLER, J.N. (1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v.28, p.3-14, 1995.

BORGHETT, I. A. Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipuladora. Dissertação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, p.313-321, 1999.

BRANDINI, F.P.; R.M. LOPES; K.S. GUTSEIT; H.L. SPACH; R. SASSI. Planctologia na plataforma continental do Brasil. Diagnose e revisão bibliográfica. Rio de Janeiro, MMA-CIRM-FEMAR, 196p., 1997.

BRENNAN, L.; OWENDE, P, Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.557–577, 2010.

BROCK, T.D. **Thermophilic microorganisms and life at high temperatures**. Springer Science & Business Media, 2012.

BROWN, L.M. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. **Energy Conversion and Management**, v.37, n.6, p.1363–7, 1996.

BUENO, A. H. D. Análise preliminar comparativa técnica e econômica na cadeia de produção de biodiesel. 2007. 51f. Monografia-Graduação em Engenharia Mecânica, Centro Universidade Positivo, Curitiba, 2007.

CABRITA, M.T.; VALE, C.; RAUTER, A.P. Halogenated compounds from marine algae. **Marine drugs**, v. 8, n. 8, p. 2301-2317, 2010.

CARDOSO, A.S.; VIEIRA, G.E.G.; MARQUES, A.K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **R. bras. Bioci.**, v.9, n.4, p.542-549, 2011.

CARDOZO, K.H.M; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLA, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.146, p.60-78, 2007.

CARLSSON, A.S.; BOWLES, D.J. Micro-and macro-algae: utility for industrial applications: outputs from the EPOBIO project. Tall Gables, The Sydings, Speen, Newbury, Berks RG14 1RZ, UK: CPL Press; 2007.

CHANG, E.H.; YANG, S.S. Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.44, n.1, p.43–52, 2003.

CHIATTONI, L.M.; CHIATTONI, L.M.; MACHADO, M.R.G.; RODRIGUES, R.D.S.; SOARES, L.A.D.S. Influence of consumption of different levels of Spirulina on the development and lipid profile in rats. **Revista Ceres**, v.62, n.2, p.142-148, 2015.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v.26, n.3, p.126–31, 2008.

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

CHOJNACKA, K.; CHOJNACKI, A.; GÓRECKA, H. Biosorption of Cr^{3+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. **Chemosphere**, v.59, n.1, p.75–84, 2005.

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P. Functional properties of carotenoids originating from algae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 1, p. 5-11, 2013.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnol Adv**, v.29, n.6, p.686-702, 2011.

CHU, W.-L.; LIM, Y.-W.; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P.-E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 53, p. 3-8, 2010.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v.98, n.7, p.1489-1493, 2007.

CONVERTI, C.; LODI, A.; BORGHI, A. D.; SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v.32, n.1, p. 13-18, 2006.

COSTA, J.A.V.; MORAIS, M.G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource technology**, v.102, n.1, p.2-9, 2011.

DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L.; RAMPIN, M.A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v.32, n.3, p.776-792, 2009.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; ARRIAGA, S.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; ROSALES-COLUNGA, L.M.; RAZO-FLORES, E. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v.7, p.27–45, 2008.

DELABARY, G.S. Avaliação do crescimento de três microalgas para a remoção de nutrientes de efluente de estação de tratamento de dejetos suínos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

DEMIRBAŞ, A. Partly chemical analysis of liquid fraction of flash pyrolysis products from biomass in the presence of sodium carbonate. **Energy conversion and management**, v. 43, n. 14, p. 1801-1809, 2002.

DERNER, R. Cultivo de plantas aquáticas. In: VINATEA ARANA, L. (ed.) *Fundamentos de Aquicultura*. Florianópolis: UFSC, p. 85-10, 2004.

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1959, 2006.

DESMORIEUX, H.; DECAEN, N. Convective drying of spirulina in thin layer. **Journal of Food Engineering**, v.66, n.4, p.497–503, 2006.

DINIS, M. A.; MONTEIRO, A.; BOAVENTURA, R. Tratamento de águas residuais: o papel das microalgas. **Revista da faculdade de ciência e tecnologia**. ISSN 1646-0499.1, p. 41-54. 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations. A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO Fisheries and Aquaculture circular. n.1034, 33p, 2008.

FIGUEIRA, F.S.; CRIZEL, T.M.; SILVA, C.R; SALAS-MELLADO, M.M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. **Braz. J. Food Technol.**, v.14, n.4, p.308-316, 2011.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K.V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnol. Bioeng.** v.102, 1298–1315, 2009.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA FUKUDA, N.; HABE, H.; ITO, M.; Biodegradation of biodiesel wash water from a biodiesel fuel production plant. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 7, p. 525-532, 2013.

GAN, K.; MOU, X.; XU, Y.; WANG, H. Application of ozonated piggery wastewater for cultivation of oil-rich *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresource Technology**, v.171, p. 285-290, 2014.

GATTULLO, C.E.; BÄHRS, H.; STEINBERG, C.E.; LOFFREDO, E. Removal of bisphenol: A by the freshwater green alga *Monoraphidium braunii* and the role of natural organic matter. **Sci Total Environ**, v.416, p.501-6, 2012.

GEIDER, R. **Algal photosynthesis**. Springer Science & Business Media, 2013.

GHOSH, A.; KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O. N.; SAINI, S.; BHOWMICK, T. K.; GAYEN, K. Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 113, p. 104-118, 2016.

GREENWELL, H.C.; LAURENS, L.M.L.; SHIELDS, R.J.; LOVITT, R.W.; FLYNN, K.J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **J. R. Soc. Interface**, v.7, p.703–726, 2010.

GRIFFITHS, M.J.; HARRISON, S.T.L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **J. Appl. Phycol**, v.21, p.493-507, 2009.

GRIMA, E.M.; BELARBI, E.-H.; FERNÁNDEZ, F.G A.; MEDINA, A. R.; CHIST, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v.20, p.491-515, 2003.

GROBBELAAR, J.U. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. **Journal of Botany**, v.70, n.1, p.140-144, 2004.

GUEDES, A.C; MALCATA, F.X. **Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture**. INTECH Open Access Publisher, 2012.

GÜROY, B.; ŞAHİN, İ.; MANTOĞLU, S.; KAYALI, S. *Spirulina* as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. **Aquaculture International**, v.20, n.5, p.869-878, 2012.

HALIM, R.; DANQUAH, M.K.; WEBLEY, P.A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 709-732, 2012.

HAN, C.M.; YANG, J.Q.; CHEN, H.T.; ZHANG, H.; LIU, M.S.C.N. Patent 101 735 948 A. 2010.

HARUN, R., DANQUAH, M.K.; FORDE, G.M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v.85, n.2, p.199-203, 2009.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, GARETH M. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.1037–1047, 2010.

HIRANO, A.; UEDA, R.; HIRAYAMA, S.; OGUSHI, Y. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. **Energy**, v.22, n.2, p.137–42, 1997.

HO, S.A.; CHEN, W.; CHANG, J. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.101. p.8725–8730, 2010.

HOBUSS, C.B.; ROSALES, P.F.; VENZKE, D.; SOUZA, P.O.; GOBBI, P.C.; GOUVEA, L.P.; SANTOS, M.A.Z.; PINTO, E.; JACOB-LOPES, E.; PEREIRA, C.M. P. Cultivation of algae in photobioreator and obtention of biodiesel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 361-364, 2011.

HONDULA, K.L.; PACE, M.L.; COLE, J.J.; BATT, R.D. Hydrogen isotope discrimination in aquatic primary producers: implications for aquatic food web studies. **Aquatic sciences**, v. 76, n. 2, p. 217-229, 2014.

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

JOHNSON, M. B.; WEN, Z. Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 10, p. 5179-5183, 2009.

JOTHIRAMALINGAM, R.; WANG, M.K. Review of recent developments in solid acid, base, and enzyme catalysts (heterogeneous) for biodiesel production via transesterification. **Ind. Eng. Chem. Res**, v.48, p.6162–6172, 2009.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R.M.; MURTHY, G.S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. **Energies**, v. 6, n. 9, p. 4607-4638, 2013.

KESAANO, M.; GARDNER, R. D.; MOLL, K.; LAUCHNOR, E.; GERLACH, R.; PEYTON, B.M.; SIMS, R.C. Dissolved inorganic carbon enhanced growth, nutrient uptake, and lipid accumulation in wastewater grown microalgal biofilms. **Bioresource technology**, v. 180, p. 7-15, 2015.

KIM, J.; YOO, G.; LEE, H.; LIM, J.; KIM, K.; KIM, C. W.; PARK, M. S.; YANG, J. W. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.31, p.862–876, 2013.

KIRK, E.A.; BEHRENS, P.W. Commercial developments in microalgal Biotechnology. **Journal of Phycology**, n.35, p.215–226. 1999.

KNOTHE G. Biodiesel and renewable diesel: a comparison. *Progress in Energy and Combustion*. **Science**, v.36, p.364–73, 2010.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal research**, v. 6, p. 52-63, 2014.

KROHN, B. J.; MCNEFF, C. V.; YAN, B.; NOWLAN D.; Production of algae-based biodiesel using the continuous catalytic Mcgyan® process. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 94-100, 2011.

KUMAR, K.S.; DAHMS, H.U.; WON, E.J.; LEE, J.S.; SHIN, K.H. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. **Ecotox. Environ. Safe**, v.113, p.329–352, 2015.

LA BARRE, S.; POTIN, P.; LEBLANC, C.; DELAGE, L. The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. **Marine drugs**, v.8, n.4, p.988-1010, 2010.

LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Manual on the production and use of live food for aquacultures. FAO Fisheries Technical Paper. n.361. Rome, FAO. 295p, 1996.

LEITE, G.B.; ABDELAZIZ, A.E.; HALLENBECK, P.C. Algal biofuels: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v.145, p.134-141, 2013.

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

LIU, T.Z.; ZHANG, W.; CHEN, Y.; PENG, X.W.; CHEN, X.L.; CHEN, L. CN Patent 102 206 570 A. 2010.

LOBO, E.A.; CALLEGARO, V.L.M.; HERMANY, G.; BES, D.; WETZEL, C.E.; OLIVEIRA, M.A. Use of epilithic diatoms as bioindicator from lotic systems in southern Brazil, with special emphasis on eutrophication. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.16, n.1, p.25-40, 2004.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. São Paulo: Rima, 1 ed, 606 p., 2006.

LU, W.; WANG, Z.; WANG, X.; YUAN, Z. Cultivation of *Chlorella* sp. using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. **Bioresource Technology**, v.192, p. 382-388, 2015.

MADHU, G.M.; SATYANARAYANA, S.V. Spirulina in combating Protein Energy Malnutrition (PEM) and Protein Energy Wasting (PEW)-A review. **Journal of Nutrition Research**, v. 3, n. 1, p. 62-79, 2015.

MAITY, J. P.; BUNDSCHUH, V.; CHEN, C.; BHATTACHARYA, P. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives: A mini review. **Energy**, p.1-10, 2014.

MARKOU, G., ICONOMOU, D., MUYLAERT, K. Applying raw poultry litter leachate for the cultivation of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v.13, p. 79-84, 2016.

MARTÍNEZ, M.E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J.M.; EL YOUSFI, F.; MUNÓZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v.73, n.3, p.263-72, 2000.

MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.217-232, 2010.

MELIS, A.; HAPPE, T. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. **Plant Physiology**, v.127, n.3, p.740-8, 2001.

MERCER, P.; ARMENTA, R.E. Developments in oil extraction from microalgae. **European journal of lipid science and technology**, v. 113, n. 5, p. 539-547, 2011.

MILLEDGE, J.J.; HEAVEN, S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 165-178, 2013.

MOLINA, G.E.; BELARBI, E.H; ACIEN, F.FG, ROBLES, M.A, CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v.20, n.7, p.491-515, 2003.

MONTERO, M.F.; ARISTIZÁBAL, M.; REINA, G.G. Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. **Journal of applied phycology**, v. 23, n. 6, p. 1053-1057, 2011.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v.48, n.7, p.2169-73, 2007.

MOREIRA, R. T. Avaliação dos polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga *Dunaliella tertiolecta* como imunoestimulante em juvenis de camarão *Litopenaeus vannamei*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MORIOKA, L.R.I.; MATOS, A.P.; OLIVO, G.; SANT'ANNA, E. S. Flocculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. **Quim. Nova**, v.37, n.1, p.44-49, 2014.

MOTA, C.J.A.; MONTEIRO, R.S. Química e sustentabilidade: novas fronteiras em biocombustíveis. **Quim. Nova**, v.36, n.10, p.1483-1490, 2013.

NEGI, S.; BARRY, A.N.; FRIEDLAND, N.; SUDASINGHE, N.; SUBRAMANIAN, S.; PIERIS, S.; SAYRE, R. Impact of nitrogen limitation on biomass, photosynthesis, and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 803-812, 2016.

NEJAT, P.; JOMEHZADEH, F.; TAHERI, M.M.; GOHARI, M.; MAJID, M.Z.A. A global review of energy consumption, CO₂ emissions and policy in the residential sector (with an overview of the top ten CO₂ emitting countries). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.43, p.843-862, 2015.

NORTON, T.A.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R.A. Algal biodiversity. **Phycologia**, n. 35, p.308-326, 1996.

ONCEL, S.S. Microalgae for a macroenergy world. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.26, p.241-264, 2013.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource technology**, v. 156, p. 146-154, 2014.

PEREZ-GARCIA, O. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v.45, p.11-36, 2011.

PERIN, G.F.; SCHLOSSER, J.F.; DE FARIAS, M.S.; ESTRADA, J.S.; TREICHEL, H.; GALON, L. Emissões de motor agrícola com o uso de diferentes tipos de diesel e concentrações de biodiesel na mistura combustível. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, n.12, p.1168-1176, 2015.

PIGNOLET, O.; JUBEAU, S.; VACA-GARCIA, C.; MICHAUD, P. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 781-796, 2013.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in food Science & Technology**, v.19. p.31-39, 2008.

PRAKASH, J.; PUSHPARAJ, B.; CARLOZZI, P.; TORZILLO, G.; MONTAINI, E.; MATERASSI, R. Microalgae drying by a simple solar device. **International journal of solar energy**, v. 18, n. 4, p. 303-311, 1997.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, p.635–648, 2004.

RAMIREZ, N.N.V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of Microalgae *Scenedesmus* sp in Ethanol Vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 630-635, 2014.

RAMLUKAN, K.; MOODLEY, K.G.; BUX, F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**, v.116, p.103–108, 2014.

RANJAN, A.; PATIL, C.; MOHOLKAR, V. S.; Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 6, p. 2979-2985, 2010.

REITAN, K.I.; JR RAINUZZO Y OLSEN. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. **J. Phycol.**, v.30, p.972-979, 1994.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G.C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.102, n.1, p.100–12, 2009.

RODRIGUES, J.B.R., FILHO, P.B. Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinicultura enriquecido com uréia. **Biotemas**, v.17, n.2, p.7-26, 2004.

SAKURAI, H.; MASUKAWA, H. Promoting R&D in photobiological hydrogen production utilizing mariculture-raised cyanobacteria. **Mar. Biotechnol**, v.2, p.128-145, 2007.

SANTOS, R. R.; Moreira, D. M.; Kunigami, C. N.; Aranda, D. A. G.; Teixeira, C. M. L. L. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 22, p. 95-99, 2015.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenge and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v.21, p.277–286, 2010.

SHARMA, Y.C.; SINGH, B. Development of biodiesel: current scenario. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, n.6, p.1646–51, 2009.

SHOW, K-Y.; LEE, D.J.; TAY, J.H., LEE, T.M., CHANG, J.S. Microalgal drying and cell disruption–recent advances. **Bioresource technology**, v. 184, p. 258-266, 2015.

SILVA, L. A. Estudo do Processo Biotecnológico de Produção, Extração e Recuperação do Pigmento Ficocianina da *Spirulina platensis*. UFPR. Curitiba, 90 p., 2008.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n.9, p.596-2610, 2010.

SINGH, R.N.; SHARMA, S. Development of suitable photobioreactor for algae production—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2347-2353, 2012.

SIRAKOV, I.; VELICHKOVA, K.; NIKOLOV, G. The effect of algae meal (Spirulina) on the growth performance and carcass parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Bio. Sci. Biotech.** p.151-156, 2012.

SIVA KIRAN, R.R.; MADHU, G.M.; SATYANARAYANA, S.V.; BINDIYA, P. Bioaccumulation of Cadmium in Blue Green Algae Spirulina (*Arthrospira*). **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2012.

SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 172-215, 2013.

SORANSO, A.M.; GABRIEL FILHO, A.; LOPES, A.; SOUZA, E.G.; DABDOB, M.J.; FURLANI, C.E.A.; CAMARA, F.T.; Desempenho dinâmico de um trator agrícola utilizando biodiesel destilado de óleo residual. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.5, p.553, 2008.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Comercial applications of microalgae, Review. **Journal of Bioscience and bioengineering**, v.101, n.2, p.87-96, 2006.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Review**, v.16, p.4316-4342, 2012.

SYDNEY, E. B.; DA SILVA, T.E.; TOKARSKI, A.; NOVAK, A.C.; DE CARVALHO, J.C.; WOICIECHOWSKI, A.L.; SOCCOL, C.R. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, v. 88, n.10, p.3291-3294, 2011.

TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S.; SIMPSON, C.G. Removal of Copper and Immobilized Microalga, *Chlorella Vulgaris*. In: Wong, Y. S. e Tam, N.F.Y. Wastewater Treatment with Algae. Springer-Verlag, v. 2, p. 17-36. 1998.

TAMAGNINI, P.; LEITAO, E.; OLIVEIRA, P. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.31, p.692–720, 2007.

TEIXEIRA, C.M.L.L.; KIRSTEN, F.V.; TEIXEIRA, P.C.N. Evaluation of Moringa oleifera seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 3, p. 557-563, 2012.

THOMAS, W.H.; TORNABENE, T.G.; WEISSMAN, J. Screening for lipid yielding microalgae: activities for 1983. SERI/STR-231-2207, 1984.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; LEÓN, M.; RAPOSO, F.; RINCÓN, B. Assessment of a microalgae pond for post treatment of the effluent from an anaerobic fixed bed reactor treating distillery wastewater. **Environmental Technology**, v.29, n.9, p.985- 992, 2008.

UENO, Y.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, p.38–43, 1998.

UMDU, E. S.; TUNCER, M.; SEKER, E. Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al₂O₃ supported CaO and MgO catalysts. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 11, p. 2828-2831, 2009.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFEELS, R. H.; BARBOSA, M, J. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v.135, p.142-149, 2013.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C.Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, n.5, p.707–18, 2008.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An outlook on microalgal biofuels. **Science**, v.329, p.796–799, 2010.

WOERTZ, I.; FEFFER, A.; LUNDQUIST, T.; NELSON, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **Journal of Environmental Engineering**, v.135, n.11, p.1115-1122, 2009.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q.; J. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 499-507, 2006.

XU, R.; MI, Y. Simplifying the process of microalgal biodiesel production through in situ transesterification technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 1, p. 91-99, 2011.

YOO, C.; JUN, S-Y.; LEE, J-Y.; AHN, C-Y.; OH, H-M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v.101, p.71–4, 2010.

ZAMALLOA, C.; VULSTEKE, E.; ALBRECHT, J.; VERSTRAETE, W. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1149-1158, 2011.

ZENG, X.; GUO, X.; SU, G.; DANQUAH, M.K.; ZHANG, S.; LU, Y.; LIN, L. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1385-1392, 2015.

ZHENG, H.; YIN, J.; GAO, Z.; HUANG, H.; JI, X.; DOU, C. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1215-1224, 2011.

ZHU, J.; RONG, J.; ZONG B. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. **Chinese Journal of Catalysis**, v.34, p.80–100, 2013.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 41, p. 1376-1384, 2015.

CAPÍTULO 2

BIOPROSPECÇÃO EM ALGUMAS ESPÉCIES DE MICROALGAS DO NORDESTE DO BRASIL EM RELAÇÃO AO SEU USO POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL*

RESUMO

Microalgas tem sido objeto de diversos estudos recentes destinados à produção de biodiesel. No entanto, estas culturas serão apenas competitivamente viáveis para tal finalidade se as espécies utilizadas como matéria-prima apresentarem elevadas produtividades de biomassa e de ésteres. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes espécies de microalgas isoladas de ambientes marinhos e de água doce da região nordeste do Brasil, em relação à sua capacidade de produção de biomassa e de acumulação de ésteres. A pesquisa também teve a intenção de caracterizar as mudanças no perfil de ácidos graxos de cada espécie e sua influência sobre as propriedades do biodiesel produzido. As espécies isoladas foram mantidas em câmara de cultura climatizada e fotoperíodo de 12 horas. O desenvolvimento das culturas foi acompanhado por contagem de células e por análises de fluorescência “in vivo”. As culturas foram interrompidas na fase estacionária e a biomassa produzida foi centrifugada e liofilizada. O total de ésteres e a composição de ácidos graxos foram determinados por GC-MS. Os resultados mostraram um uso potencial para a produção de biodiesel em *Pediastrum tetras*, *Scenedesmus acuminatus*, *Chlamydomonas* sp., *Lagerheimia longiseta*, *Amphora* sp., *Monoraphidium contortum*, *Chlorella* sp. e *Cosmarium* sp. Estas espécies mostraram uma elevada produtividade em biomassa (0,28 a 0,95 g L⁻¹ d⁻¹) e conteúdos em ésteres mais elevados do que a soja (de 229,6 a 584,9 mg g⁻¹).

Palavras-chave: Biocombustíveis, micro-organismos fotossintetizantes, perfil de FAME.

* Artigo publicado na Revista de Química Industrial, v.752, p.67-77, 2016.

1. INTRODUÇÃO

O potencial e a perspectiva de desenvolvimento sustentável de fontes de energias renováveis têm recebido grande atenção nos últimos anos visando garantir combustível no futuro (SINGH, NIGAM e MURPHY, 2011). Os biocombustíveis representam uma alternativa energética promissora por serem renováveis e biodegradáveis, e emitirem menores quantidades de CO₂ para a atmosfera (CHISTI, 2007).

Quando derivados de microalgas, os biocombustíveis apresentam-se como líder no campo das pesquisas mundiais, uma vez que geram benefícios aos seres humanos e, principalmente, ao meio ambiente.

Uma vez processada através de reações químicas ou biológicas, a biomassa das microalgas pode fornecer diferentes tipos de biocombustíveis: biodiesel, biohidrogênio, bioetanol, bioquerosene e biometano (DEMIRBAS, 2011). Todavia, atualmente o foco tem se concentrado na produção de biodiesel. O biohidrogênio também tem se popularizado com o seu potencial em aplicações modernas, como as células de combustível, enquanto o bioetanol e o biometano são considerados como parte de processos integrados (ONCEL, 2013).

Muitas vantagens justificam o uso das microalgas como promissoras para produção de biodiesel: a sua produção lipídica pode chegar até 70% da biomassa seca, dependendo da espécie e estado fisiológico em que esta se encontra (PRAGYA, PANDEY e SAHOO, 2013); a produtividade em lipídeos por área cultivada é elevada quando comparada com culturas oleaginosas; produzem co-produtos de alto valor agregado; para o cultivo podem ser usadas fontes de nutrientes, tais como nitrogênio e fósforo, de uma variedade de águas residuais, bem como podem ser cultivadas em locais inóspitos, cujo solo não é favorável à prática agrícola convencional, através da implantação de fotobiorreatores, que possibilitam ciclos contínuos de produção durante todo o ano (HU et al., 2008; SCOTT et al., 2010; WIJFFELS e BARBOSA, 2010). Entretanto, o biodiesel de microalgas ainda não é rentável a ponto de competir com o diesel fóssil, o que tem despertado uma gama de investigações para transformá-lo em um produto economicamente viável (BEHZADI e FARID, 2007; DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2011).

A seleção de espécies de alto potencial biotecnológico é um aspecto importante a ser considerado, uma vez que pode levar à redução de custos no processo produtivo. Para ser competitiva como fonte de matéria-prima para produção de biocombustível, a espécie utilizada deve apresentar elevada eficiência fotossintética e produtividade lipídica acentuada, além de ter composição química adequada que proporcione um combustível de qualidade (JI

et al., 2013). Tais fatores convergem para a necessidade de bioprospecção de espécies de microalgas, principalmente as regionais, já que a grande maioria destas ainda permanece química e metabolicamente inexplorada (SHEEHAN et al., 1998). O presente estudo teve o propósito de avaliar cepas de microalgas isoladas da região Nordeste do Brasil quanto ao seu potencial para produção de biodiesel, levando em consideração suas taxas de crescimento celular e sua composição em ésteres metílicos de ácidos graxos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e isolamento das cepas de microalgas

Amostras de água de diferentes ambientes lacustres dos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia foram coletadas em frascos de vidro e garrafas PET e transportadas em condições herméticas ao Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), onde alíquotas das amostras foram transferidas para balões de 250 mL contendo os meios de cultura WC (GUILLARD e LORENZEN, 1972), Zarrouk (ZARROUK, 1966) e Conway (WALNE, 1970) e mantidos numa câmara de cultivo a 25 °C (± 1 °C) dotada de sistema de iluminação, com fotoperíodo de 12 horas.

A partir da observação do crescimento celular procedeu-se o isolamento em microscópio binocular usando micropipetas capilares (LOURENÇO, 2006). Quando constatada a obtenção de culturas unialgais, estas foram codificadas e incorporadas ao Banco de Cultura de Microalgas do LARBIM/UFPB.

A identificação das espécies cultivadas foi feita com base em suas características morfológicas utilizando critérios diacríticos (HINDAK, 1990), a partir de observações efetuadas em microscópio Leica em vários aumentos. Foram utilizadas chaves dicotômicas constantes em manuais tradicionais de ficologia (GEITLER, 1932; KOMARÉK e ANAGNOSTIDIS, 2005) e dados publicados em artigos científicos e em sites específicos. No processo de identificação também foram utilizados manuais tradicionais de ficologia a exemplo dos trabalhos de Bicudo e Menezes (2006); Sant'anna et al. (2006); Bellinger e Sigee (2010); e Franceschini et al. (2009).

2.2 Cultivo e produção de biomassa

As cepas oriundas do banco de cultura foram inoculadas em balões de 6L contendo 5L de meio de cultivo sintético, com densidade celular inicial entre $5 \cdot 10^3$ células mL^{-1} e 10^4 células mL^{-1} . Os experimentos foram desenvolvidos em sala climatizada a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ dotada de sistema de iluminação de aproximadamente $150 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W, com fotoperíodo de 12h e aeração constante fornecida por um minicompressor de membrana RESUN AOC2. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

Os experimentos foram acompanhados por meio de contagem celular em câmara Sedgewick-Rafter para as células filamentosas e em câmara de Fuchs-Rosenthal para as demais, e por medidas de fluorescência *in vivo* em fluorômetro Turner Design 10005R para a obtenção das curvas de crescimento, sendo interrompidos no início da fase estacionária.

A velocidade de crescimento (k), que representa o número de divisões celulares da população em estudo por unidade de tempo (dia), foi determinada através da equação citada em Fogg e Thake (1987).

$$k = \frac{3,322}{T_2 - T_1} \times \log \frac{N_2}{N_1} \quad \text{Eq.1}$$

Em que, T_1 e T_2 compreendem o início e o final da fase exponencial de crescimento; N_1 e N_2 referem-se à densidade celular inicial e final dessa fase, respectivamente.

Ao término de cada experimento a biomassa microalgal foi concentrada por centrifugação, em centrífuga refrigerada (NT 825) a 18°C , e 3500 r.p.m, congelada em Ultrafreezer (Terroni®) a $-30 \text{ }^\circ\text{C}$, seca em liofilizador (Terroni® LD1500) e mantida sob refrigeração para posteriores análises.

2.3 Análise cromatográfica dos ácidos graxos

A conversão e a análise do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES: Fatty Acid Methyl Esters) foram obtidos segundo o procedimento de transesterificação direta da biomassa microalgal, adaptado de Menezes et al., (2013). Essas análises foram efetuadas no Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES) da Universidade Federal de Goiás, pela equipe do Prof. Dr. Nelson Antoniosi Filho.

Os ésteres metílicos foram identificados via cromatografia em fase gasosa usando um cromatógrafo a gás Agilent 7890, equipado com detector FID e injetor split/splitless. A coluna capilar utilizada foi a DB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); o forno operou sob temperatura inicial de 70 °C, aquecido a 10 °C min^{-1} até 240 °C, e mantido por 13 minutos, sendo reaquecido a 5 °C min^{-1} até 250 °C; o injetor foi mantido a temperatura de 310 °C. O volume de injeção foi de 2 μL , no modo split, com razão de 10:1; o hidrogênio 5.0 foi utilizado como gás de arraste, à velocidade linear de 42 cm s^{-1} , e o nitrogênio usado como gás auxiliar a 20 mL min^{-1} (MENEZES et al., 2013). Os FAMES foram identificados pela comparação direta com amostras de oleaginosas de composição conhecida (soja), por injeção de padrões de referência de FAMES (NuCheckPrep®) e por análises via Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectrometria de Massas.

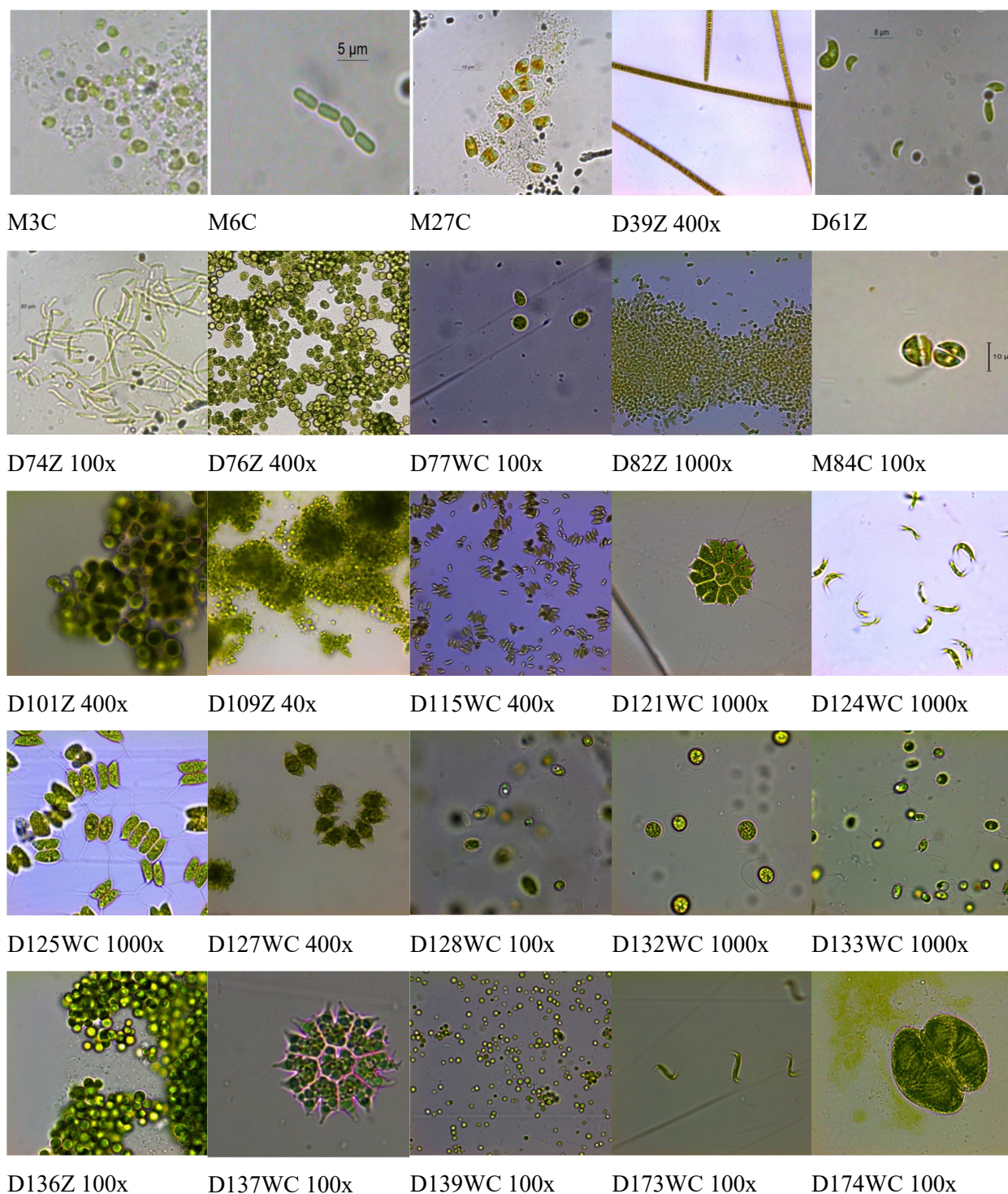
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação das espécies e características do cultivo

Foram isoladas 25 cepas de microalgas de distintos locais dos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia, (Figura 2.1). Destas, 16 cepas foram identificadas ao nível de espécie e 8 ao nível de gênero.

Clones das espécies *Synechococcus nidulans* (D82Z e D109WC), *Lagerheimia longiseta* (D128WC e D133WC) e *Pediastrum tetras* (D121WC e D137WC) (Tabela 2.1) foram isoladas de diferentes localidades e uma diversidade de espécies compondo uma mesma região foram constatadas. O que enaltece a necessidade da bioprospecção de microalgas para produção de biocombustíveis e/ou para produção de outros compostos, visto que, cada espécie apresenta propriedades químicas e biológicas peculiares, propiciando uma variedade de aplicações.

Figura 2.1 - Microalgas isoladas de ambientes aquáticos do estado da Paraíba mantidas em condição de culturas unialgais no LARBIM/UFPB.



Fonte: Própria do autor.

Considerando-se os valores médios da constante de crescimento (k), Tabela 2.1, observa-se que ocorreram diferenças acentuadas entre as espécies, com valores máximos

variando entre 0,81 e 1,74 divisões/dia para as cepas D101Z, D109WC, D121WC e D132WC, e valores mínimos de 0,11, 0,12 e 0,14 divisões/dia para as espécies D174WC, D128WC e D136Z, respectivamente.

Tabela 2.1 – Dados de procedência e parâmetros de crescimento das cepas de microalgas estudadas.

Cepa	Identificação	Procedência	k (d ⁻¹)	Concentração de biomassa (mg L ⁻¹)
M3C	<i>Synechocystis</i> sp.	Praia do Cabo Branco - PB	0,26±0,16	1310
M6C	<i>Romeria gracilis</i>	Praia do Cabo Branco - PB	0,36±0,17	528
M27C	<i>Aphanothece</i> sp.	Praia do Cabo Branco - PB	0,54±0,02	444
D39Z	<i>Plankthotrix isothrix</i>	Açude de Acauã, Itatuba - PB	0,33±0,12	630
D61Z	<i>Nephrochlamys subsolitaria</i>		0,39±0,07	594
D74Z	<i>Rhabdoderma lineare</i>	Barreiro Sacramento, Frei Martinho - PB	0,51±0,10	724
D76Z	<i>Chlorococcum cf hypnosporum</i>	Rio Quinturaré, Frei Martinho - PB	0,30±0,04	640
D77WC	Cloroficea não identificada	Altiplano, João Pessoa – PB	0,63±0,21	550
D82Z	<i>Synechococcus nidulans</i>	Açude da Quixaba, Frei Martinho - PB	0,41±0,06	394
M84C	<i>Amphora</i> sp.	Pitimbu - PB	0,48±0,23	668
D101Z	<i>Chlorella</i> sp.	ETE Mangabeira, João Pessoa - PB	1,74±0,31	545
D109WC	<i>Synechococcus nidulans</i>	Nascente do rio Graú, Conde - PB	1,11±0,16	552
D115WC	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Bebedouro Sítio Quinturaré, Frei Martinho - PB	0,60±0,13	610
D121WC	<i>Pediastrum tetras</i>	Açude Prainha, Frei Martinho-PB	0,81±0,26	508
D124WC	<i>Monoraphidium contortum</i>	Açude do Sítio Quinturaré, Frei Martinho-PB	0,43±0,17	388
D125WC	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Balneário Pitimbu - PB	0,31±0,09	994
D127WC	<i>Staurastrum rotula</i>	Balneário Pitimbu - PB	0,42±0,13	278
D128WC	<i>Lagerheimia longiseta</i>	Balneário Pitimbu – PB	0,12±0,05	270
D132WC	<i>Chlamydomonas</i> sp.	Cachoeira da Purificação, Chapada da Diamantina - BA	0,95±0,27	536
D133WC	<i>Lagerheimia longiseta</i>	Açude Malhada Limpa, Currais Novos - RN	0,66±0,15	430
D136Z	<i>Chlorococcum</i> sp.	Açude Prainha, Frei Martinho-PB	0,14±0,07	482
D137WC	<i>Pediastrum tetras</i>	Açude São Anastácio, UFC – CE	0,64±0,41	166
D139WC	<i>Synechocistys</i> sp	Lago Hotel Village, Porto de Galinhas - PE	0,67±0,31	110
D173WC	<i>Monoraphidium contortum</i>	São José da Lagoa Tapada - PB	0,45±0,21	284
D174WC	<i>Cosmarium</i> sp.	Açude Itapororoca – PB	0,11±0,03	364

Quanto à concentração final de biomassa também foram observadas distinções entre as espécies. Sendo a maior concentração, entre as espécies marinhas, apresentado pela M3C (*Synechocystis* sp.), com valor de 1310 mg L^{-1} . Entre as espécies dulcícolas, os maiores valores registrados foram para as cepas D39Z, D74Z, D76Z e D125WC, variando entre 630-994 mg L^{-1} . Vale ressaltar que espécies marinhas sempre contêm uma quantidade significativa de sal residual, o que interfere na quantificação final, podendo superestimar esse resultado.

Clones das espécies *Synechococcus nidulans* (D82Z e D109WC), *Lagerheimia longiseta* (D128WC e D133WC) e *Pediastrum tetras* (D121WC e D137WC) mostraram variações nos valores médios do k (de $0,41-1,11 \text{ d}^{-1}$; $0,12-0,66 \text{ d}^{-1}$; $0,81-0,64 \text{ d}^{-1}$, respectivamente) e nas concentrações máximas em biomassa (de $394-552 \text{ mg L}^{-1}$; $270-430 \text{ mg L}^{-1}$; $508-166 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente). Esses dados são relevantes, visto que tanto as condições do habitat natural, como as condições de cultivo refletem em distintas respostas fisiológicas e metabólicas de cada clone.

Os dados apresentados demonstram viabilidade de algumas espécies para cultivo em larga escala, por estas apresentarem valores de taxas de divisão celular superiores a de espécies que vem sendo aplicadas largamente em produção em massa. A exemplo da *Dunaliella tertiolecta* reportada por Roleda et al., (2013) e da *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Botryococcus braunii* cultivadas por Nascimento et al., (2013), que apresentaram valores respectivos de $0,53 \text{ d}^{-1}$, $0,21 \text{ d}^{-1}$ e $0,14 \text{ d}^{-1}$.

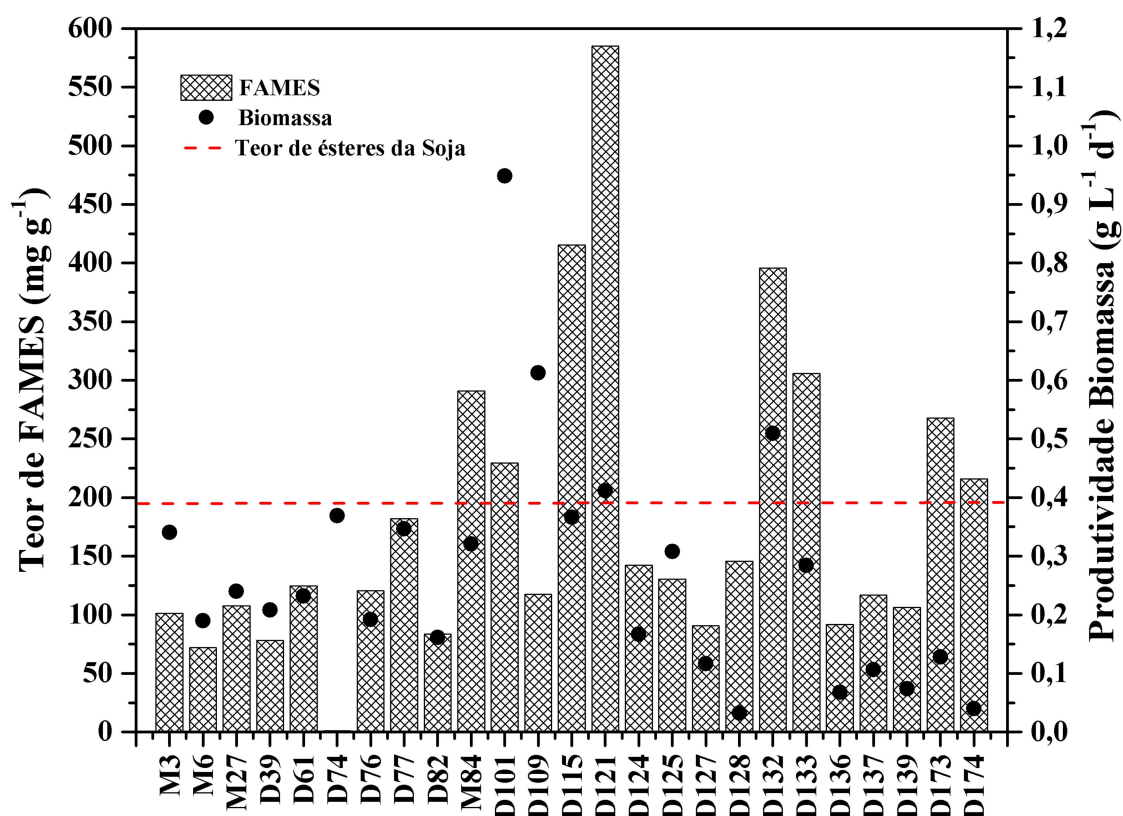
3.2 Produtividade de biomassa e quantificação de ésteres

Os maiores valores de produtividade de biomassa foram obtidos para as espécies D101Z ($0,94 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), D109WC ($0,61 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e D132WC ($0,51 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), Figura 2.2. Estas cepas não apresentaram as maiores concentrações de biomassa, mas refletem as maiores taxas de divisão celular. Por outro lado, destaca-se a D74Z e a D125WC que apesar de não apresentarem as maiores produtividades em biomassa, de $0,37 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $0,31 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, alcançaram valores consideráveis de concentração em biomassa, de 724 mg L^{-1} e 994 mg L^{-1} , respectivamente.

Como observado, a taxa de divisão celular e a concentração de biomassa nem sempre se relacionam, sendo necessário calcular a produtividade deste parâmetro para possibilitar a avaliação da produção de lipídeos/ésteres que serão extraídos a fim de convertê-los em biodiesel. Dessa forma, se faz necessário selecionar cepas com alta produtividade, capazes de

sintetizar elevados teores lipídicos e que apresentem ainda uma parede celular pouco rígida para facilitar a extração dos biocompostos (LOURENÇO, 2006).

Figura 2.2 - Rendimento de ésteres em relação ao teor encontrado na soja e relação com a produtividade de biomassa das microalgas isoladas.



Elevados teores de óleos nem sempre correspondem a elevadas conversões em ésteres (YAO et al., 2015). Nessa perspectiva, a análise quantitativa de ésteres de ácidos graxos que compõem cada matriz é outro parâmetro de interesse para seleção de espécies produtoras de biodiesel. Dentre as espécies analisadas, verificou-se que dezessete apresentaram teor de ésteres inferior à soja, que é a oleaginosa mais participativa na cadeia produtiva de biodiesel no Brasil, Figura 2.2. E estas espécies apresentaram ainda valores de produtividade de biomassa medianos, o que não as qualifica para propósitos de cultivo em massa.

As espécies M84C, D101Z, D115WC, D121WC, D132WC, D133WC, D173WC e D174WC, em contrapartida, se destacaram pelo teor de éster mais elevado que o quantificado para a soja (196,9 mg g⁻¹) (MENEZES et al., 2015). Esses valores servem como um

importante indicativo, já que é este parâmetro que determinará a quantidade final do biocombustível a ser obtido.

Menezes et al., (2013) avaliaram a potencialidade de seis microalgas dulcícolas para a produção de biodiesel e constataram que destas, apenas uma apresentava teor de éster bastante elevado, cerca de 215% em relação a soja. As demais permearam entre 102% e 129%. Esses achados são inferiores aos valores obtidos em grande parte das espécies destacadas neste estudo.

Quando se faz uma análise comparativa entre o teor de ésteres e a produção de biomassa, constata-se que algumas espécies que apresentam elevados rendimentos em FAMES apresentam baixa produtividade de biomassa ou vice-versa, a exemplo principalmente da D74Z, D109WC, D173WC e D174WC. Este fato faz com que essas microalgas, na prática, não apresentem rentabilidade em ésteres ou em biomassa tão elevada quando se avalia apenas o teor total de cada parâmetro, o que pode comprometer o cálculo da produtividade em biodiesel.

Em contrapartida, quando se avalia esse conjunto merecem destaque as espécies M84C, D101Z, D115WC, D121WC, D132WC e D133WC que apresentam teores de ésteres bem superiores à soja e produtividade de biomassa que varia de 0,3 a 0,9 g L⁻¹ d⁻¹. Tendo em vista tais parâmetros, estas seriam espécies potenciais para produção de biodiesel de microalgas.

Os dados obtidos mostram relevância quando se faz referência aos reportados por Ahmad et al., (2011), que ao avaliarem 30 espécies de microalgas de diferentes classes, constataram que apenas a *Nannochloropsis* sp. apresentava produtividade de biomassa e quantidade de lipídeos de forma satisfatória, para categorizá-la como boa opção para produção de óleo e biodiesel.

3.3 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos

As 25 espécies analisadas apresentaram diversificações na composição de ésteres de ácidos graxos, tanto em relação às variações de comprimento das cadeias, geralmente entre quatorze e vinte quatro carbonos, quanto aos teores de insaturações (Tabela 2.2). Um perfil adequado de ésteres é desejável para que o biodiesel produzido alcance os padrões de qualidade exigidos internacionalmente (NASCIMENTO et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; WIJFFELS e BARBOSA, 2010).

Tabela 2.2 - Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos das vinte e cinco espécies de microalgas

FAME (%)	Cepas de Microalgas																								
	M3	M6	M27	D39	D61	D74	D76	D77	D82	M84	D101	D109	D115	D121	D124	D125	D127	D128	D132	D133	D136	D137	D139	D173	D174
C14:0	8	0,2	1,3		1	35,9	2,1	0,8	1,5	9,7	2,6	2,6	0,5	1,8	3,5	1,4	3,3	0,8	1	1,8	1,3	2,6	1,2	0,9	1,6
C16:0	35,8	47,3	30,2	34,5	17,9	10,6	15,4	21,7	40,3	40,1	16,8	23,8	31,5	29,7	29,9	21,2	23,8	43,6	29,1	47,7	34,5	31,5	36,6	20,9	37,3
C16:1	23,1	15,1	36,1	6	2,3	41,4	7,5	0,5	18,6	32,8	7,4	3	1,4	1	2,4	0,3	1,4	0,9	6,2	4,6	1,6	3,6	0,3	0,8	0,4
C16:2			1		2,5		0,4	2,6		0,7	1,4	1,5	1,7	0,3	1,1	0,6	0,7	3,4	1,5	4,1	21,3	0,4	1,8	1,5	0,6
C16:3			2,4		0,7			4,8	0,8	1,4		9,5	1,6	4,2	11,8	10	18,3	2	1,3	1,1		6,1	3,5	14,7	7,6
C17:0	0,3	1,6						5,8	0,3	1,8	3,8	7,6		1,5	0,8	2,9	2,9	0,4				0,9	0,9	2	1,5
C17:1	0,4	3,9				0,7			0,6	0,2	8,7		2,2						5,6	1,6					
C18:0	0,9	0,6	1	1,9	1,2	0,6	0,8	2,3	0,4	0,7	1	0,8	9,8	2,8	0,7	1,3	1,9	0,9	5	3,7	0,6	1,3	3,5	0,3	1,5
C18:1	7	15,1	5	7,7	26,9	2,2	22,5	36	7,5	2,8	23,1	6,8	31,9	33,9	14,8	23,6	10,5	29,5	20,1	20,4	9,6	18,3	33,5	17,3	7,4
C18:2	3,9	9,9	7,7	30,1	10		8,6	13,1	18,7	1,7	11,2	20	10,9	8,2	4,9	16,1	8,1	7,7	6,5	4,5	19,9	6	9,2	10,5	19,8
C18:3	0,2	5,3	1,4	19,8	13,5		28,3	10,9	9,3	0,5	20,6	21,5	7,3	11,7	24,5	19,5	21,4	7,5	12,6	5,9	8,2	13,7	4,8	23,9	15,7
C18:4	0,2	5,3	0,9		5,6		0,4	0,6		0,9	0,2		0,8	1,8	2,6	2,4	3,7		9,5	0,5	0,6	11,3	1	5,2	2,5
C20:4	2,9						0,5			0,8	0,3									0,6					
C20:5	14,4													0,6								0,9		0,5	2,8
C21:0			11,2		0,5																				
C24:0					4,7																				
SFA	47,8	50,3	43,7	36,4	26,5	48	18,3	31,2	43,5	54,5	25,5	37,1	42	37,7	36,7	27,5	34,3	47,6	35,9	53,8	38,4	38,6	43,9	25,2	42,7
MUFA	30,5	34,1	41,1	13,7	32,2	52	30	36,8	27,7	36,5	40,8	10,4	35,7	35,5	18,4	23,9	13,5	31,8	32,1	29,5	11,6	23	35,8	18,5	8,3
DUFA	3,9	10,1	10,5	30,1	12,5		9	15,7	18,7	2,4	12,6	21,5	12,6	8,5	6	16,7	8,8	11,1	8	8,6	41,2	6,4	11	12	20,4
TUFA	0,2	5,3	3,8	19,8	15,9		29,2	15,7	10,1	1,9	20,6	31	8,9	15,9	36,3	29,5	39,7	9,5	13,9	7	8,2	19,8	8,3	38,6	23,3
PUFA	17,3		0,9		12,8		13,6	0,6		4,7	0,5		0,8	2,4	2,6	2,4	3,7		9,5	1,1	0,6	12,2	1	5,7	5,3

Quanto à composição, a espécie D74Z destaca-se por apresentar elevado teor de ácido mirístico (C14:0), (35,9%), enquanto as demais apresentam teores que permeiam entre 0,2% a 9,7%.

O ácido palmítico (C16:0) é o ácido predominante em grande parte das espécies, com valores entre 10% e 47,7%. Esse ácido pode ser utilizado como surfactante em produtos de limpeza e na produção de cosméticos, sendo sua principal fonte atualmente a palma (dendê) que produz cerca de 40% (ZAMBLAZI et al., 2007).

O ácido palmitoléico também merece destaque por estar presente em todas as espécies variando desde 0,3% até 41,4%. Apresentando aplicações importantes para a indústria por constituir o grupo dos ácidos graxos essenciais. A literatura afirma que a concentração desse ácido diverge bastante entre as espécies, e que esta pode ser induzida em cultivos para acréscimos no seu teor. A exemplo da espécie *Chlorella minutissima*, que quando cultivada em condições otimizadas (35°C, 2500 lux, fonte de carbono NaHCO_3 e concentração de NO_3^- de 1,0 g L⁻¹) propiciou um teor considerável deste ácido de 82,63% (COSTA et al., 2006).

O ácido hexadecatrienóico (C16:3) não é comumente encontrado em oleaginosas tradicionais, mas em algumas microalgas apresenta-se com valores consideráveis, a exemplo das espécies D127WC (18,3%), D173WC (14,7%), D124WC (11%) e D125WC (10%). Este ácido, em relação ao biodiesel, pode causar problemas de estabilidade, mas apresenta potencialidade em aplicações nutricionais por fazer parte do grupo dos ω -3. Fato este que demonstra a viabilidade destas espécies, já que o consumo de ω -3 obtido de microalgas é benéfico para o desenvolvimento humano, e para a prevenção de problemas coronários, câncer, diabetes, fibrose cística, artrites, asma, esquizofrenia e depressão (VON SHACKC, 2008; FERREIRA et al., 2013).

O ácido esteárico (C18:0), que tem predominância em diversas oleaginosas, é encontrado em concentrações irrisórias nas microalgas avaliadas, com exceção da espécie D115WC (9,8%). Contudo, esses valores podem ser elevados para outras cepas de microalgas, a exemplo de *Cyanobacterium aponinum* e *Phormidium* sp. analisadas por Karatay e Dönmez (2011), que apresentaram teores de 29,4% e 47,6%, respectivamente.

Os ácidos insaturados oléico, linoléico e linolênico são encontrados em elevados teores na maioria das espécies, ressaltando-se os valores para o linolênico que é encontrado em até 28% nas microalgas, o qual se mostra extremamente propenso aos processos oxidativos do óleo e, conseqüentemente, do biodiesel produzido.

A M3C (*Synechocystis* sp.) é uma espécie com potencialidade para indústria alimentícia e farmacêutica por conter 14% de eicosapentaenóico (EPA-C20:5), extremamente

importante dentro do grupo dos ômega. O ácido estearidônico (C18:4), também se destaca para estas aplicações, sendo encontrado com valores consideráveis nas espécies D137WC (11,3%) e D132WC (9,5%), em quantidades superiores ao obtido em óleo de peixe, por exemplo. (MOURA et al., 2006).

A cepa M27C apresentou 11,2% de C21:0 (ácido heneicosanóico) e a D61Z 4,7% de C24:0 (ácido lignocérico), ácidos de cadeia saturada longa, composição que não é comum em culturas oleaginosas terrestres, e que pode conferir problemas de fluxo ao biodiesel produzido por essas microalgas. As cadeias longas saturadas apresentam facilidade de acoplamento de suas estruturas e propensão à nucleação e cristalização a baixas temperaturas. Mas, em contrapartida estas podem propiciar índices de cetano elevados para o biocombustível produzido (KNOTHE, 2008).

Ao analisar quantitativamente as amostras quanto ao teor de saturação verifica-se que as espécies M6C, M84C e D133WC apresentam mais que 50% de ésteres saturados. Merecendo destaque ainda, a M3C, a D74Z e a D128WC que apresentam valores próximos, mas não superiores a este quantitativo. Estes elevados teores de saturação propiciam biodiesel com elevada estabilidade, mas em contrapartida pode gerar um combustível com problemas de fluidez (LÔBO et al., 2009).

Ao avaliar em conjunto os teores de ésteres saturados e monoinsaturados devem ser elencadas as espécies M3C, M6C, M27C, D74Z, D82Z, M84C, D115WC, D121WC, D132WC, D133WC e a D139WC que apresentam teores entre 70 e 85% e demonstram viabilidade para produção de biodiesel. A associação desses dois grupos confere maior estabilidade oxidativa ao combustível obtido devido a menor presença de insaturações, que são sítios de ataque do oxigênio ou de outros agentes que desencadeiam as reações radiculares que degradam o biodiesel. Além do que, a presença de uma ligação dupla propicia melhora no desempenho das propriedades de fluxo do combustível (PARK et al., 2008)

Nascimento et al., (2013) avaliaram várias estirpes de microalgas e identificaram *Ankistrodesmus falcatus*, *Coelastrum microporum*, *Chlorella vulgaris* e *Botryococcus terrestris* com perfil de ácido graxo predominantemente saturado, e as *Desmodesmus brasiliensis*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, e *Botryococcus braunii* majoritariamente monoinsaturado. Os mesmos autores inferiram ainda que duas espécies *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus obliquus* apresentaram um total de ácidos saturados e monoinsaturados em torno de 90%, valor este superior ao encontrado para a *Chlamydomonas* sp. (D132WC) e as espécies de *Scenedesmus* (D115WC e D125WC) relatadas no presente estudo.

Quando se avalia o teor de TUFA e PUFA das microalgas constata-se teores em torno de 40% em algumas cepas, como a D76Z, D124WC, D127WC e D173WC. Esses valores são extremamente elevados para um biodiesel, visto que estas estruturas propiciam maior susceptibilidade à oxidação e, conseqüentemente, menor tempo de estocagem e problemas no funcionamento dos motores, fato que discriminaria estas cepas como não potenciais para produção de biodiesel.

Elevados teores de ésteres poli-insaturados também foram observados para microalgas que são relatadas na literatura como fontes de matéria-prima potencial para a produção de biodiesel, tais como *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tetiolecta* e *Neochloris oleabundans* (GOUVEIA e OLIVEIRA, 2009). Vale ressaltar que essas microalgas podem agregar valor ao processo produtivo do biodiesel, caso esses compostos forem destinados à indústria farmacêutica ou de alimentos.

4. CONCLUSÕES

Ao analisar as vinte e cinco espécies isoladas neste estudo, constatou-se que todas apresentam significância em algum parâmetro analisado. Contudo, para produção de biodiesel destacam-se as espécies M84C, D101Z, D115WC, D121WC, D132WC e D133WC, por reunirem elevadas taxas de crescimento celular, concentração de biomassa e teor de ésteres superior à soja. Além de apresentarem uma composição de ácidos graxos favoráveis para a produção de biodiesel que se adequam às normatizações de qualidade especificadas pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2012).

Pôde-se constatar também a diversidade de espécies de microalgas que podem compor uma mesma região. Abrindo margem para a exploração mais intensa de novas espécies que podem propiciar importantes aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. M.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v.15, p.584–593, 2011.
- BEHZADI, S.; FARID, M. M. Review: examining the use of different feedstock for the production of biodiesel. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.2, p.480–486, 2007.
- BELLINGER, E. G.; SIGEE, D. C. Algas de agua doce: Identificação e uso como bioindicadores. **Journal of Applied Phycology**, v.25, n.4, p. 265-1266, 2010.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2006.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S. E.; SANTOS, G. C. E.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutíssima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.17, n.4, p.429-436, 2006.
- DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M.F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v.52, p.163–170, 2011.
- DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, v.88, p.3473-3480, 2011.
- FERREIRA, S. P.; SOUZA-SOARES, L.; COSTA, J. A. V. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 275-287, 2013.
- FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; REVIERS, B.; PRADO, J. F.; REZIG, S. H. Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- FOGG, G.E.; THAKE, B. Algae Cultures and Phytoplankton Ecology. third ed. The University of Winsconsins Press Ltd., London, 1987.
- GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST, L. **Akademische Verlags- gesellschaft**, Leipzig, v. 14, p.1196, 1932.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 269-274, 2009.
- GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllidc. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.

HINDAK, F. Studies on the Chlorococcal Algae (Chlorophyceae). Bratislava: Veda Publishing House of The Slovak Academy of Sciences, p.225, 1990.

HO, S. H.; LAI, Y. Y.; CHIANG, C. Y.; CHEN, C. N. N.; CHANG, J. S. Selection of elite microalgae for biodiesel production in tropical conditions using a standardized platform. **Bioresource Technology**, v.147, p.135–142, 2013.

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

JI, F.; HAO, R.; LIU, Y.; LI, G.; ZHOU, Y.; DONG, R. Isolation of a novel microalgae strain *Desmodesmus* sp. and optimization of environmental factors for its biomass production. **Bioresource Technology**, v.148, p.249–254, 2013.

KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. **Applied Energy**, v.88, n.11, p.3632–3635, 2011.

KNOTHE, G. “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 2, p. 1358-1364, 2008.

KOMARÉK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. Teil: Oscillatoriales. In : BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. **Süßwasserflora von Mitteleuropa** München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag. p.759, 2005

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. **Química Nova**, v.32, n.6, p. 1596-1608, 2009.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. 1. ed. São Paulo: Rima, 2006.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P. I. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT’ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v.13, n.1, p.10-15, 2013.

MENEZES, R. S.; SOARES, A. T.; LOPES, R. G.; MAGNOTTI, C.; DERNER, R. B.; MORI, C. C.; VIEIRA, A. A. H.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Evaluation of fatty acid composition of the microalgae *Choricystis minor* var. *minor* according to two different nutrient feeding strategies. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 7, p. 043117, 2015.

MOURA, J. M. L. N.; GONÇALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R.; SOARES, M. S.; RIBEIRO, A. P. B. Otimização das Condições de Produção de Ésteres Etílicos a partir de Óleo de Peixe com Elevado Teor de Ácidos Graxos ω -3. **Química Nova**, v. 29, n.5, p.956- 959, 2006.

NASCIMENTO, I.; MARQUES, S.; CABANELAS, I.; PEREIRA, S.; DRUZIAN, J.; SOUZA, C.; VICH, D.; CARVALHO, G.; NASCIMENTO, M. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **BioEnergy Research**, v.6, p.1–13, 2013.

ONCEL, S. S. Microalgae for a macroenergy world. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.26, p.241–264, 2013.

PARK, J. Y.; KIM, D. K.; LEE, J. P.; PARK, S. C.; KIM, Y. J.; LEE, J. S. Blending effects of biodiesels on oxidation stability and low temperature flow properties. **Bioresource technology**, v.99, n.5, p.1196-1203, 2008.

PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; CUSTÓDIO, L.; ALROKAYAN, S.; MOUFFOUK, F.; VARELA, J.; ABU-SALAH, K.; BEN-HAMADOU, R. Isolation and fatty acid profile of selected microalgae strains from the Red Sea for biofuel production. **Energies**, v.6, n.6, p.2773–2783, 2013.

PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v.24, p.159–71, 2013.

ROLEDA, M. Y.; SLOCOMBE, S. P.; LEAKEY, R. J.; DAY, J. G.; BELL, E. M.; STANLEY, M. S. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource Technology**, v.129, p.439–449, 2013.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; AGUIJARO, L. F.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Rio de Janeiro: Interciência. 2006.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenge and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v.21, p.277–286, 2010.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. NREL/TP-580-24190, National Renewable Energy Laboratory, USA, 1998.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. **Bioresource Technology**, v.102, p.26–34, 2011.

VON SHACKC, C. Omega-3 fatty acids: antiarrhythmic, proarrhythmic or both? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 11, p. 9-94, 2008.

WALNE, P. R. Studies on the food values of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. **Minist. Agric. Fish. & Food**, London. v. 25, n. 5, p.62, 1970.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An outlook on microalgal biofuels. **Science**, v.329, p.796–799, 2010.

YAO, L.; GERDE, J. A.; LEE, S. L.; WANG, T.; HARRATA, K. A. Microalgae lipid characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p.1773-1787, 2015.

ZAMBIAZI, R. U. I. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty Acid Composition Of Vegetable Oils And Fats. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 111-120, 2007.

ZARROUK, C. Contribution a l'etuded'unecyanophyce: influence de divers facteurs physiques etchimiquessur la croissance et la photosynthese de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler. Theises. Faculty of Science.Universite des Paris; 1966.

CAPÍTULO 3

PRODUTIVIDADE LIPÍDICA E PARÂMETROS DE QUALIDADE COMBUSTÍVEL DE DIFERENTES ESPÉCIES E GRUPOS DE MICROALGAS

RESUMO

Microalgas vêm sendo apontadas como culturas viáveis para produção de biocombustíveis. Contudo, as características do biodiesel produzido a partir desta fonte vêm sendo colocado em foco devido à composição de ácidos graxos se diversificar dependendo de cada espécie, e das condições de cultivo. Assim, esse trabalho teve como propósito avaliar espécies de dois grupos de microalgas quanto a seu potencial de crescimento e produtividade lipídica, além de analisar a partir de sua composição os parâmetros de qualidade combustível normatizados para o biodiesel. Das espécies estudadas, a *Chlorella* sp. (D101Z) do grupo das clorofíceas, destacou-se por apresentar a maior taxa de divisão celular de 2,42 d⁻¹, e do grupo das cianobactérias, a *Synechocystis* sp. (M3C) e a *Synechococcus nidulans* (D109WC) pelos elevados valores de produtividade lipídica e de biomassa. Em termos de composição, as clorofíceas foram caracterizadas por concentrarem majoritariamente ésteres saturados, monoinsaturados e tri-insaturados, enquanto as cianobactérias apresentaram elevados teores de ésteres saturados e de diferentes graus de insaturação. Essa composição relacionou-se diretamente com as propriedades do biodiesel, pois a partir de análise estatística discriminou-se a clorofícea D101Z e a cianobactéria D109WC como espécies de destaque por apresentarem elevada produtividade lipídica, baixo valor de ponto de entupimento filtro a frio e índice de iodo pouco acentuado para a D101Z, mas bastante elevado para a D109WC, o que a desqualifica para fins de produção de biodiesel. Verificou-se ainda, que dentre as espécies em estudo, apenas a clorofícea *Monoraphidium contortum* e a cianobactéria *Synechococcus nidulans* não atenderam a alguma das especificações de qualidade. Indicando que as propriedades do biodiesel dificilmente podem ser previstas pelo grupo que a microalga se enquadra, provavelmente pela intensa variação que a composição celular pode sofrer pelas condições nutricionais, fóticas que estas sejam submetidas.

Palavras-chave: biodiesel de microalga, produtividade lipídica, perfil de FAME.

1. INTRODUÇÃO

O aumento na demanda energética mundial e a escassez dos combustíveis fósseis instigam a busca de novas fontes de energia. Neste contexto, os biocombustíveis se apresentam como uma alternativa promissora para garantir a sustentabilidade econômica e socioambiental das atividades antrópicas (BHARATHIRAJA et al., 2011)

O biodiesel obtido a partir de microalgas se apresenta como uma dessas soluções, porque microalgas têm potencialmente elevados teores de lipídeos em suas células, que podem ser utilizados na produção desse biocombustível (PARK et al., 2012; COSTA e MORAIS, 2011). Além de apresentarem taxas de crescimento e produtividade bastante elevadas, quando equiparadas à silvicultura convencional, culturas agrícolas ou outras plantas aquáticas e requerem menores áreas agricultáveis para seu desenvolvimento. Portanto, a concorrência para solo arável e alimento humano com outras culturas é bastante reduzida (MATA et al., 2010).

Várias espécies de microalgas podem se apresentar como viáveis para produção do biodiesel. No entanto, além da eficiência fotossintética e produtividade, a seleção das espécies deve levar em conta fatores como capacidade de se desenvolverem utilizando os nutrientes disponíveis (tanto em condições controladas como em condições ambientais variáveis) e sua composição em ácidos graxos, pois estes podem ter um efeito significativo sobre as características do biodiesel produzido (FRANCO et al., 2013).

A diversidade fenotípica e filogenética das microalgas acumuladoras de triacilglicerídeos instaura um desafio para a determinação exata de seu potencial biotecnológico. A variedade taxonômica deve ser explorada quanto sua composição de ésteres, pois a mesma pode prever importantes propriedades químicas e físicas do biodiesel (SLOCOMBE et al., 2013). Dependendo da composição da matriz lipídica utilizada, o biodiesel pode apresentar propriedades que confere baixa qualidade no desempenho de alguns de seus atributos, como índice de cetano, estabilidade oxidativa, viscosidade cinemática e propriedades de fluxo. Dois fatores são cruciais nas influências dessas propriedades: a distribuição e a quantidade de insaturações presentes nas cadeias dos ácidos graxos (ISLAM et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013).

Diante do exposto, a seleção de espécies potenciais, quanto aos parâmetros de qualidade dos combustíveis, é essencial para minimizar custos e otimizar o processo produtivo do biodiesel (HIDALGO et al., 2014). Com esse propósito, modelos que predizem algumas das propriedades críticas do biodiesel, a partir da sua composição, têm sido

desenvolvidos (TONG et al., 2010; FRANCISCO et al., 2010; HOEKMAN et al., 2012). E é neste sentido, que o presente trabalho visa explorar a potencialidade de cepas de microalgas isoladas da região Nordeste do Brasil para produção de biodiesel, levando em consideração seus parâmetros de qualidade combustíveis normatizados, preditos a partir de equações matemáticas baseadas na composição de ésteres de ácidos graxos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo e parâmetros cinéticos de crescimento das espécies de microalgas

Nesse estudo foram utilizadas 12 espécies de microalgas, 9 dulcícolas e 3 marinhas, coletadas em diversas localidades do Nordeste brasileiro e mantidas na coleção de culturas da Universidade Federal da Paraíba/Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia de Microalgas. Destas espécies, 6 compreendem a classe das clorofíceas: *Chlorella* sp. (D101Z), *Scenedesmus acuminatus* (D115WC), *Pediastrum tetras* (D121WC), *Chlamydomonas* sp. (D132WC), *Lagerheimia longiseta* (D133WC), *Monoraphidium contortum* (D173WC); e as demais são cianobactérias: *Synechocystis* sp. (M3C), *Romeria gracilis* (M6C), *Aphanothece* sp. (M27C), *Planktothrix isoethrix* (D39Z) e *Synechococcus nidulans* (cepas D82Z e D109WC).

O isolamento e a purificação dessas culturas foram efetuados empregando-se micropipeta capilar em microscópio binocular. As culturas unialgais foram mantidas em câmara de cultivo dotada de sistema de iluminação com fotoperíodo controlado com ciclo de 12 h claro/escuro e temperatura constante ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Como meio básico para os cultivos das microalgas foram utilizados os meios Conway (WALNE, 1970), Zarrouk (ZARROUK, 1966) e WC (GUILLARD e LORENZEN, 1972), preparados com água doce ou água do mar filtradas em filtro de fibra de vidro.

O crescimento das espécies foi efetuado em triplicata, em balões contendo 5L de meio de cultura, em câmara de cultura climatizada com agitação realizada por injeção contínua de ar ($2,0\text{ mL min}^{-1}$) por minicompressor de membrana Resun AOC2 e temperatura média de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por meio de contagens celulares em câmaras de Fuchs Rosenthal ou em câmaras de Sedgewick-Rafter (para células filamentosas), em microscópio binocular Leica. A partir dessas análises foi possível traçar as curvas de

crescimento de cada espécie cultivada determinando-se alguns parâmetros cinéticos, tais como:

2.1.1 Velocidade de crescimento (k), que representa o número de divisões celulares da população em estudo por unidade de tempo (dia), determinada através da equação citada em Stein (1973):

$$k = \frac{3,322}{T_2 - T_1} \times \log \frac{N_2}{N_1} \quad \text{Eq.1}$$

Em que, T_1 e T_2 compreendem o início e o final da fase exponencial de crescimento; N_1 e N_2 referem-se à densidade celular inicial e final dessa fase, respectivamente.

2.1.2 Produtividade de biomassa (PB) – que se refere à concentração ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) de biomassa microalgal acumulada no cultivo, sendo determinada por centrifugação e liofilização do material coletado no início da fase estacionária. A centrifugação da biomassa foi realizada em centrífuga refrigerada (Nova técnica NT 825) a 18 °C e a secagem em liofilizador Terroni a -40 °C.

2.1.3 Lipídeos Totais (LT), determinado através de análise gravimétrica de acordo com metodologia adaptada de Folch et al., (1957).

2.1.4 Produtividade Lipídica, expressa como a quantidade em miligramas de lipídeos produzidos por litro, por dias de cultivo, durante a fase exponencial. Calculada de acordo com a equação: $PL = PB \times LT$ Eq. 2

2.2 Perfil de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos das Espécies

O rendimento e a análise do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos para as espécies em estudo foram obtidos segundo o procedimento de transesterificação direta da biomassa microalgal, adaptado para microescala (MENEZES et al., 2013). Os ésteres metílicos obtidos nesse processo foram identificados via cromatografia em fase gasosa usando um cromatógrafo a gás Agilent 7890, equipado com detector FID e injetor split/splitless. A coluna capilar utilizada foi a DB-WAX (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm); o forno operou sob temperatura inicial de 70 °C, sendo aquecido a 10 °C min^{-1} até 240 °C, e mantido por 13

minutos, sendo novamente aquecido a $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; o injetor foi mantido a temperatura de $310\text{ }^{\circ}\text{C}$. O volume de injeção foi de $2\mu\text{L}$, no modo split, com razão de 10:1; o hidrogênio 5.0 foi utilizado como gás de arraste a velocidade linear de 42 cm s^{-1} , e o nitrogênio usado como gás auxiliar a 20 mL min^{-1} (MENEZES et al., 2013).

2.3 Predição das propriedades do biodiesel a partir do perfil de ésteres de ácidos graxos das microalgas

A predição das propriedades do biodiesel a partir de sua composição em ésteres metílicos vem sendo apontada por diversos autores como um viés interessante principalmente para montar perfis de biodiesel derivado de microalgas. Visto que existe ainda o entrave da pequena quantidade de biomassa produzida nos cultivos para a possível extração do óleo e produção de biodiesel. Assim foram utilizadas equações descritas na literatura (NASCIMENTO et al., 2013; FRANCISCO et al., 2010; HOEKMAN et al., 2012) que preveem o teor de insaturação das cadeias graxas (ADU), o índice de iodo (IV), a viscosidade cinemática a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ρ), a densidade (φ), o índice de cetano (IC), o ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP), o poder calorífico (HHV) e o fator de cadeia saturada longa (LCSF), conforme representadas abaixo.

$$ADU = \sum M \times Y_i \quad \text{Eq.3}$$

Onde, ADU é o teor de insaturação do biodiesel de microalgas; M é a fração em massa do ácido graxo constituinte; Y é o número de duplas ligações de cada ácido graxo.

$$\text{Viscosidade } \rho = -0,6316ADU + 5,2065 \quad \text{Eq. 4}$$

$$\text{Densidade } \varphi = 0,0055ADU + 0,8726 \quad \text{Eq. 5}$$

$$\text{Cetano } IC = -6,6684ADU + 62,876 \quad \text{Eq. 6}$$

$$\text{Iodo } IV = 74,373ADU + 12,71 \quad \text{Eq. 7}$$

$$\text{Poder Calorífico } HHV = 1,7601ADU + 38,534 \quad \text{Eq. 8}$$

Fator de Cadeia Saturada longa

$$LCSF = (0,1 \times C16) + (0,5 \times C18) + (1 \times C20) + (1,5 \times C22) + (2 \times C24) \quad \text{Eq. 9}$$

Ponto de entupimento de filtro a frio

$$CFPP = (3,14 \times LCSF) - 16,477 \quad \text{Eq. 10}$$

2.4 Determinação do índice de iodo no biodiesel de microalgas

Na biomassa liofilizada das microalgas foi realizado o processo de transesterificação direta segundo o procedimento descrito em Soares et al. (2014), seguidamente realizou-se a determinação do índice de iodo no biodiesel obtido de acordo com o método de Wijs (AOCS, 2009) adaptado para microescala. Cerca de 15 mg da amostra foi dissolvida com 2 mL de clorofórmio e a esta foi adicionado 2,5 mL da solução de Wijs. A solução foi deixada em repouso durante 30 minutos na ausência de luz juntamente com uma amostra em branco preparada nas mesmas condições. Seguidamente adicionou-se 10 mL de água e 2 mL de KI (15%) e titulou-se com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,01 N até a coloração amarelada enfraquecer. Adicionou-se então 0,2 mL de uma solução de amido (0,5%) utilizada como indicador prosseguindo com a titulação até o desaparecimento da cor azul. O índice de iodo foi calculado de acordo com a equação:

$$II = \frac{(VB-VA).C.12,69}{m} \quad \text{Eq.11}$$

Onde: VB é o volume gasto na titulação do branco (mL); VA é o volume gasto na titulação da amostra (mL); m é a massa da amostra (g); C é a concentração da solução de Na₂S₂O₃ (N) e 12,69 é o fator de correção.

2.5. Análise Estatística

Uma Análise de Componentes Principais - PCA foi aplicada aos parâmetros combustíveis calculados das microalgas, e aos dados de produtividade das mesmas. Para realização da análise foi utilizado o software Statistica 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros de crescimento e acumulação lipídica

A clorofícea D101Z apresentou uma taxa de divisão celular de 2,42 d⁻¹, valor extremamente superior às demais do mesmo grupo que apresentaram no máximo a taxa de

0,74 d⁻¹ referente à D132WC (Tabela 3.1), e também em relação às espécies do grupo das cianobactérias, que têm destaque na D109WC com 1,23 d⁻¹.

Vale ressaltar que as cianobactérias estudadas apresentaram, de forma geral, menores taxas de crescimento celular quando comparadas as clorofíceas, tendo a M3C e a M6C esses menores índices (0,30 e 0,41 d⁻¹, respectivamente). Enquanto que nas clorofíceas o valor mínimo registrado para esse parâmetro foi de 0,46 d⁻¹ na D133WC.

Tabela 3.1 – Dados de crescimento e características das cepas das microalgas em estudo.

Grupos	Espécies	Meio	k* (d ⁻¹)	Concentração de Biomassa (mg L ⁻¹)	LT (%)	PB (g L ⁻¹ d ⁻¹)	PL (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
Clorofíceas	D101	Z	2,42±0,14	594	13,2±2,9	1,44	190,1
	D115	WC	0,66±0,16	640	13,6±2,9	0,42	57,1
	D121	WC	0,69±0,15	528	17,3±1,2	0,36	62,3
	D132	WC	0,74±0,14	536	21,4±1,1	0,39	83,4
	D133	WC	0,46±0,17	460	11,4±0,4	0,21	23,9
	D173	WC	0,52±0,23	296	19,9±0,4	0,15	29,8
Cianobactérias	M3	C	0,30±0,18	1295	13,9±5,7	0,39	54,2
	M6	C	0,41±0,19	542	11,1±0,1	0,22	24,4
	M27	C	0,63±0,12	458	10,3±0,9	0,29	29,9
	D39	Z	0,44±0,07	640	6,0±1,5	0,28	16,8
	D82	Z	0,50±0,11	401	13,6±3,1	0,20	27,2
	D109	WC	1,23±0,25	560	13,6±1,3	0,69	93,8

Estes dados de crescimento são, em alguns casos, concordantes com a literatura (YU et al., 2012). Em contrapartida, a *Chlorella* sp., cepa D101Z, foi apontada em estudos com um valor de divisão celular de apenas 0,33 d⁻¹, em contraste com o valor de 2,42 d⁻¹ obtido neste trabalho (NETO et al., 2013). Isso indica que dependendo das condições de cultivo e de adaptação das espécies ao meio em que estavam inseridas, estas podem se desenvolver de forma diversificada. Tal fato foi observado também por outros pesquisadores, que ao cultivarem espécies de diferentes grupos, avaliando sua taxa de crescimento, constataram que esses valores diferem significativamente entre espécies e grupos, sendo as condições de cultivo o fator determinante para as mudanças metabólicas (SONG et al., 2013).

O teor de lipídeo varia muito entre espécies de microalgas. Quantitativamente essa variação ocorre entre 4,5 a 80% (CHISTI, 2007), e qualitativamente a diferenciação depende das fases de crescimento destas espécies de acordo com seu metabolismo celular (HU et al., 2008).

Neste estudo, os maiores teores lipídicos foram observados nas clorofíceas D132WC (21,4%), D173WC (19,9%) e D121WC (17,3%). Em contrapartida, a produtividade lipídica mais elevada foi obtida na D101Z (190,1 mg L⁻¹d⁻¹), seguida da cianobactéria D109WC (93,4 mg L⁻¹d⁻¹) e da clorofícea D132WC (83,4 mg L⁻¹d⁻¹).

A literatura aponta que microalgas eucarióticas, preferencialmente, apresentam maior teor lipídico em suas células que as procarióticas (WILLIAMS e LAURENS, 2010), e que as clorofíceas são representativamente um dos grupos que apresentam os mais elevados níveis de lipídeos neutros (CHEN et al., 2011). Essas afirmativas não estão de acordo em sua totalidade com os dados obtidos neste trabalho, visto que, mesmo que a maioria das clorofíceas tenham demonstrado os valores mais acentuados de lipídeos, grande parte das cianobactérias apresenta teor de 10-13% de lipídeos, próximo ao quantificado em algumas clorofíceas.

Quanto à produtividade de biomassa destaca-se a clorofícea D101Z, com 1,44 g de biomassa por litro de cultivo por dia. Dentre as demais espécies, a que se aproxima deste valor é apenas a cianobactéria D109WC, com 0,69 g L⁻¹ d⁻¹. A produtividade de biomassa das microalgas estudadas é, em alguns casos, concordante com a literatura (MATA et al., 2010; TALEBI et al., 2013).

A análise quanto à divisão celular, acumulação lipídica e produtividade de biomassa mostra uma não correlação dos dados. Isto porque, geralmente as taxas de crescimento específico dependem do tipo de célula e das condições nutricionais e fóticas que a mesma esteja submetida, não refletindo, assim, a capacidade específica de produção e armazenamento de lipídeos. Entretanto, a produtividade lipídica seguiu o mesmo padrão da produtividade de biomassa. Vale ressaltar, no entanto, que algumas espécies como a clorofícea *Chlamydomonas* sp. foi reportada na literatura com dados de produtividade lipídica de 0,24 g L⁻¹ d⁻¹ (NASCIMENTO et al., 2013), valor inferior ao obtido neste estudo. E que, comparativamente, as espécies já consideradas potenciais para produção de biodiesel, como *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis oculata* (HO et al., 2013), as espécies propostas apresentam valores similares ou até mesmo superiores de produtividade de biomassa e lipídeos.

A maior produção de lipídeos é geralmente observada durante a fase estacionária, quando as células têm a maior parte das suas capacidades biossintéticas redirecionadas para a produção de triacilglicerídeos, podendo ainda ser induzida por variáveis que controlam o crescimento e produtividade, como nitrogênio, fósforo ou limitação de silício (YU et al., 2011).

Como visto, as microalgas podem acumular elevadas quantidades de lipídeos nas suas células, podendo ser consideradas fontes potenciais de produção de biodiesel. Contudo, uma das principais barreiras à bem sucedida produção deste biocombustível inclui a falta de prospecção de espécies de microalgas “elites”, ou seja, espécies que apresentem além de elevado teor lipídeos, elevadas taxas de crescimento e de produtividade de biomassa e lipídica, além da capacidade de adaptação a situações de deficiência de nutrientes e/ou estresses decorrentes de alterações nos parâmetros físicos e químicos durante seu crescimento (HO et al., 2013; RODOLFI et al., 2008).

3.2 Composição de ésteres de ácidos graxos dos grupos de microalgas

O perfil de ácidos graxos das microalgas constitui ponto crucial para seleção de espécies potenciais para produção de biodiesel, já que suas propriedades combustíveis estão relacionadas diretamente a sua composição. Os dados da composição de ésteres de ácidos graxos das espécies cultivadas estão sumarizados na Tabela 3.2.

Qualitativamente, os perfis de ácidos graxos, compreendem, como relata a literatura, estruturas entre 10 a 24 átomos de carbono, que se assemelham muito entre as espécies de mesmo filo ou classe, mas diferem entre classes e filos (HU et al., 2008). É notável a predominância de determinados ésteres nas doze espécies avaliadas, merecendo destaque os ácidos palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), esteárico (C18:0), oléico (C18:1), linoléico (C18:2), linolênico (C18:3) e mirístico (C14:0), e uma concentração diversificada de alguns tipos de ésteres de ácidos graxos comparativamente aos dois grupos de microalgas.

Tabela 3.2 – Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos das microalgas estudadas.

Espécies de Microalgas												
FAME (%)	D101 Z	D115 WC	D121 WC	D132 WC	D133 WC	D173 WC	M3C	M6C	M27C	D39 Z	D82 Z	D109 WC
C14:0	2,6	0,5	1,8	1	1,8	0,9	8	0,2	1,3	-	1,5	2,6
C16:0	16,8	31,5	29,7	29,1	47,7	20,9	35,8	47,3	30,2	34,5	40,3	23,8
C16:1	7,4	1,4	1	6,2	4,6	0,8	23,1	15,1	36,1	6	18,6	3
C16:2	1,4	1,7	0,3	1,5	4,1	1,5	-	-	1	-	-	1,5
C16:3	-	1,6	4,2	1,3	1,1	14,7			2,4		0,8	9,5
C17:0	3,8	-	1,5	-	-	2	0,3	1,6	-	-	0,3	7,6
C17:1	8,7	2,2	-	5,6	1,6	-	0,4	3,9	-	-	0,6	-
C18:0	1	9,8	2,8	5	3,7	0,3	0,9	0,6	1	1,9	0,4	0,8
C18:1	23,1	31,9	33,9	20,1	20,4	17,3	7	15,1	5	7,7	7,5	6,8
C18:2	11,2	10,9	8,2	6,5	4,5	10,5	3,9	9,9	7,7	30,1	18,7	20
C18:3	20,6	7,3	11,7	12,6	5,9	23,9	0,2	5,3	1,4	19,8	9,3	21,5
C18:4	0,2	0,8	1,8	9,5	0,5	5,2	0,2	5,3	0,9	-	-	-
C20:4	0,3	-	-	-	0,6	-	2,9	-	-	-	-	-
C20:5	-	-	0,6	-	-	0,5	14,4	-	-	-	-	-
C21:0	-	-	-	-	-	-	-	-	11,2	-	-	-

O éster palmítico se apresenta como componente majoritário nas cianobactérias, com exceção da M27C (*Aphanothece* sp.), e com concentrações elevadas também para as clorofíceas, principalmente para a D133WC (47,7%). O palmitoléico tem sua representatividade nas cianobactérias, atingindo o valor de até 36% na M27C, enquanto que nas clorofíceas o maior valor sintetizado foi de 7,4% para a D101Z.

O esteárico (C18:0) e o oléico (C18:1) foram constatados em todas as espécies de microalgas, ocorrendo de forma mais intensa nas clorofíceas, atingindo um percentual de até 33,9% (do ácido oleico) na *Pediastrum tetras* (D121WC), enquanto que nas cianobactérias a síntese máxima observada desse ácido foi de apenas 15,1% na *Romeria gracilis* (M6C).

Os ésteres com maiores teores de insaturações apresentaram divergência de acumulação na mesma classe. Mas de forma geral, as cianobactérias concentraram os maiores teores de ácido linoléico (C18:2), entre 3,9% a 30,1%. Enquanto que as clorofíceas respondem pelos mais elevados valores de ácido linolênico, permeando até 23,9%. Algumas cianobactérias como a D39Z (19,8%) e D109WC (21,5%) apresentaram teores significativos

do ácido linolênico frente às demais espécies do mesmo grupo. O ácido poli-insaturado estearidônico foi encontrado em todas as clorofíceas avaliadas, com valor máximo de 9,5% na cepa D132WC. Entretanto, apenas três das cianobactérias sintetizaram esse ácido, com variação entre 0,2-5,3%.

A composição desses dois grupos corrobora com a literatura, visto que esta aponta que as clorofíceas apresentam predominância do ácido graxo linolênico, oléico e palmítico. Enquanto as cianobactérias sintetizam em maior quantidade ésteres palmítico e linoléico (BASOVA, 2005). Mishra et al., (2015), por exemplo, verificaram que a clorofícea do gênero *Chlamydomonas* é caracterizada por sintetizar ácidos graxos de cadeia curta a média, sendo que dentre esses últimos se destacam principalmente os ácidos palmítico, oléico e linolênico. Essa composição também foi constatada para a clorofícea *Scenedesmus obliquus* (SALAMA et al., 2013).

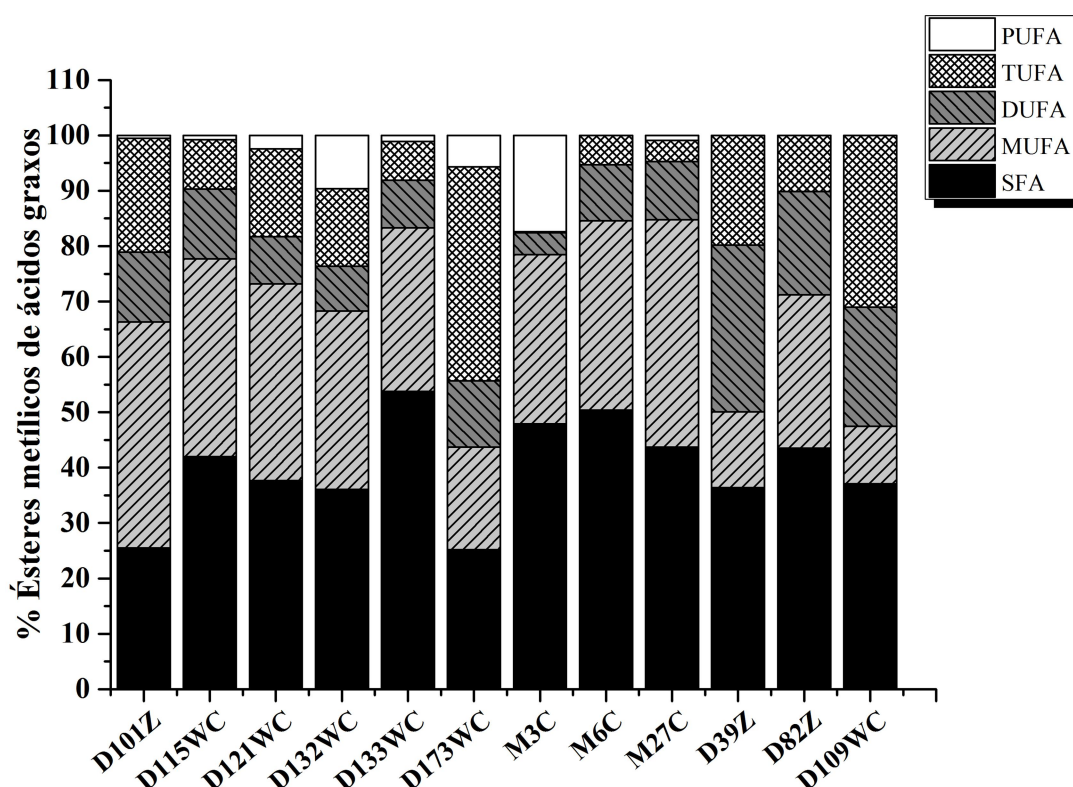
Rós (2012) cultivou a cianobactéria *Synechococcus* sp. (gênero igual ao das cepas D82Z e D109WC) obtendo uma biomassa lipídica composta por 30% de ácidos graxos saturados e 70% de insaturados, dentre os quais se destacaram os ácidos oléico, linoléico e palmítico. Esses dados corroboram com os encontrados no presente estudo. Outros cultivos realizados com *S. nidulans* apresentaram também valores consideráveis do ácido palmitoléico (RADMAN e COSTA, 2008).

A partir da análise dos dados da composição dos ácidos graxos em diferentes espécies de microalgas pode-se ressaltar que o teor desses ácidos varia de acordo com o grupo taxonômico e com as condições de crescimento (HU et al., 2008; CARDOSO et al., 2011). Por tais motivos, tem-se sugerido que o perfil de ácidos graxos poderia ser utilizado como mais um caráter taxonômico na separação microalgas estreitamente relacionadas, a nível de espécie ou de gênero (TAIPALE et al., 2013).

Em termos de tipos de ésteres de ácidos graxos, (Figura 3.1), observa-se que as clorofíceas estudadas concentram majoritariamente ésteres saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e tri-insaturados (TUFA). As cianobactérias respondem por elevados teores de ésteres saturados, e com diferentes teores de insaturação. Corroborando com esses dados, Pratoomyot et al. (2005) encontraram para *Synechococcus* sp. elevado teor de ácido palmítico (ácido saturado), bem como de ácidos monoinsaturados, di-insaturados e tri-insaturados, e teores menos consideráveis de ácidos poli-insaturados (PUFA), com exceção apenas para a M3C. O que tende a ser característico do gênero *Synechococcus* e da maioria das cianobactérias.

A quantidade desses ácidos se relacionará diretamente com as propriedades do biodiesel produzido. Assim, esses dois grupos devido ao seu teor de insaturação elevado, principalmente quando comparado com oleaginosas convencionais, terão provavelmente maior propensão à oxidação.

Figura 3.1 – Composição de ésteres por grau de saturação das doze espécies de microalgas estudadas.



3.3 Predição das propriedades do biodiesel de microalgas

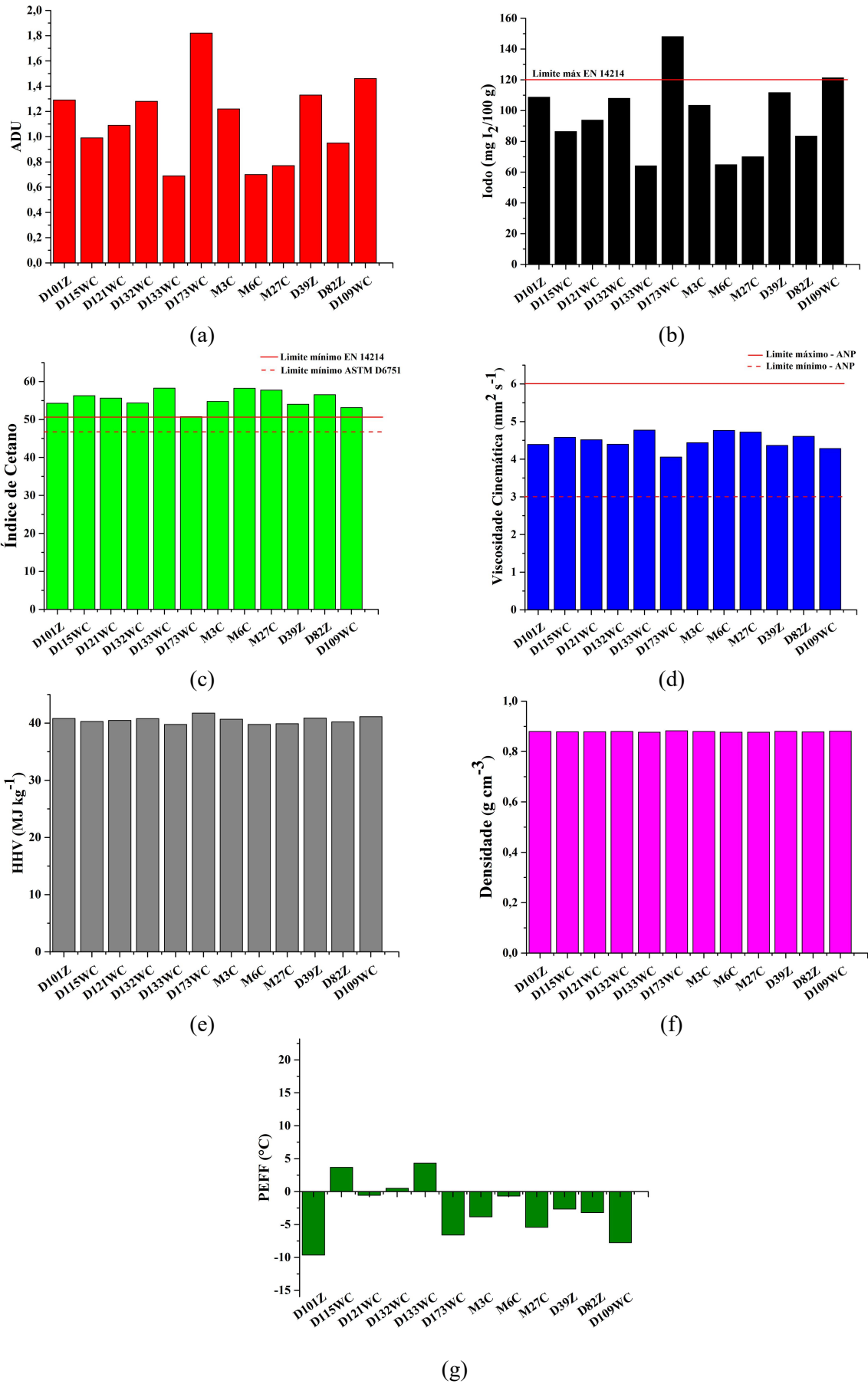
A aceitabilidade do biodiesel proveniente do óleo de microalgas, como substituto do diesel fóssil, ou até mesmo como presença marcante na matriz energética junto com as demais oleaginosas é fortemente dependente do cumprimento das especificações dos parâmetros de qualidade combustíveis, normatizados por alguns órgãos reguladores (RAWAT et al., 2013). Esses padrões de qualidade são necessários porque permitem o monitoramento e evitam prejuízos quanto à qualidade das emissões da queima, desempenho e a integridade do motor, assim como a segurança no transporte e manuseio. As características físicas e químicas do biodiesel podem variar em decorrência do tipo de estruturas moleculares dos seus ésteres

constituintes e da presença de contaminantes na matéria-prima, formados no processo produtivo ou durante a estocagem do biodiesel (LÔBO et al., 2009).

Em linhas gerais, quanto maior a cadeia hidrocarbônica, maior o índice de cetano, que é a escala que define a qualidade do combustível em relação ao poder de autoinflamação; a viscosidade, assim como os pontos de névoa e de entupimento (KNOTHE, 2008). Em relação às insaturações, quanto maior o número, menos estável o biodiesel à oxidação. Dessa forma, um biodiesel com predominância de ácidos graxos monoinsaturados são os que apresentam os melhores resultados nas propriedades pertinentes (KNOTHE et al., 2009; 2005).

O índice de iodo é um método convencional utilizado para determinar o grau de insaturação de óleos, gorduras e biodiesel, como indicativo de sua propensão aos processos oxidativos que originam a formação de depósitos e problemas no motor. Das espécies de microalgas avaliadas, (FIGURA 3.2b), as clorofíceas apresentaram, em sua maioria, valores elevados desse índice, principalmente a D173WC (148 mg I₂/g). O que decorre dos elevados valores de ésteres insaturados, principalmente o linolênico (23,9% para essa espécie), que apresenta duas posições *bis*-alílicas em sua estrutura, com consequente facilidade de abstração dos hidrogênios devido à menor energia de dissociação dessas ligações quando comparadas as posições meramente alílicas (SHAHIDI e ZHONG, 2010; KNOTHE, 2005). Vale ressaltar, que este parâmetro não é especificado pela ANP, mas a norma européia EN 14214 estabelece um valor máximo de 120 mg I₂/g, pelo qual inferiu-se que das microalgas avaliadas apenas duas não atenderam essa especificação, a D173WC e a D109WC. As demais apresentam valores que variam de 64,0 a 111,6 mg I₂/g, inferiores a oleaginosas potenciais da matriz de produção de biodiesel, como a soja e girassol que apresentam respectivamente 128 e 132,6 mg I₂/g (FERRARI e SOUZA, 2009).

Figura 3.2 – Predição das propriedades do biodiesel de microalgas.



A viscosidade cinemática representa outro parâmetro crítico para o biodiesel, por afetar os sistemas de bombeamento e injeção em motores, podendo comprometer ainda a atomização do combustível. Na Figura 3.2 (d), observa-se que todas as microalgas exibiram valores de viscosidade dentro dos limites estabelecidos pela resolução ANP (3 a 6 mm² s⁻¹), sendo os maiores valores encontrados na clorofícea D133WC (4,77 mm² s⁻¹) e nas cianobactérias M6C (4,76 mm² s⁻¹) e M27C (4,72 mm² s⁻¹). Essas espécies apresentaram os menores teores de ésteres poli-insaturados que, devido à geometria espacial de suas cadeias, tem interações entre os orbitais π bastante diminuída, com fracas forças intermoleculares, do tipo Van der Waals, resultando em um empacotamento bastante dificultado (SHU et al., 2007).

O biodiesel proveniente das doze microalgas atendeu as especificações no que diz respeito à densidade (0,85-0,90 kg L⁻¹), com valores praticamente constantes (0,88 kg L⁻¹), Figura 3.2 (f). Isto ocorre porque quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do alquiléster, maior será a densidade, no entanto, este valor decrescerá quanto maior for o número de insaturações presentes na molécula (KNOTHE, 2008). Como as microalgas apresentam perfis distintos de ésteres de cadeias longas e poli-insaturadas os valores de densidade tendem a não variar significativamente. Estudos apontam que a densidade relaciona-se diretamente ao poder calorífico do biodiesel (ALPTEKIN e CANAKCI, 2008), assim também não foram notadas grandes diferenciações nos valores referentes ao poder calorífico para os grupos de microalgas, constatou-se apenas variações entre 39,7 a 41,7 MJ kg⁻¹, valores estes superiores a fontes convencionais como a soja, girassol e sebo bovino (HOEKMAN et al., 2012). Não existe especificação para esse parâmetro, mas sabe-se que quanto maior o poder calorífico maior é a energia do combustível.

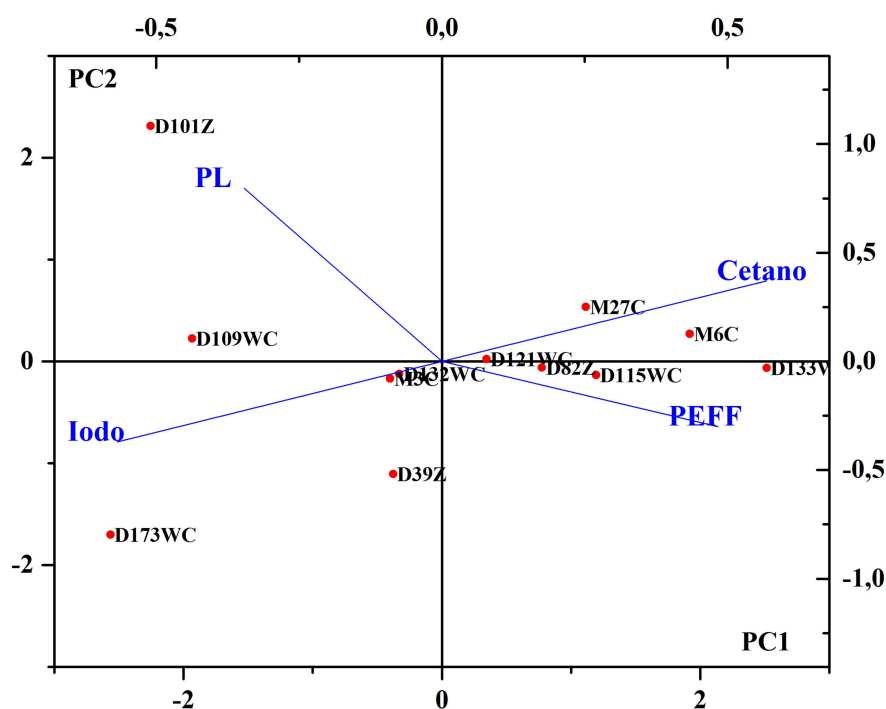
Analizando o índice de cetano, Figura 3.2 (c), pode-se dizer que todas as microalgas atenderam ao parâmetro citado pelas normas americana ASTM D6751 e européia EN 14214, de no mínimo 47 e 51, respectivamente, com destaque para as cepas D133WC e M6C, ambas com índice de 59 e os menores valores em torno de 51 e 53 para a D173WC e D109WC, respectivamente. Algumas oleaginosas terrestres foram avaliadas, tais como: palma, oliva, amendoim, soja, girassol, uva, milho e canola, e foram obtidos números de cetano entre 48 e 61, sendo o da soja, a oleaginosa mais utilizada no Brasil para a produção de biodiesel, de 49 (RAMOS et al., 2009). Esses dados corroboram diretamente com o teor de saturação dos ésteres constituintes.

O ponto de entupimento de filtro a frio do biodiesel é outro parâmetro importante e correlaciona-se à cadeias alquílicas longas e principalmente saturadas, pois essas são mais

propensas à nucleação e posterior cristalização a baixas temperaturas, restringindo, assim a circulação do combustível pelos filtros e sistema de alimentação durante a partida do motor. A ANP indica valores limitantes para este parâmetro por regiões brasileiras, bem como por períodos sazonais, e os valores máximos variam de 5 a 19 °C. Neste sentido, os valores obtidos para as espécies variaram de -9,6 a 4,3 °C, com todas atendendo a essa especificação disposta para algumas regiões brasileiras.

Uma abordagem estatística (Análise de Componentes Principais - PCA) foi aplicada aos dados das espécies de microalgas com base nos perfis de éster de ácido graxo, no tocante às estimativas das características de biodiesel: índice de iodo (IV), viscosidade cinemática a 40 °C (ρ), índice de cetano (CN), ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP) é apresentada na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Variação da produção lipídica das classes de microalgas com as propriedades preditas do biodiesel.



As duas componentes principais explicaram 88,9% da variação total observada. As variáveis mais importantes são aquelas que apresentam os maiores pesos para PC1 e está relacionada, principalmente, com o aumento do índice de cetano. Do lado inferior esquerdo do gráfico se destaca a clorofícea D173WC, que apresenta baixo índice de cetano e elevado índice de iodo. Esta microalga, além de apresentar baixa produção lipídica, é capaz de gerar

biodiesel com elevada susceptibilidade à oxidação devido ao indicativo dos teores de insaturações presentes nas moléculas dos triacilgliceróis, observado pelo índice de iodo.

É possível observar ainda na PC1, que as amostras M6C, M27C, D121WC, D115WC e D82Z possuem elevados índices de cetano. Esse fator seria interessante na produção de biodiesel, pois forneceria uma boa característica de ignição. Além de que, essa classe de microalgas possui uma produção lipídica significativa viabilizando sua utilização na produção desse biocombustível.

A produtividade lipídica, com peso negativo em PC1, é responsável por discriminar a amostra D101Z e D109WC. Essas espécies apresentam elevada produção lipídica, baixo PEFF, e no caso da D101Z índice de iodo pouco acentuado. A combinação desses parâmetros, na D101Z, propõe um biodiesel com características de qualidade bastante adequadas para o cumprimento das especificações vigentes e com aplicabilidade para produção em larga escala, visto os valores de produtividade.

A análise estatística discriminou a amostra D101Z das demais como resultado de sua elevada produtividade lipídica e parâmetros combustíveis adequados. A D121WC mostrou-se muito produtiva, e com elevado índice de cetano, o que poderia qualificar também essa espécie para uma produção de biodiesel em massa.

De forma geral, não foi possível observar tendência entre os grupos das cianobactérias e o das clorofíceas através das propriedades previstas para o biodiesel, levando em consideração o perfil de ésteres de cada espécie, pois independente do grupo houve diversificação nos valores de cada parâmetro.

3.4 Comparação entre o índice de iodo calculado e analisado na amostra

Com a finalidade de avaliar a aplicabilidade das equações prescritas nos parâmetros de qualidade do biodiesel, o índice de iodo foi analisado nas amostras de microalgas estudadas (Tabela 3.3). E o que foi observado foram valores próximos para as duas condições em todas as amostras, o que pode ser um indicativo importante para o uso dessas equações para prever as propriedades do biodiesel das microalgas.

Vale ressaltar que os valores de iodo analisados foram na maioria das amostras inferiores aos índices calculados, o que pode residir no fato de as amostras sofrerem quebra das insaturações no processo produtivo decorrente dos diversos mecanismos de auto-oxidação e/ou foto-oxidação que o biodiesel pode sofrer.

Tabela 3.3 – Valores de índice de iodo calculado por equações e analisado pelo método AOCS.

Espécies	Iodo calculado (mg I ₂ /100g)	Iodo analisado (mg I ₂ /100g)
D101Z	108,6	110,2
D115WC	86,3	79,5
D121WC	93,8	88,7
D132WC	107,9	102,6
D133WC	64,0	71,4
D173WC	148,1	139,5
M3C	103,4	100,1
M6C	64,8	62,5
M27C	69,9	60,4
D39Z	111,6	102,5
D82Z	83,4	75,6
D109WC	121,3	109,8

4. CONCLUSÕES

Das doze espécies de microalgas avaliadas, constatou-se que apenas duas, *Monoraphidium contortum* (D173WC) e *Synechococcus nidulans* (D109WC), não atenderam a alguma especificação de qualidade combustível. Sendo que esse desacordo ocorreu para o índice de iodo, que não apresenta valor fixo limitante, mas valor indicativo. Inferiu-se ainda que a clorofícea *Chlorella* sp. (D101Z) foi a que apresentou maior potencialidade para produção de biodiesel, principalmente porque reúne elevada produtividade de biomassa e de lipídeo e melhores parâmetros de qualidade. Contudo, outras espécies também se mostraram adequadas, tanto em termos de produtividade, quanto de propriedades combustíveis, como a D132WC, D121WC, D115WC e M3C.

Vale ressaltar ainda que a maioria das espécies estudadas não foram encontradas na literatura com a finalidade proposta, bem como as que já foram relatadas apresentaram parâmetros diferenciados, com menor potencial devido, devido provavelmente às condições mais favoráveis de adaptação que a região Nordeste propicia para as espécies.

REFERÊNCIAS

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Resolução nº 14 de 11 maio 2012.

ALPTEKIN, E.; CANAKCI, M. Determination of the density and the viscosities of biodiesel-diesel fuel blends. **Renewable Energy**, v.33, p.2623–2630, 2008.

BASOVA, M.M. Fatty acid composition of lipids in microalgae. **Int. J. Algae**, v.7, p.33–57, 2005

BHARATHIRAJA, B.; CHAKRAVARTHY, M.; KUMAR, R.R.; YUVARAJ, M.; JAYAMUTHUNAGAI, J. Biodiesel production using chemical and biological methods – a review of process, catalyst, acyl acceptor, source and process variables. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.38, p.368-382, 2011.

CARDOSO, A.S.; VIEIRA, G.E.G.; MARQUES, A.K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, n.4, p.542-549, 2011.

CHEN, W.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. **Bioresour Technol**, v.102, p.135–141, 2011.

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

COSTA, J.A.V.; MORAIS, M.G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresour Technol**, v.102, p.2–9, 2011.

FERRARI, R.A.; SOUZA, W.L. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.1, p.106-111, 2009.

FRANCISCO, E.C.; NEVES, D.B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T.T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.85, p.395–403, 2010.

FRANCO, A.L.C.; LÔBO, I.P.; CRUZ, R.S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v.36, n.3, p.437-448, 2013.

GRIFFITHS, M.J.; HARRISON, S.T.L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **J. Appl. Phycol**, v.21, p.493–507, 2009.

GUILLARD, R.R.L, LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.

HIDALGO, P.; TORO, C.; CIUDAD, G.; SCHOBBER, S.; MITTELBAACH, M.; NAVIA, R. Evaluation of different operational strategies for biodiesel production by direct transesterification of microalgal biomass. **Energy & Fuels**, v.28, p.3814–3820, 2014.

HO, S.H.; LAI, Y.Y.; CHIANG, C.Y.; CHEN, C.N.N.; CHANG, J.S. Selection of elite microalgae for biodiesel production in tropical conditions using a standardized platform. **Bioresour. Technol.**, v.147, p.135–142, 2013.

HOEKMAN, A.S.K.; BROCH, C.; ROBBINS, E.; CENICEROS, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.16, p.143–169, 2012.

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

ISLAM, M.A.; AYOKO, G.A.; BROWN, R.D.; STUART, M.; MAGNUSSON, K. Influence of fatty acid structure on fuel properties of algae derived biodiesel. **Procedia Eng**, v.56, p.591–596, 2013.

KNOTHE, G.; DUNN, R.O.; VAUGHN, S.F.; ISBELL, T.A. A comprehensive evaluation of the melting points of fatty acids and esters determined by differential scanning calorimetry. **J Am Oil Chem Soc**, v.86, p.843–856, 2009.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v.86, p.1059–1070, 2005.

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

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S.L.; CRUZ, R.S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1596–1608, 2009.

MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n.1, p.217–232, 2010.

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.M.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v.13, n.1, p.10–15, 2013.

MISHRA, S.; SINGH, N.; SARMA, A.K. Assessment of a Novel Algal Strain *Chlamydomonas debaryana* NIREMACC03 for Mass Cultivation, Biofuels Production and Kinetic Studies. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 8, p. 2253–2266, 2015.

NASCIMENTO, I.; MARQUES, S.; CABANELAS, I.; PEREIRA, S.; DRUZIAN, J.; SOUZA, C.; VICH, D.; CARVALHO, G.; NASCIMENTO, M. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenerg. Res**, v.6, p.1–13, 2013.

NETO, A.M.P.; SOUZA, R.A.S.; LEON-NINO, A.D.; COSTA, J.D.A.; TIBURCIO, R.S.; NUNES, T.A. Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. **Renewable Energy**, v.55, p.525–531, 2013.

PARK, S.J.; CHOI, Y.E.; KIM, E.J.; PARK, W.K.; KIM, C.W.; YANG, J.W. Serial optimization of biomass production using microalga *Nannochloris oculata* and corresponding lipid biosynthesis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.35, p.3–9, 2012.

PRATOOMYOT, J. P.; SRIVILAS; NOIRAKSAR T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 6, p. 1179 – 1187, 2005.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Quím Nova**, v.31, n.7, p. 1609-1612, 2008.

RAMOS, M.J.; FERNÁNDEZ, C.M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresour. Technol**, v.100, p.261–8, 2009.

RAWAT, I.; RANJITH, K.R.; MUTANDA, F.B.T. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. **Appl Energy**, v.103, p.444–467, 2013.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G.C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.102, n.1, p.100–12, 2008.

RÓS, P.C.M. Avaliação de óleos de cianobactérias como matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel pela rota etílica. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Escola de Engenharia de Lorena, USP, 2012.

SALAMA, E-S.; KIM, H.C.; ABOU-SHANAB, R.A.; JI, M.K.; OH, Y. K.; KIM, S. H.; JEON, B.H. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 6, p. 827-833, 2013.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Review**, v.39, p.4067–4079, 2010.

SHU, Q.; YANG, B.; YANG, J.; QING, S. Predicting the viscosity of biodiesel fuels based on the mixture topological index method. **Fuel**, v.86, p.1849-1854, 2007.

SLOCOMBE, S.P.; ZHANG, Q.Y.; BLACK, K.D.; DAY, J.G.; STANLY, M.S. Comparison of screening methods for high-throughput determination of oil yields in micro-algal biofuels strains. **J Appl Phycol**. v.25, p.961-972, 2013.

SOARES, A.T.; COSTA, D.C.; SILVA, B.F.; LOPES, R.G.; DERNER, R.B.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Comparative analysis of the fatty acid composition of microalgae obtained by different oil extraction methods and direct biomass transesterification. **Bioener. Res**, v.7, p.1035–1044, 2014.

SONG, M.M.; PEI, H.Y.; HU, W.R.; MA, G.X. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresour. Technol**, v.141, p.245–251, 2013.

STEIN, J.R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. In: Handbook of phycological methods. Cambridge University Press, p.448, 1973.

TAIPALE, S.; STRANDBERG, U.; PELTOMAA, E; GALLOWAY, A.W.E.; OJALA, A.; BRETT, M.T. Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. **Aquatic Microbial Ecology**, v.71, p.165–178, 2013.

TALEBI, A.F.; MOHTASHAMI, S.K.; TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; BAGHERI, A.; ZEINALABEDINI, M.; HADAVAND, M.H, MIRZAJANZADEH, M.; MALEKZADEH, S.S.; BAKHTIARI, S. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Res**, v.2, p.258–267, 2013.

TONG, D.; HU, C.; JIANG, K.; LI, Y. Cetane number prediction of biodiesel from the composition of the fatty acid methyl esters. **J Am Oil Chem Soc**, v.88, p.415–423, 2010.

WALNE, P.R. Studies on the food values of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. Invest. Ser. II 1970;26(5): 62.

WILLIAMS, P.J.L.B.; LAURENS, L.M.L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy Environ Sci**, v.3, p.554–90, 2010.

YU, W.L.; ANSARI, W.; SCHOEPP, N.G.; HANNON, M.J.; MAYFIELD, S.P.; BURKART, M.D. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. **Microbial Cell**, v.91, 2011.

YU, X.; ZHAO, P.; HE, C.; LI, J.; TANG, X.; ZHOU, J.; HUANG, Z. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 256-262, 2012.

ZARROUK, C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. Theises. Faculty of Science. Universite des Paris; 1966.

CAPÍTULO 4

COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E TEORES DE ÉSTERES EM QUATRO ESPÉCIES DE MICROALGAS CULTIVADAS EM ESGOTO DOMÉSTICO E EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS*

RESUMO

Microalgas são fontes potenciais de lipídeos para produção de biodiesel. No entanto, o cultivo desses micro-organismos para tal finalidade é apenas viável do ponto de vista ambiental e econômico, quando apresenta elevada produtividade de biomassa e de lipídeos e estiver associado ao uso de resíduos como meio de cultura. Neste trabalho, procurou-se testar a eficácia de diferentes meios alternativos preparados a partir de diversos tipos de efluentes, avaliando a capacidade de crescimento e produtividade de biomassa de quatro espécies regionais de microalgas nesses meios. Os cultivos foram desenvolvidos em condições controladas de luz e temperatura, com fotoperíodo de 12 horas. As respostas de crescimento foram acompanhadas por contagem celular, comparando-se a eficácia de crescimento nesses meios com o cultivo em meio sintético e determinando-se, ao final dos cultivos, a composição bioquímica e o perfil de ésteres na biomassa obtida nas condições testadas. Foram utilizados extrato de biocomposto hortifrútis (BH); biocomposto derivado de bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça (BV), biocomposto preparado com esterco de galinha (BG) e esgoto doméstico municipal (ESG). Os meios ESG e BH mostraram-se muito promissores para o cultivo das microalgas selecionadas, especialmente para *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp. e *Lagerheimia longiseta* que apresentaram rendimento máximo celular superior ao controle nesses meios. As concentrações mais elevadas de lipídeos foram obtidas em BH. Alterações na composição bioquímica e nos teores de ésteres das espécies foram observadas nas condições testadas. Os dados demonstram viabilidade para o cultivo de microalgas e produção de biomassa em meios alternativos preparados a partir dos efluentes ESG e BH e consequentemente à produção de biodiesel.

Palavras-chave: águas residuais, meio alternativo, biocombustível, biorremediação.

* Artigo publicado na Revista Bioresource Technology, v.221, p.438-446, 2016.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem havido uma crescente preocupação com a escassez dos combustíveis fósseis e com a utilização de energias renováveis para suprir as necessidades energéticas e ambientais da sociedade atual (DRIRA et al., 2016). A bioenergia, que inclui o biometano, o bioetanol, e o biodiesel, produzidos a partir de organismos fotossintéticos se constitui como fonte promissora, por ser renovável, biodegradável, e menos tóxica quando comparada com os combustíveis derivados do petróleo (CHO et al., 2011).

As microalgas são candidatas potenciais para estes usos visto que muitas espécies apresentam elevada eficiência fotossintética e grande produção de biomassa e acumulação de triacilgliceróis. Entretanto, a produção comercial das microalgas ainda tenta superar a questão da viabilidade econômica, devido aos altos custos operacionais, principalmente associados aos meios de cultura (JEBALI et al., 2015).

Os cultivos desses organismos requerem nutrientes em quantidades significativas, afetando, assim, o valor final do produto (LEVINE et al., 2011). No entanto, microalgas podem crescer em condições muito variadas de cultivo, e muitas espécies são capazes de utilizar nutrientes de águas residuais (BRENNAN e OWENDE, 2010; HU et al., 2008) com substrato para crescimento. É nesse sentido que se busca pela produção de biomassa de microalgas em efluentes como solução economicamente viável para produzir biocombustíveis, e diversos coprodutos de importância à biotecnologia.

Um dos grandes problemas da nossa sociedade é o grande volume de resíduos domésticos e oriundos dos diversos processos produtivos industriais que alimentam o atual modelo econômico. Se descartados ao ambiente de forma indevida tais resíduos podem provocar inúmeros efeitos indesejáveis, indicando que eles necessitam de tratamentos adequados a fim de minimizar tais interferências. A presença de compostos tóxicos como metais pesados e agrotóxicos nesses efluentes, e a eutrofização de corpos hídricos por descargas de nitrogênio e fósforo trazem sérios riscos ao ambiente e à vida humana (CAI et al., 2013) e necessitam de atenção urgente.

As microalgas podem ser uma solução extremamente eficaz no tratamento desses efluentes, não somente pela capacidade que elas têm de absorverem os nutrientes do meio e produzirem biomassa, mas também por removerem diversas substâncias nocivas (KOTHARI et al., 2013). Tal habilidade faz com que as microalgas possam ser cultivadas em meios preparados com águas residuais diversas, minimizando assim os custos de produção de

biomassa e criando perspectivas reais de inúmeras aplicações biotecnológicas, inclusive na produção de energia.

Inúmeros efluentes têm sido testados como meios alternativos para a produção de biomassa de microalgas: de laticínios (HENA et al., 2015), de suinocultura (ZHU et al., 2013), da agroindústria canavieira (RAMIREZ et al., 2014), esgoto doméstico (KLIGERMANN et al., 2015), manipueira (BORGHETI, 2009), da indústria de papel e celulose (GENTILI, 2014), de tanques de cultivo de peixes (MANDAL e MALLICK, 2011), da produção de cerveja (FAROOQ et al, 2013), de carpetes (CHINNASAMY et al., 2010), do processamento do óleo de palma (LAM e LEE, 2011) e de azeite (HODAIFA et al., 2009), dentre outros.

Mas apesar das inúmeras pesquisas sobre este tema ainda há limitações substanciais no que diz respeito à diversificação das fontes dos resíduos utilizados, bem como nos seus processos de pré-tratamento (GENTILI, 2014). Por outro lado, nem todas as espécies crescem adequadamente em meios formulados a partir desses resíduos, de forma que a seleção de espécies tolerantes a determinadas efluentes torna-se um critério essencial para uma produção máxima de biomassa (JEBALI et al., 2015).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o crescimento de espécies regionais de microalgas (*Chlorella sp.*, *Chlamydomonas sp.*, *Lagerheimia longiseta* e *Pediastrum tetras*) em cinco meios alternativos formulados a partir de esgoto municipal e de diferentes resíduos de origem agroindustrial, visando avaliar a influência destes meios na produtividade e composição bioquímica da biomassa obtida.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção de espécies e cultivo em condições controladas

Para este estudo foram selecionadas quatro espécies de microalgas isoladas de diferentes ambientes dulcícolas da região Nordeste do Brasil: *Chlorella sp.* (D101Z), isolada da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), Mangabeira, João Pessoa – PB; *Chlamydomonas sp.* (D132WC), isolada da Cachoeira da Purificação, Chapada Diamantina, Vale do Capão - BA; *Lagerheimia longiseta* (D133WC), isolada do Açude Malhada Limpa – RN e *Pediastrum tetras* (D121WC), isolada do açude Prainha, município de Frei Martinho-PB, as quais vêm sendo mantidas no banco de cultura de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia de Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB) em meios sintéticos. Essas espécies foram cultivadas em meios alternativos preparados a partir de esgoto doméstico (ESG), biocomposto de hortifrutis (BH), biocomposto de vinhaça (BV), biocomposto produzido a partir de esterco de galinha (BG) e em esterco de galinha bruto (EG). Como controle foram usados o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) para a primeira espécie, e o meio WC (GUILLARD e LORENZEN, 1972) para as demais. Essas espécies foram selecionadas pela sua capacidade de produzir ésteres metílicos de ácidos graxos em quantidades superiores às da soja.

Os cultivos foram desenvolvidos em câmara de cultivo climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e iluminação de $150 \mu\text{mol.fótons.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) em triplicata, em balões contendo 5L de meio de cultura com aeração. O crescimento das espécies foi acompanhado por contagens celulares em câmara de Fuchs Rosenthal, em microscópio binocular Leica.

Os experimentos foram interrompidos no início da fase estacionária e a biomassa produzida foi concentrada em centrífuga refrigerada a 18°C , congelada em ultrafreezer (-30°C) e liofilizada. Os seguintes parâmetros relacionados com a cinética de crescimento foram determinados: tempo de cultivo, duração da fase log (dias), velocidade de crescimento (k), que representa a taxa de duplicação celular por dia, calculado segundo a equação descrita em Fogg & Thake (1987), e rendimento máximo da cultura (R), que corresponde à densidade celular obtida no final de cada experimento subtraída da densidade celular inicial do cultivo (inóculo).

2.2 Preparação dos meios de cultura

Os extratos de biocompostos utilizados como meios alternativos foram preparados com os seguintes resíduos agroindustriais e de alimentos: biocomposto de hortifrutis (BH), preparado a partir da compostagem de restos de legumes e verduras descartados durante a comercialização e adquirido junto a EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas), localizada no Município de João Pessoa – PB; biocomposto preparado com bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça residual do processo de produção da indústria sucroalcooleira (BV), obtidos da usina Japungu, Santa Rita, PB, através do Sindicato dos Produtores de Açúcar e Alcool da Paraíba (SINDALCOOL) e biocomposto preparado com esterco de galinha (BG), cedido pela Empresa Guaraves Alimentos, localizada no Município de Guarabira – PB. Também foram testados como meios alternativos o esterco bruto de galinha poedeira, obtido junto a uma granja no município do Conde–PB e esgoto doméstico (ESG), proveniente de tratamento secundário, coletado na Estação de Tratamento de Esgoto da Companhia de Água e Esgoto da Paraíba (CAGEPA).

A preparação dos extratos dos biocompostos e do esterco de galinha foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Erd-Schreiber modificado (GROSS, 1937), onde a 1 kg dos referidos resíduos sólidos foi adicionado 1L de água destilada, seguido de aquecimento por 30 minutos em autoclave, filtração e esterilização dos líquidos. Os extratos foram mantidos em refrigeração e em condição estéril. O esgoto doméstico foi filtrado e autoclavado, imediatamente após a coleta.

A preparação dos meios consistiu da adição em água destilada autoclavada dos extratos dos biocompostos e de esterco de galinha nas concentrações respectivas de 10 mL L^{-1} e 5 mL L^{-1} , acrescentando-se a seguir, a cada meio, soluções de nitrato e fosfato, nas proporções de 1 mL L^{-1} , seguido do ajuste do pH para neutralidade (GROSS, 1937). O meio preparado a partir do esgoto doméstico foi elaborado diluindo-se o mesmo para 25% (v/v) com água destilada autoclavada, por se ter constatado em ensaios prévios ser esta a diluição que promovia as melhores taxas de crescimento nas espécies testadas.

2.3 Análises físicas e químicas

A qualidade dos meios de cultivo foi avaliada através de parâmetros físicos e químicos, como pH, condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos, turbidez, cloretos,

dureza, nitrito, nitrato, amônia, fosfato, e DQO, segundo os procedimentos analíticos do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

As proteínas hidrossolúveis foram quantificadas na biomassa seca obtida em cada cultivo empregando-se o método de Lowry et al., (1951), e utilizando albumina bovina como padrão; os carboidratos foram analisados pelo método adaptado de Kochert (1978), empregando-se glicose como padrão e os lipídeos totais foram obtidos por gravimetria, de acordo com metodologia adaptada de Folch et al., (1957).

O rendimento e a análise do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos das quatro espécies estudadas foram obtidos segundo o procedimento de transesterificação direta da biomassa microalgal adaptado para microescala, conforme Menezes et al., (2013). Os ésteres metílicos obtidos nesse processo foram identificados via cromatografia em fase gasosa usando um cromatógrafo a gás Agilent 7890, equipado com detector FID e injetor split/splitless. A coluna capilar utilizada foi a DB-WAX (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m); o forno operou sob temperatura inicial de 70 °C, sendo aquecido a 10 °C min⁻¹ até 240 °C, e mantido por 13 minutos, sendo novamente aquecido a 5 °C min⁻¹ até 250 °C; o injetor foi mantido a temperatura de 310 °C.

2.4 Tratamento estatístico dos dados

Os resultados do crescimento das espécies nos diferentes meios testados foram analisados estatisticamente com o programa Statistica 7.0. A normalidade e a homocedastidade das variâncias dos dados foram testadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As médias dos números de células entre os meios de cultivos testados foram comparadas pelo teste one-way ANOVA (post-hoc Tukey-HSD). Para todas as análises foi considerado $P < 0,05$ como nível de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características físicas e químicas dos meios de cultivo

Os meios alternativos preparados com os diferentes tipos de resíduos demonstraram diversificação em sua composição nutricional, provavelmente devido à sua composição

originária, local de obtenção e processos de tratamento que os mesmos foram submetidos (KLIGERMAN e BOUWER, 2015). No entanto, todos apresentaram teores significativos de nitrogênio e fósforo, especialmente os formulados com biocompostos cujos valores de nitrato variaram de 56,7 mg L⁻¹ em BG a 63,7 mg L⁻¹ em BH e de fosfato de 31,5 mg L⁻¹ em BG a 36,2 BV mg L⁻¹. Os menores valores desses nutrientes foram registrados no meio preparado a partir de esgoto doméstico (Tabela 4.1). Esses achados corroboram com dados da literatura que se referem às águas residuais municipais como tendo menores concentrações de nitrogênio (de 15-90 mg L⁻¹) e fósforo (de 5-20 mg L⁻¹) do que resíduos provenientes da produção animal. Resíduos da suinocultura, por exemplo, chegam a apresentar valores de nitrogênio total e de fósforo total que podem chegar a 3213 mg L⁻¹ e 987 mg L⁻¹, respectivamente (CAI et al., 2013).

Tabela 4.1 – Parâmetros físicos e químicos dos meios de cultura utilizados no cultivo das microalgas.

Parâmetros / meios	WC	Zarrouk	ESG	BH	BV	BG	EG
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	42,6	71,3	40	63,7	62,7	56,7	49,5
NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,0117	0,0027	0,0012	0,475	0,016	0,022	0,041
NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	<0,01	<0,01	8,7	1,3	0,6	<0,01	<0,01
PO ₄ ⁻ (mg L ⁻¹)	2,8	12,6	13,5	31,6	36,2	31,5	27,6
Dureza Parcial de Ca ²⁺ (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Dureza Parcial de Mg ²⁺ (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	0,6	1	0,1	0,7	0,3	0,7	0,4
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	46	42	14	62	49	60	65
Condutividade elétrica (mS cm ⁻¹)	0,297	19,4	0,253	0,374	0,339	0,337	0,667
Sólidos totais dissolvidos (mg L ⁻¹)	193	12000	105	243	220	219	426
Turbidez (NTU)	4,63	0,71	2,37	4,40	9,68	4,49	23,8
DQO (mg O ₂ L ⁻¹)	36	48	128	208	260	298	448

As necessidades nutricionais das microalgas incluem, além de nitrogênio e fósforo, também diversos micronutrientes em quantidades consideráveis, com limites e relações específicas para cada espécie (KLIGERMAN e BOUWER, 2015). No presente estudo os valores de condutividade elétrica e os teores dos sólidos totais dos meios utilizados foram similares aos encontrados no meio WC, sugerindo a presença de diversos íons que podem se configurar como macro e micronutrientes, indicando que as concentrações desses elementos são suficientes para o cultivo de microalgas nesses meios. A formulação do meio Zarrouk

mostra-se muito mais seletivo, visto que apresenta condutividade elétrica e carga de sólidos totais muito superiores, da ordem de 65,31 e 62,17 vezes mais elevados, respectivamente.

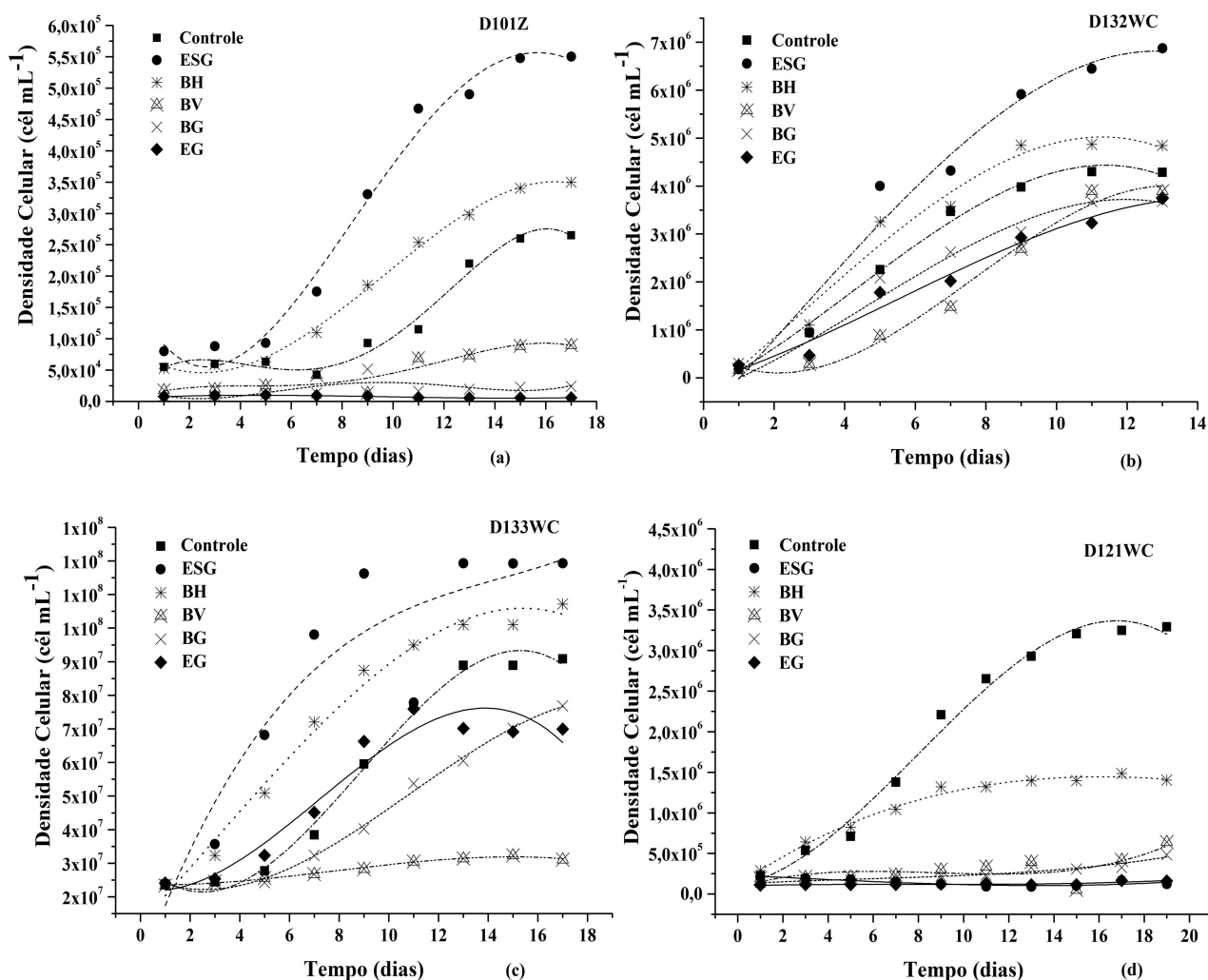
A turbidez e a DQO também se apresentam como parâmetros de interesse para determinar a adequação de águas residuais para o crescimento de microalgas. Elevada turbidez pode comprometer a penetração da luz no cultivo e limitar o processo de fotossíntese. Excetuando os meios preparados com esterco de galinha e com biocomposto de bagaço de cana e vinhaça, que apresentaram valores mais elevados deste parâmetro, todos os demais mostraram valores compatíveis com a turbidez do meio WC (Tabela 4.1). Os valores de DQO mais elevados ocorreram nos meios preparados com biocomposto e esterco bruto de galinha. Este último apresentou uma superioridade de 9 a 12 vezes em relação aos meios sintéticos WC e Zarrouk. Contudo, estes valores, mesmo elevados entre os meios em estudo, são inferiores ao relatado por Zhu et al., (2013) quando cultivaram *Chlorella* em resíduo suíno e alcançaram elevada produtividade de lipídeos ($110,5 \text{ mg}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) quando a DQO inicial foi diluída para 1900 mg L^{-1} .

Wang et al., (2012) trabalhando com *Chlorella pyrenoidosa* demonstraram que altos valores de DQO podem suprimir o crescimento inicial das microalgas devido a limitação do fluxo luminoso causado por algumas substâncias orgânicas de alto peso molecular. Contudo, estas mesmas substâncias podem possibilitar a microalga crescer de forma mixotrófica produzindo altas concentrações de biomassa.

3.2 Parâmetros de crescimento das microalgas

As quatro espécies de microalgas mostraram diferentes respostas de crescimento em cada um dos meios alternativos testados (Figura 4.1). As maiores respostas foram registradas em *Chlorella* sp. (D101Z), *Chlamydomonas* sp. (D132WC) e *Lagerheimia longiseta* (D133WC) especialmente em ESG e extrato de BH, superando, nessas condições, inclusive o cultivo controle. Esses dois meios apresentaram elevadas taxas de crescimento (k), maiores valores de rendimento celular e concentração de biomassa, e maiores valores de produtividade (Tabela 4.2).

Figura 4.1 – Curvas de crescimento das quatro espécies de microalgas cultivadas nos diferentes meios alternativos e no meio controle.



A dificuldade de cultivar microalgas em efluentes tratados anaerobicamente, devido à coloração escura do meio, já havia sido ressaltada por Gonzalez-Fernandez et al., (2011). Wang et al., (2010) também demonstraram que apenas meios com turbidez inferior a 95 NTU, obtidos a partir de diluições, não seriam afetados por problemas de difusão de luz e inibição do crescimento em ensaios com *Chlorella* sp. em meio preparado a partir de esterco digerido anaerobicamente. No presente estudo, todos os meios utilizados apresentaram valores de turbidez muito inferiores do que o máximo sugerido por Wang et al. (2010) de modo que todos se mostram apropriados ao cultivo de microalgas no que concerne a este parâmetro.

O rendimento máximo celular de *Chlorella* sp. no meio ESG e no meio BH chegou a ser, respectivamente, mais que o dobro e cerca de 1,4 vezes a mais do que o registrado no

meio controle, sendo as diferenças significativas ($F= 35,53$; $gl= 48$; $P= 0,0001$; Fig. 4.1, Tabela 4.2), porém, nos outros meios o crescimento foi incipiente apenas em BV. O maior crescimento desta espécie em meio ESG associa-se, provavelmente, ao fato desta ter sido isolada justamente de uma estação de tratamento de esgotos, portanto já adaptada às condições nutricionais utilizadas. Este fato pode ser um indicativo de que sua aptidão em crescer em meios muito ricos em nutrientes seja consequência de suas exigências nutricionais, moldadas pela natureza química, no decorrer de um longo processo adaptativo. Este achado é muito relevante por indicar que ambientes inóspitos podem abrigar espécies apropriadas ao cultivo em meios residuais (CHINNASAMY et al., 2010), sendo este um importante caminho a ser investigado em trabalhos futuros visando o cultivo de microalgas em meios alternativos para aplicações biotecnológicas.

Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos de crescimento das microalgas estudadas nas diferentes condições testadas.

Espécie	Meio	k	Rendimento máximo celular (cél mL ⁻¹)	Concentração de Biomassa (mg L ⁻¹)	Produtividade Biomassa (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
<i>Chlorella</i> sp. (D101Z)	Z	1,74±0,31	2,65x10 ⁵	545	948,3
	ESG	2,15±0,18	5,5x10 ⁵	1805	3880,7
	BH	1,96±0,08	3,50 x10 ⁵	183	358,7
	BV	0,36±0,04	0,90 x10 ⁵	112	40,3
	BG	0,13±0,02	0,24 x10 ⁵	52	6,8
	EG	0,07±0,03	0,06 x10 ⁵	62	4,3
<i>Chlamydomonas</i> sp. (D132WC)	WC	0,95±0,27	4,28x10 ⁶	371	352,4
	ESG	1,62±0,43	6,87x10 ⁶	326	528,1
	BH	1,28±0,17	4,84x10 ⁶	483	618,2
	BV	0,74±0,11	3,89x10 ⁶	72	53,3
	BG	0,92±0,08	3,68x10 ⁶	188	172,9
	EG	0,53±0,14	3,73x10 ⁶	364	192,9
<i>Lagerheimia longiseta</i> (D133WC)	WC	0,55±0,08	0,91x10 ⁸	430	236,5
	ESG	1,14±0,27	1,19x10 ⁸	111	126,5
	BH	1,03±0,41	1,07x10 ⁸	380	391,4
	BV	0,09±0,03	0,31x10 ⁸	16	1,4
	BG	0,47±0,14	0,77x10 ⁸	123	57,8
	EG	0,39±0,09	0,69x10 ⁸	105	40,9
<i>Pediastrum tetras</i> (D121WC)	WC	0,81±0,26	3,29x10 ⁶	508	411,5
	ESG	0,05±0,02	0,12 x10 ⁶	62	3,1
	BH	0,46±0,14	1,40 x10 ⁶	142	65,3
	BV	0,08±0,01	0,64 x10 ⁶	53	4,2
	BG	0,10±0,05	0,48 x10 ⁶	26	2,6
	EG	0,06±0,04	0,16 x10 ⁶	19	1,1

A espécie *Chlamydomonas* sp. mostrou excelente crescimento em todos os meios, sem apresentar diferença estatística significativa ($F = 1,5001$; $gl = 36$; $p = 0,214$; Fig. 4.1b), nas contagens celulares, entre as condições testadas. Os rendimentos máximos foram obtidos nos meios ESG e BH, sendo que em ESG foi superior aos demais, possivelmente devido a maior concentração de nitrogênio amoniacal. Escudero et al. (2014) observaram que *Chlamydomonas acidophila* apresenta grande capacidade de assimilação de nitrogênio amoniacal e é promissora para remoção de nutrientes de resíduos digeridos anaerobicamente.

A espécie *Chlamydomonas* sp. foi a única a apresentar rendimento máximo muito próximo do controle nos meios BV e EG (Figura 4.1b, Tabela 4.2). Este achado é relevante visto que vários autores têm relatado que substâncias fenólicas e melanoidinas presentes na vinhaça causam inibição no crescimento ou toxicidade a determinadas espécies de microalgas (RAMIREZ et al., 2014). Marques et al., (2013), por exemplo, constataram que a vinhaça mostrava-se altamente tóxica para *Chlorella vulgaris* em concentrações superiores a 4%. Olguín (2012) relata que a biodigestão da vinhaça pode promover a mineralização de compostos e redução de substâncias tóxicas favorecendo o crescimento celular, podendo ser este um caminho promissor a ser investigado no tocante ao tratamento deste resíduo e produção de biomassa microalgal para aplicações biotecnológicas.

A *Lagerheimia longiseta* também mostrou crescimento em quase todos os meios testados, exceto em BV. Em ESG e BH o rendimento máximo e a produção de biomassa foram superiores ao controle. Os dados das contagens celulares ao longo da curva de crescimento foram estatisticamente diferentes ($F = 3,0486$; $gl = 40$; $p = 0,027$; Figura 4.1c; Tabela 4.2), sendo as diferenças registradas no meio BG em relação ao ESG.

A espécie *Pediastrum tetras* cresceu apenas em BH, cujo rendimento máximo e produção de biomassa chegaram a ser a metade do que foi registrado no meio controle (Figura 4.1, Tabela 4.2). Park and Craggs (2014) constataram que a espécie *Pediastrum boryanum* apresenta bom crescimento em águas residuais de lagoas de estabilização o que não foi observado neste estudo no meio ESG.

As divergências observadas nos parâmetros cinéticos de crescimento das quatro cepas, nos distintos meios alternativos estudados, mostram que cada espécie responde de forma distinta às condições de cultivo, e isto pode estar associado à natureza química dos meios utilizados, inclusive devido à presença de substâncias tóxicas que podem inibir o crescimento de determinadas espécies (CAI et al., 2013).

Como as microalgas assimilam preferencialmente o nitrogênio amoniacal, pode-se inferir que o maior desempenho das espécies D101Z, D132WC e D133WC em ESG (Tabela

4.2) possa estar associado à presença de maior concentração de NH_4^+ nesse meio. Corroborando esta assertiva, há relatos de que o consumo de nitrato não ocorre até que a amônia seja praticamente consumida (ESCUDERO et al., 2014).

As maiores concentrações de biomassa foram registrados no meio ESG na *Chlorella* sp. (D101Z) e no meio BH nas demais espécies testadas (Tabela 4.2), sendo que no primeiro caso o valor foi muito mais expressivo, superando inclusive o meio controle em cerca de 3 vezes. *Chlamydomonas* sp. também apresentou concentração de biomassa superior ao meio controle em 1,3 vezes. A produtividade diária em biomassa seguiu o mesmo padrão, com maior valor em *Chlorella* sp. no meio ESG, e nas demais espécies no meio BH. *Chlorella* sp. e *Chlamydomonas* sp. apresentaram valores de produtividade de biomassa superiores ao meio controle, aproximadamente na mesma proporção. Esses dados demonstram que é possível produzir grandes quantidades de biomassa em meios alternativos preparados a partir de resíduos domésticos e agroindustriais, barateando assim os custos de produção.

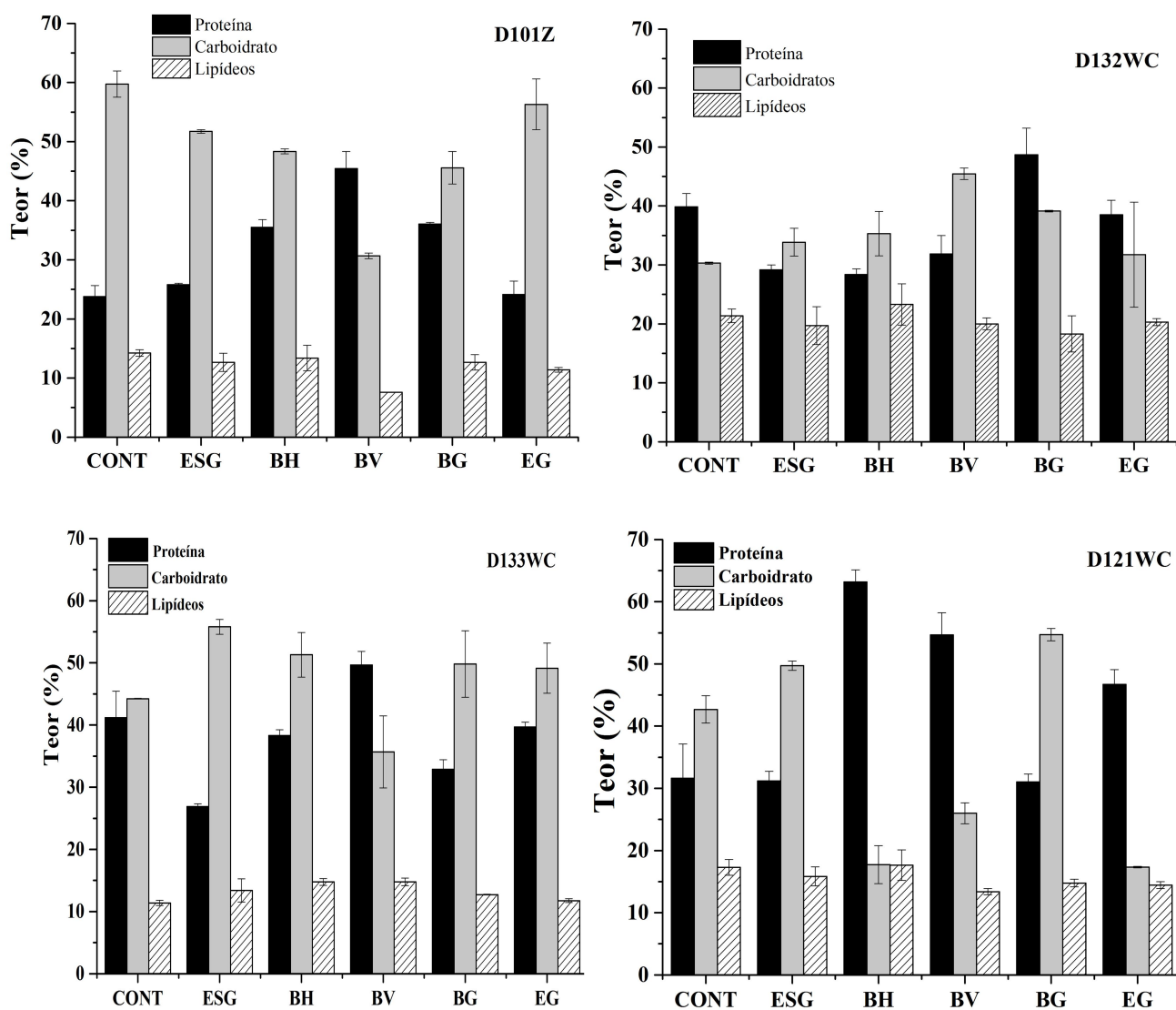
Em outros tipos de resíduos, valores elevados de biomassa também têm sido observados, a exemplo de Woertz et al., (2009) quando cultivaram um mix das espécies *Actinastrum*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Spirogyra*, *Nitzschia*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Chlorococcum*, *Closterium* e *Euglena* em efluentes de laticínios diluído a 10% ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) e Abou-Shanabet al., (2013) com *Scenedesmus obliquus* cultivada em resíduo suíno ($0,43 \text{ g L}^{-1}$). Os valores máximos de produtividade de biomassa observados, neste estudo, também são compatíveis com dados registrados por McGinn et al., (2012) em cultivo de *Scenedesmus* sp. em efluente secundário de esgoto ($0,27 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e por Bjornsson et al., (2013) em cultivo de *Scenedesmus* sp. em resíduos diluídos da digestão anaeróbica de esterco bovino e suíno ($151,2$ e $187,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente).

3.3 Composição bioquímica

A composição bioquímica das microalgas estudadas mostrou ser influenciada pela natureza da cada meio alternativo testado (Figura 4.2). Considerando todas as condições testadas, constatou-se que os maiores teores de proteínas foram encontrados nos meios BV e BH para a cepa D101Z, BG para a cepa D132WC, BV para a D133WC e BH, BV e EG para a cepa D121WC, superando, nessas condições os teores registrados no meio controle. Chama atenção o máximo registrado para esta espécie que atingiu mais que 60% no meio BH e as espécies D133WC e D132WC e D101Z que apresentaram valores próximos a 50% em meio

BV. Nos demais meios os valores permearam entre 30 e 55%. Por sua vez, os teores mais elevados de carboidratos (em torno de 60% para alguns meios) foram registrados nas espécies D101Z e D133WC. Concentrações pouco consideráveis também foram registradas nas espécies D132WC (Controle, ESG e BG) e D121WC (BV). A maioria das espécies apresentou teores expressivos em ESG, mesmo este tendo apresentado os teores de nutrientes mais baixos (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Componentes bioquímicos das quatro espécies de microalgas cultivadas nos diferentes meios alternativos testados e no meio controle.



Yao et al., (2015) obtiveram valores de proteínas e carboidratos similares aos encontrados neste estudo para os gêneros *Chlamydomonas* e *Chlorella*, quando cultivadas em meio sintético. Não há relatos de valores de proteína e carboidrato de espécies cultivadas com os extratos de biocompostos utilizados neste estudo. Ge e Champagne (2016) verificaram que os maiores teores de proteína foram registrados em meios com alto teor de nitrogênio em cultivos de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de esgoto doméstico. Estes autores constataram que meios com teores mais elevados de nitrogênio (principalmente o NH_4^+) e fósforo propiciavam diminuição nas concentrações de carboidratos e aumento em proteínas. Li et al. (2011) demonstraram que as células de microalgas possuem um nível basal de amido em cultivos com baixas quantidades de compostos nitrogenados, mas em ambiente rico em nitrogênio as microalgas tendem a utilizar este nutriente para sintetizar mais proteínas, ácidos nucléicos e fosfolipídeos e promover altas taxas de fixação de dióxido de carbono.

Quanto ao percentual lipídico, os maiores teores ocorreram na espécie D132WC em praticamente todos os meios testados, enquanto que os menores valores foram registrados nas cepas D101Z e D133WC. De forma geral, o meio BH apresentou os valores mais elevados, muito embora não se tenha observado grandes diferenças entre os diversos meios nos valores registrados em cada espécie. Na cepa D132WC, os percentuais de lipídeos variaram desde pouco menos de 20% no meio BG até mais que 25% no meio BH (Figura 4.2). Os resultados evidenciaram que o percentual lipídico praticamente não foi afetado com as variações dos meios, apesar da diversificação nas concentrações de nitrogênio e de outros nutrientes que, segundo Li et al. (2014), interfere diretamente na síntese lipídica. Contudo, Drira et al. (2016) apontam que outros parâmetros, como intensidade luminosa, pH e temperatura, podem influenciar diretamente na acumulação lipídica.

Os elevados teores de proteínas, carboidratos e lipídeos nos vários meios alternativos testados indicam que estes podem ser utilizados para diversas finalidades: produção de biodiesel, agregando valor ao processo produtivo através do uso da biomassa residual da extração lipídica (HU et al., 2008); incorporação da biomassa em ração animal em substituição aos farelos convencionais e na aquicultura; fonte para produção de outros biocombustíveis como o etanol e o butanol, em função dos altos teores de carboidratos na biomassa obtida; produção de metano e hidrogênio (LAKANIEMI et al., 2013) pela fermentação da biomassa residual obtida.

A literatura evidencia valores de lipídeos próximos aos encontrados neste estudo em outros substratos residuais, incluindo efluente urbano e resíduo de laticínio digerido, com valores de 11% (LI et al., 2011) e 10,1% (WANG et al., 2010) de lipídeos, respectivamente,

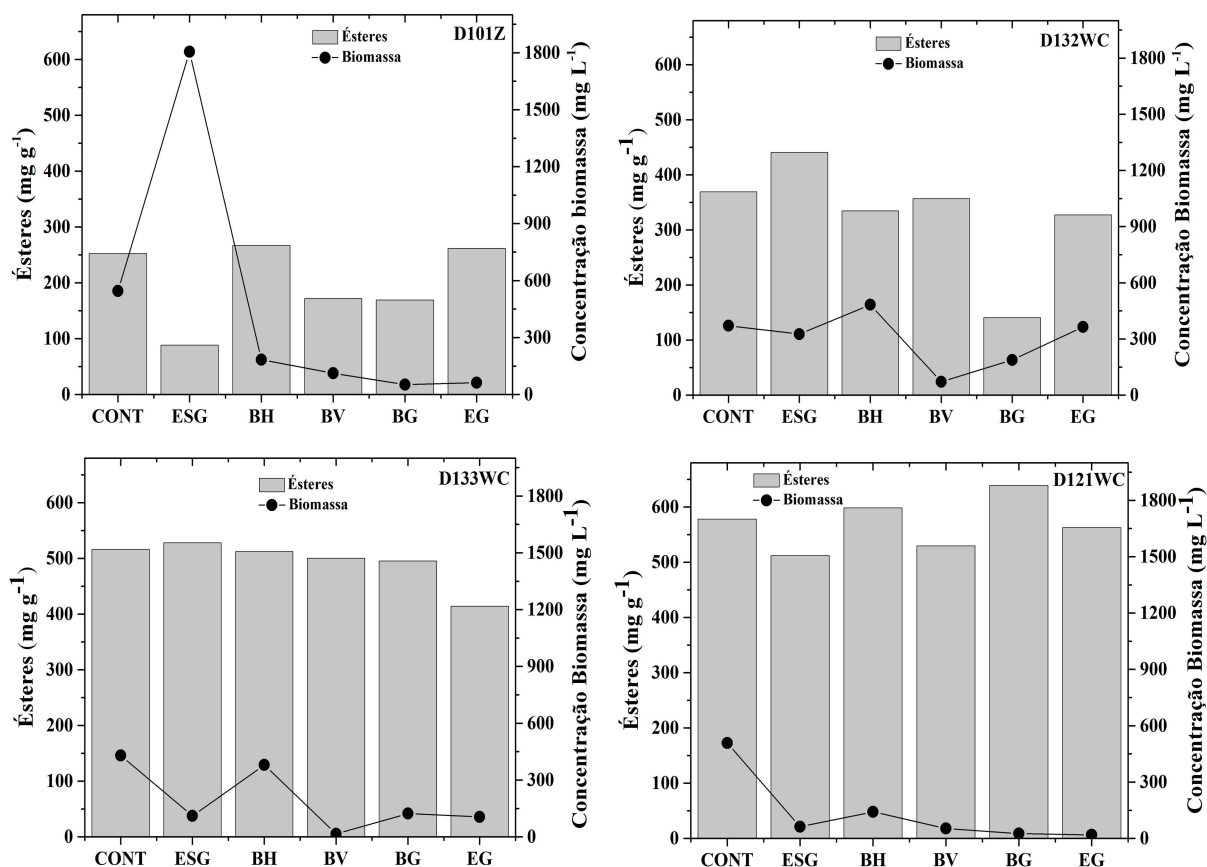
em *Chorella* sp., e águas residuais industriais, com 18,4 % de lipídeos em *Chlamydomonas* sp. (WU et al., 2012). Em esgoto doméstico tem-se verificado produtividade lipídica de microalgas inferior a 10% (WU et al., 2014).

3.4 Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

A possível aplicação de microalgas para produção de biodiesel relaciona-se com a concentração em ésteres que cada biomassa pode produzir e sua relação com a concentração da biomassa produzida visto que estes parâmetros podem validar esta aplicação. Entretanto, constatou-se que os maiores valores de biomassa nem sempre resultaram nos maiores teores de ésteres nas diferentes condições testadas.

Os maiores teores de ésteres foram registrados na cepa D121WC, especialmente nos meios BH (598,5 mg g⁻¹) e BG (638,7 mg g⁻¹), porém, a produtividade em biomassa desta espécie foi muito baixa. Por outro lado, a maior concentração de biomassa foi registrada na cepa D101Z no meio ESG (1805 mg L⁻¹), mas nesta condição o teor de ésteres foi o mais baixo (88,45 mg g⁻¹), Figura 4.3. Valores acentuados de ésteres também foram observados para a D133WC (em torno de 500 mg g⁻¹ em praticamente todos os meios), mas a concentração de biomassa produzida não é elevada, principalmente nos meios ESG (111 mg L⁻¹) e BV (16 mg L⁻¹), para possibilitar uma produtividade efetiva de ésteres frente a esses meios. As maiores relações entre total de ésteres/concentração de biomassa foram registradas na cepa D121WC C, na D133WC C e BH e na D132WC, nos meios ESG, BH e EG.

Figura 4.3 – Relação entre os teores de ésteres e a concentração de biomassa obtida nos cultivos efetuados nos diferentes meios alternativos e no meio controle.



Dados da literatura evidenciam teores de ésteres muito variados em diferentes espécies. Soares et al., (2014) registraram valores de ésteres de 50,2 mg g⁻¹ em *Chlorella* sp. e 636,4 mg g⁻¹ em *Chaetoceros muelleri* e Menezes et al., (2013) reportaram teores de ésteres entre 198 a 422 mg g⁻¹, superior aos 196,9 mg g⁻¹ obtido na soja, para as espécies *Choricystis* sp., *Monoraphidium komarkovae*, *Kirchneriella lunaris*, e *Tetranephris brasiliensis* concluindo que estas espécies apresentavam potencial para produção de biodiesel. Todas as microalgas testadas superaram de forma efetiva o valor reportado para a soja na maioria das condições testadas, o que as qualificam também como espécies potenciais para a produção de biodiesel.

3.5 Composição química de ácidos graxos

A literatura aponta que o conteúdo e a composição de ácidos graxos em microalgas são específicas para cada espécie (HU et al., 2008) predominando, no geral, uma mistura de

ácidos graxos insaturados: palmitoléico (C16:1), oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3), bem como ácidos graxos saturados: palmítico (C16: 0) e esteárico (C18:0) (ABOU-SHANAB et al, 2013). Esta mesma composição foi encontrada nas microalgas avaliadas, com algumas variações em função da composição das águas residuais utilizadas para os cultivos (Tabela 4.3).

O ácido palmítico (C16:0), que é reconhecido por sua vasta aplicação na produção de cosméticos (MOHAN et al., 2011) e que atualmente vem sendo apontado como um novo e específico inibidor do HIV-1 (LIN et al., 2011), foi encontrado com valores acentuados em todas as espécies testadas principalmente quando cultivadas em esgoto doméstico e esterco bruto de galinha, atingindo percentuais de 44,2 (D101Z, ESG), 35,1 (D132WC, EG), 36,1 (D121WC, ESG) e 40,6% (D133WC, EG), cabendo destaque para este último que apresenta um quantitativo de mais de 3 vezes o valor obtido no cultivo controle da referida espécie.

Em todas as espécies constatou-se uma divergência significativa na acumulação do ácido esteárico (C18:0), com valores extremamente elevados para as espécies D101Z, ESG (21,7%), D132WC, ESG (13,5%), D133WC, BG (25,7%) e D121WC, BH (18,9%) contrastando com os baixos valores registrados no meio controle e nos demais meios nas espécies D101Z (1,4-2,9%), D132WC (2,2-6,2%), D133WC (7,3-15,6%) e D121WC (5,4-11,4%). Este ácido apresenta relevância para produção de biocombustíveis, como biodiesel e bioquerosene, e ainda na preparação de suplementos dietéticos (MOHAN et al., 2011), bem como contribui para um aumento no número de cetano e estabilidade oxidativa do biodiesel.

O ácido palmitoléico (C16:1) não foi detectado em todas as amostras, assim, sua representatividade nas espécies D133WC, EG (10,3%) e na D121WC, ESG (7,9%) deve ser ressaltada, principalmente porque estes valores são superiores ao observado em algumas microalgas relatadas na literatura, a exemplo da *Isochrysis* sp. (4,9%), *Tetraselmis* sp. (0,4%) e *Rhodomonas* sp. (1,9%) (HUERLIMANN et al., 2010). A espécie D132WC, BG apresentou 40,2% de ácido linolênico, uma particularidade frente às demais espécies e meios testados. Este valor se assemelha ao obtido no óleo de linhaça, que é considerada uma das principais fontes oleaginosas de ω -3, fundamental para prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose (GÓMEZ-CORTÉS et al., 2016).

Tabela 4.3 – Perfil de ésteres metílicos dos ácidos graxos das microalgas.

Espécies	Ésteres Metílicos de Ácidos graxos (%)										SFA	MUFA	DUFA	PUFA
	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C17:3	C18:3	C22:6				
101CONT	30,4	2,9	2,2	4,6	2,0	12,3	17,5	3,6	17,1	7,35	32,4	15,2	19,7	32,6
101 ESG	44,2	2,8	ND	ND	21,7	27,1	8,7	ND	ND	ND	65,9	27,9	8,7	ND
101 BH	28,3	ND	1,8	4,2	1,4	11,7	15,0	4,8	23,4	9,3	29,7	11,7	16,8	41,7
101 BV	38,6	2,7	1,8	3,5	2,9	14,9	13,8	4,9	4,9	ND	41,5	17,6	15,6	ND
101 BG	38,6	ND	ND	ND	2,9	18,6	17,1	4,3	4,3	ND	41,5	18,6	17,1	8,6
101 EG	36,2	ND	ND	ND	1,8	19,5	15,8	ND	ND	ND	38	19,5	15,8	ND
132 CONT	31,1	0,8	3,5	0,4	4,7	22,4	19,3	1,0	16,0	ND	35,8	23,2	22,8	17,4
132 ESG	19,7	0,4	3,6	ND	13,5	37,1	17,3	0,4	8,1	ND	32,5	37,5	20,9	8,5
132 BH	26,1	2,9	3,3	0,4	3,0	12,6	17,3	ND	25,4	8,7	29,1	15,5	20,6	34,5
132 BV	32,9	3,1	2,2	4	6,2	28,6	11,1	ND	10,1	1,7	39,1	31,7	13,3	15,8
132 BG	25,7	3,9	ND	ND	2,2	9,2	15,9	0,7	40,2	ND	27,9	13,1	15,9	40,9
132 EG	35,1	3,0	0,9	ND	4,2	18,3	8,8	0,6	28,9	ND	39,3	21,3	9,7	40,9
133 CONT	11,9	ND	ND	ND	15,6	39,3	14,3	ND	3,7	ND	27,5	39,3	14,3	3,7
133 ESG	21,1	1,3	ND	ND	9,5	29	14,2	ND	3,5	ND	30,6	30,3	14,2	3,5
133 BH	10,5	ND	ND	ND	12,5	19,2	11,4	ND	3,2	ND	23	19,2	11,4	3,2
133 BV	24,5	ND	ND	ND	7,3	51,3	11,4	ND	ND	ND	31,8	51,3	11,4	ND
133 BG	26,1	ND	ND	ND	25,7	10,6	8,7	ND	9,5	ND	51,8	10,6	8,7	9,5
133 EG	40,6	10,3	ND	ND	8,7	17,0	10,3	ND	13,1	ND	49,3	27,3	10,3	13,1
121 CONT	26,5	ND	ND	ND	8,5	38,4	13,2	ND	8,6	ND	35	38,4	13,2	8,6
121 ESG	36,1	7,9	ND	ND	5,4	28,2	10,0	ND	12,4	ND	41,5	36,1	10	12,4
121 BH	33,1	ND	ND	ND	18,9	30,3	9,4	ND	6,7	ND	52	30,3	9,4	6,7
121 BV	29,1	ND	ND	ND	7,1	37,4	10,2	ND	10,8	ND	36,2	37,4	10,2	10,8
121 BG	20,4	ND	ND	ND	8,8	43,4	10,9	ND	0,8	ND	29,2	43,4	10,9	0,8
121 EG	33,1	ND	ND	ND	11,4	28,2	11,6	ND	15,6	ND	44,5	28,2	11,6	15,6

A presença do C17:3 em algumas espécies e meios testados provavelmente está associada à contaminações bacterianas, visto que os cultivos não eram axênicos. A presença do docosaheptaenóico (C22:6), importante ômega-3 de alto valor nutracêutico, observado nas espécies D101Z e D132WC, particularmente em cultivos no meio BH, pode gerar um valor agregado ao biodiesel, reforçando a possibilidade de produção segundo o conceito de biorefinaria.

Variações nos teores de ácido palmítico (C16:0), oléico (C18:1) e linolênico (C18:3) também foram observadas por Wu et al., (2012) em cultivo de *Chlamydomonas* sp. em águas residuais industriais. Do mesmo modo, Zheng et al., (2016) observaram aumento nas proporções de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (MUFA) e diminuição de ácidos graxos poli-insaturados em cultivos de *Chlorella* sp., *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricornutum* efetuados em concentrações elevadas de extratos de resíduos de kelps (6,0-8,0%), indicando que a adição do extrato aumentará o potencial destas espécies para produção de biodiesel.

Variações na composição dos ésteres foram observadas para todas as espécies nas distintas condições testadas, porém, de forma geral pôde-se constatar que a biomassa obtida do meio BH apresenta menores valores de ésteres saturados e monoinsaturados em relação ao cultivo controle, com consequente aumento nos poliinsaturados. Apenas as amostras cultivadas em ESG apresentaram tendência oposta, com aumento nos teores de saturados (SFA) e de monoinsaturados (MUFA) e redução dos triinsaturados (TUFA) e poliinsaturados (PUFA) em relação ao controle, evidenciando uma condição adequada para a produção de biodiesel por aumentar a estabilidade oxidativa e as propriedades de fluxo.

4. CONCLUSÕES

Todos os resíduos investigados mostraram potencialidade para formulação de meios de cultivo alternativo para as microalgas testadas, evidenciando possibilidades reais de sua utilização na produção de biodiesel.

Os meios ESG e BH mostraram-se muito promissores para o cultivo das microalgas, especialmente para *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp. e *Lagerheimia longiseta* que apresentaram rendimento máximo celular superior ao controle nesses meios. As concentrações mais elevadas de lipídeos foram obtidas em meio BH e alterações na

composição bioquímica e nos teores de ésteres das espécies foram observadas nas condições testadas.

Espécies praticamente inexploradas pela literatura, como *Lagerheimia longiseta*, demonstraram relevância visando cultivos em larga escala devido sua facilidade de crescimento nos meios preparados com os diferentes resíduos, produção de ésteres e outros compostos bioquímicos que agregam valor ao processo produtivo.

REFERÊNCIAS

ABOU-SHANAB, R.A.I.; JI, M.K.; KIM, H.C.; PAENG, K.J.; JEON, B.H. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. **J. Environ. Manage**, v.115, p.257–264, 2013.

APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American public health Association. American Water Works Association, **Water Environmental Federation**, 20th ed. Washington, 1998.

BJORNSSON, W.J.; NICOL, R.W.; DICKINSON, K.E.; MCGINN, P.J. Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: functional coupling of energy and biomass production. **J. Appl. Phycol**, v.25, p.1523–1528, 2013.

BORGHETTI, I. A. Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira. **Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos, Setor de Tecnologia**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of Technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew. Sustain. Energ. Ver**, v.14, p.557–577, 2010.

CAI, T.; PARK, S.Y.; LI, Y.B. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renew. Sust. Energ. Ver**, v.19, p.360–369, 2013.

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, R. W.; DAS, K.C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mil effluents for biofuel applications. **Bioresour. Technol**, v.101, n.9, p.3097–3105, 2010.

CHO, S.; LUONG, T.T.; LEE, D.; OH, Y.K.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresour. Technol**, v.102, p.8639–8645, 2011.

DRIRA, N.; PIRAS, A.; ROSA, A.; PORCEDDA, S.; DHAOUADI, H. Microalgae from domestic wastewater facility's high rate algal pond: Lipids extraction, characterization and biodiesel production. **Bioresour. Technol**, v.206, p.239–244, 2016.

ESCUADERO, A., BLANCO, F., LACALLE, A., PINTO, M. Ammonium removal from anaerobically treated effluent by *Chlamydomonas acidophila*. **Bioresour. Technol**, v.153, p.62–68, 2014.

FAROOQ, W.; LEE, Y.-C.; RYU, B.-G.; KIM, B.-H.; KIM, H.-S.; CHOI, Y.-E.; YANG, J.-W. Two stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. **Bioresour. Technol**, v.132, p.230-238, 2013.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem**, v.226, p.497–509, 1957.

FOGG, G.E.; THAKE, B. *Algae Cultures and Phytoplankton Ecology*. third ed. The University of Winsconsins Press Ltd., London, 1987.

GE, S.; CHAMPAGNE, P. Nutrient removal, microalgal biomass growth, harvesting and lipid yield in response to centrate wastewater loadings. **Water Res**, v.88, p.604- 612, 2016.

GENTILI, F.G. Microalgal biomass and lipid production in mixed municipal, dairy, pulp and paper wastewater together with added flue gases. **Bioresour. Technol**, v.169, p.27–32, 2014.

GÓMEZ-CORTÉS, P.; BRENNAN, J.T.; LAWRENCE, P.; FUENTE, M.A. Novel characterisation of minor α -linolenic acid isomers in linseed oil by gas chromatography and covalent adduct chemical ionisation tandem mass spectrometry. **Food Chem**, v.200, p.141–145, 2016.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; RIAÑO-IRAZÁBAL, B.; MOLINUEVO-SALCES, B.; BLANCO, S.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Effect of operational conditions on the degradation of organic matter and development of microalgae–bacteria consortia when treating swine slurry. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 1147-1153, 2011.

GROSS, F. Notes on the culture of some marine organisms. **J. Marine Biol**, v.21, p.753-768, 1937.

GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllidc. **J. Phycol**, v.8, p.10-14, 1972.

HENA, S.; FATIMAH, S.; TABASSUM, S. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. **Water Resour. Ind**, v.10, p.1–14, 2015.

HODAIFA, Gassan; MARTÍNEZ, M^a; SÁNCHEZ, Sebastián. Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 84, n. 10, p. 1550-1558, 2009.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant J.** 54, 621–639, 2008.

HUERLIMANN, R.; NYS, R.; HEIMANN, K. Growth, Lipid Content, Productivity, and Fatty Acid Composition of Tropical Microalgae for Scale-Up Production. **Biotechnol. Bioeng.** v.107, p.246-257, 2010.

JEBALI, A.; ACIÉN, F.G.; GÓMEZ, C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; MHIRI, N.; KARRAY, F.; DHOUIB, A.; MOLINA-GRIMA, E.; SAYADI, S. Selection of native Tunisian microalgae for simultaneous wastewater treatment and biofuel production. **Bioresour. Technol.** v.198, p.424–430, 2015.

KLIGERMAN, D.C.; BOUWER, E.J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renew. Sust. Energ. Ver.** v.52, p.1834-1846, 2015.

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by phenol–sulfuric acid method, In: Hellebust, J.A., Craigie, J.S. (Eds.), *Handbook of Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 96–97, 1978.

KOTHARI, R.; PRASAD, R.; KUMAR, V.; SINGH, D.P. Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoides* grown on dairy industry wastewater. **Bioresour. Technol.** v.144, p.499-503, 2013.

KUMAR, K.S.; DAHMS, H.U.; WON, E.J.; LEE, J.S.; SHIN, K.H. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. **Ecotox. Environ. Safe.** v.113, p.329–352, 2015.

LAKANIEMI, A.-M.; TUOVINEN, O.H.; PUHAKKA, J.A. Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers – a review. **Bioresour. Technol.** v.135, p.222–231, 2013.

LAM, M.K.; LEE, K.T. Renewable and sustainable bioenergies production from oil mill effluents (POME): Win-win strategies toward better environmental protection. **Biotechnol. Adv.** v.29, p.124-141, 2011.

LEVINE, R.B.; COSTANZA-ROBINSON, M.S.; SPATAFORA, G.A. *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. **Biomass Bioenergy.** v.35, p.40–49, 2011.

LI, Y.; CHEN, Y.F.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresour. Technol.** v.102, p.5138–5144, 2011.

LI, Y.; HAN, F.; XU, H.; MU, J.; CHEN, D.; FENG, B.; ZENG, H. Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P). **Bioresour. Technol.** v.174, p.24–32, 2014.

LIN, X.; PASKALEVA, E.E.; CHANG, W.; SHEKHTMAN, A.; CANKI, M. Inhibition of HIV-1 infection in *ex vivo* cervical tissue model of human vagina by palmitic acid; implications for a microbicide development, **PLoS One**, **6**, e24803, 2011.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, v.193, p.265–275, 1951.

MANDAL, S., MALLICK, N. Waste utilization and biodiesel production by the green Microalga *Scenedesmus obliquus*. **Appl. Environ. Microbiol**, v.77, p.374–377, 2011.

MARQUES, S.S.I.; NASCIMENTO, I.A.; ALMEIDA, P.F.; CHINALIA, F.A. Growth of *Chlorella vulgaris* on Sugarcane Vinasse: The Effect of Anaerobic Digestion Pretreatment. **Appl Biochem Biotechnol**, v.171, p.1933–1943, 2013.

MCGINN, P.J.; DICKINSON, K.E.; PARK, K.C.; WHITNEY, C.G.; MACQUARRIE, S.P.; BLACK, F.J.; O'LEARY, S. J. Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode. **Algal Research**, v. 1, n. 2, p. 155-165, 2012.

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.M.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Quim. Nova**, v.13, n.1, p.10-15, 2013.

MOHAN, S.V.; DEVI, M.P.; MOHANAKRISHNA, G.; AMARNATH, N.; BABU, M.L.; SARMA, P.N. Potential of mixed microalgae to harness biodiesel from ecological water-bodies with simultaneous treatment, **Bioresource technology**, v.102, p.1109–1117, 2011.

OLGUIN, E.J. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. **Biotechnol. Adv**, v.30, n.5, p.1031–1046, 2012.

PARK, J.B.K.; CRAGGS, R.J. Effect of algal recycling rate on the performance of *Pediastrum boryanum* dominated wastewater treatment high rate algal pond. **Water Sci. Technol**, v.70, n.8, p.1036 – 1299, 2014.

RAMIREZ, N.N.V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J.O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp. in ethanol vinasse. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v.57, p.630–635, 2014.

SOARES, A.T.; COSTA, D.C.; SILVA, B.F.; LOPES, R.G.; DERNER, R.B.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Comparative analysis of the fatty acid composition of microalgae obtained by different oil extraction methods and direct biomass transesterification. **Bioener. Res**, v.7, p.1035–1044, 2014.

WANG, H.Y., XIONG, H.R., HUI, Z.L., ZENG, X.B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggyery wastewater to produce lipids. **Bioresour. Technol**, v.104, p.215–220, 2012.

WANG, L.; LI, Y.; CHEN, P.; MIN, M.; CHEN, Y.; ZHU, J.; RUAN, R.R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. **Bioresour. Technol**, v.101, p.2623-2628, 2010.

WOERTZ, I.; FEFFER, A.; LUNDQUIST, T.; NELSON, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **J. Environ. Eng**, v.135, p.1115–1122, 2009.

WU, L.F.; CHEN, P.C.; HUANG, A.P.; LEE, C.M. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. **Bioresour. Technol**, v.113, p.14-18, 2012.

WU, Y.H.; HU, H.Y.; YU, Y.; ZHANG, T.Y.; ZHU, S.F.; ZHUANG, L.L.; ZHANG, X.; LU, Y. Microalgal species for sustainable biomass lipid production using wastewater as resource: a review. **Renew. Sustain. Energy Ver**, v.33, p.675–688, 2014.

YAO, L.X.; GERDE, J.A.; LEE, S.L.; WANG, T.; HARRATA, K.A. Microalgae lipid characterization. **J. Agr. Food Chem**, v.63, p.1773–1787, 2015.

ZARROUK, C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. Theises. Faculty of Science. Universite des Paris, 1966.

ZHENG, S.; HE, M.; JIANG, J.; ZOU, S.; YANG, W.; ZHANG, Y.; DENG, J.; WANG, C. Effect of kelp waste extracts on the growth and lipid accumulation of microalgae. **Bioresour. Technol**, v.201, p.80–88, 2016.

ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; XENG, P.; YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. **Water Res**, v.47, p.4294-4302, 2013.

CAPÍTULO 5

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA EM CULTURAS DE MICROALGAS USANDO TÉCNICAS EXTRATIVAS, FTIR E ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

RESUMO

Variações na composição bioquímica das microalgas são espécie-específicas e acontecem de forma dinâmica ao longo dos cultivos. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo acompanhar a evolução do metabolismo celular de microalgas regionais cultivadas em meio sintético e em meio preparado a partir de biocomposto hortifrutis (BH), acompanhando simultaneamente as mudanças nos componentes bioquímicos por métodos extrativos tradicionais e espectrofotometria de infravermelho, contrastando ainda com a assimilação de nitrato e fosfato presentes nos meios. As espécies foram cultivadas em condições controladas, sendo o crescimento acompanhado por meio de contagens celulares. Análises periódicas de absorção de nutrientes foram realizadas, bem como de proteínas, carboidratos, lipídeos e ésteres, tanto por métodos convencionais, quanto por FTIR. O perfil térmico da biomassa também foi analisado durante as fases de crescimento através de analisador térmico simultâneo. Os ensaios evidenciaram um crescimento considerável das três espécies testadas no meio BH, superando, ao final dos cultivos, o crescimento no meio controle. Os dados de FTIR mostraram padrões distintos na biossíntese dos compostos ao longo dos cultivos. Para proteínas, observou-se uma relação direta entre os dados obtidos pela técnica extrativa e as leituras de FTIR na D133WC. Entretanto, na *Chlamydomonas* sp. (D132WC) não foi possível observar relação direta entre as duas técnicas, principalmente para o cultivo controle. Para os carboidratos pôde-se constatar que a cepa D132WC apresentou respostas similares entre as técnicas e os meios utilizados, constatando-se um incremento importante na fase *log* e uma redução acentuada a seguir. As espécies D101Z e D133WC mostraram uma tendência de acumulação dos carboidratos ao longo dos cultivos em ambas as técnicas. A espécie D101Z Controle, apresentou um aumento na concentração lipídica e de éster com teores máximos respectivos de 16,7% e 265,8 mg g⁻¹ na fase estacionária, mas com uma redução após essa fase conforme dados da análise por FTIR. A análise termogravimétrica também apresentou eficácia para analisar a biomassa de microalga entre as diferentes fases de crescimento, por apresentar relação direta entre os valores de perda de massa dos eventos decorrentes da decomposição de proteínas, carboidratos e lipídeos com os teores destes componentes bioquímicos que foram quantificados via método tradicional.

Palavras-chave: composição bioquímica, FTIR, microalgas.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de microalgas para produção de biocombustível e bioprodutos com alto valor agregado vem ganhando globalmente significativa importância, não somente no que concerne aos aspectos de cultivo e extração de produtos de interesse, mas também ao aspecto ambiental. A produção de biomassa por esses organismos pode ser atrelada ao tratamento de águas residuais e à fixação de CO₂, minimizando assim tanto os custos produtivos como os impactos ambientais resultantes do descarte de efluentes no ambiente (KUO et al., 2015; MOHAN et al., 2011).

Na última década, grande parte da atenção biotecnológica das microalgas tem sido focada na produção de biomassa para fins energéticos (FUENTES-GRÜNEWALD et al., 2009; PIGNOLET et al., 2013.; YU e TAKAHASHI, 2007). A produção de proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e metabólitos específicos como os ácidos graxos poli-insaturados (ω -3; ω -6), usados para fins nutracêuticos, antioxidantes, aditivos alimentares, macrolídeos para produção de antibióticos, ficobiliproteínas para utilização biomédica, exopolissacarídeos para cosméticos ou processos de cicatrização também tem merecido a atenção de muitos pesquisadores (GINZBERG et al., 2008; RAPOSO et al., 2013; SANMUKH et al., 2014), além do uso das microalgas na produção de ração animal (PRIYADARSHANI e RATH, 2012).

Entretanto, as diferenças na composição bioquímica das microalgas são dependentes de diversos fatores definidos pelas condições de cultivo, especialmente luz, temperatura e nutrientes disponíveis, que podem influenciar as taxas de crescimento e o ciclo de vida das espécies, fazendo com que o valor da biomassa das microalgas para distintas aplicações biotecnológicas seja dependente de atributos fisiológicos e bioquímicos (ADESANYA et al., 2014; GEORGE et al., 2014; SHARMA et al., 2012).

A escassez de alguns nutrientes, por exemplo, afeta não somente a síntese de alguns compostos; sua exaustão resulta em respostas metabólicas que levam à diminuição da taxa de divisão celular e incremento na síntese de metabólitos secundários, muito embora esta relação seja diferente de espécie para espécie (PROCHÁZKOVÁ et al., 2014; SIDERIUS et al., 1996; YILDIZ et al., 1994).

Algumas estratégias têm sido aplicadas para maximizar o crescimento das microalgas e incrementar mudanças na composição bioquímica. Estas incluem a otimização das composições dos meios, mudanças nos parâmetros físicos e tipos de metabolismo - fototrófico, heterotrófico ou mixotrófico (MATA et al., 2010).

As mudanças bioquímicas são espécie-específicas e estas acontecem de forma dinâmica ao longo dos cultivos. No entanto, a maioria dos estudos que objetivam aplicações tecnológicas, usualmente fornecem valores de lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos graxos apenas para a fase estacionária e em um único meio de cultivo (MARTINEZ-FERNANDEZ et al., 2006; NATRAH et al., 2007; RENAUD et al., 2002;). Isso limita a capacidade de se avaliar os efeitos quantitativos e qualitativos das fases de crescimento e da quantidade de nutrientes na síntese e produtividade de compostos de interesse.

Para a indústria de óleos e biodiesel, por exemplo, é de grande importância avaliar o metabolismo lipídico ao longo dos cultivos, a fim de conhecer qual o melhor momento para a extração da maior quantidade do material contido intracelularmente, maximizando assim a produção e minimizando os custos do processo produtivo (FENG et al., 2005; WIDJAJA et al., 2009), o que também se aplica para outros metabólitos de interesse. Contudo, o dispêndio de tempo e material para extração, que usualmente incluem a utilização de reagentes tóxicos, restringe a utilização dos métodos bioquímicos clássicos de análise no caso de monitoramentos do metabolismo celular de compostos de interesse, ao longo dos ciclos de cultivo.

Uma alternativa promissora para obter registros contínuos dos componentes produzidos pelas microalgas é a espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR (MAYERS et al, 2013;. MIGLIO et al, 2013.; SUN et al, 2014.; WAGNER et al., 2010), por ser este um poderoso método para a identificação de diferentes grupos funcionais (lipídeos, proteínas e carboidratos) pela avaliação das transições entre estados vibratórios das ligações contidas dentro das moléculas (MANDAL et al., 2011;. MISHRA e JHA, 2009). Contudo, há poucas informações sobre a avaliação da composição da biomassa de microalgas em cultivos, usando esta ferramenta, bem como são muito raros trabalhos comparativos desse método com os procedimentos convencionais usualmente adotados na análise desses compostos.

A análise termogravimétrica complementarmente à técnica de FTIR fornece informações sobre a decomposição térmica da biomassa pelo acompanhamento da perda de massa dos componentes em faixas de temperaturas conhecidas (ORFAO et al., 1999; VAMVUKA e SFAKIOTAKIS, 2011), podendo também se constituir uma ferramenta propícia para indicar a acumulação de determinados componentes bioquímicos em cultura de microalgas, através de seu comportamento térmico.

As vantagens destes métodos em relação aos tradicionais de análise da composição bioquímica concentram-se nos menores tempos requeridos para as análises e na menor

quantidade de amostra necessária, além de não serem necessárias etapas de extração ou pré-tratamento das amostras.

Este estudo teve como objetivo acompanhar as mudanças na composição bioquímica de espécies regionais de microalgas nas diferentes fases da curva de crescimento, usando os métodos extrativos tradicionais, espectrofotometria de infravermelho e análise termogravimétrica, contrastando com a assimilação de nitrato e fosfato presente nos meios.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção de espécies de microalgas e condições de cultivo

Três espécies de microalgas dulcícolas isoladas da Região Nordeste do Brasil foram selecionadas do banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB): *Chlamydomonas* sp. (D132WC), isolada da Cachoeira da Purificação, Bahia; *Lagerheimia longiseta* (D133WC), isolada do Açude Malhada Limpa, Rio Grande do Norte, ambas mantidas em meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) e *Chlorella* sp. (D101Z), isolada da ETE Mangabeira, João Pessoa, Paraíba, mantida em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966). Essas espécies foram escolhidas por apresentarem teores de ésteres superiores aos da soja (CALIXTO et al., 2016).

As espécies selecionadas foram cultivadas em extrato de biocomposto hortifrutis (BH) preparado a partir da compostagem de restos de legumes e verduras descartados durante a comercialização pela EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas), localizada no município de João Pessoa. A preparação deste meio baseou-se no procedimento descrito por Erd-Schreiber modificado (GROSS, 1937), onde a 1 kg do biocomposto foi adicionado 1L de água destilada, seguido de aquecimento por 30 minutos em autoclave, com posterior filtração e esterilização, sendo os extratos mantidos sob refrigeração, em condição estéril. A preparação deste meio consistiu da adição em água destilada autoclavada do extrato na concentração de 10 mL L⁻¹ e de soluções de nitrato e fosfato nas proporções de 1 mL L⁻¹, seguido do ajuste do pH para neutralidade (GROSS, 1937). Como controle (C) utilizaram-se os meios sintéticos nos quais as espécies vêm sendo mantidas no banco de cultura.

As espécies foram cultivadas em recipientes com 18 litros de meio de cultura, numa câmara de cultivo a 25±1 °C, com sistema de iluminação de 150 μmol.fótons.cm⁻².s⁻¹,

fotoperíodo de 12 horas e aeração por injeção contínua de ar a pressão ambiente ($2,0 \text{ mL min}^{-1}$) usando um minicompressor de membrana Resun AOC2.

O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por meio de contagens celulares em câmaras de Fuchs Rozenthal em microscópio binocular Leica e através de medidas da fluorescência *in vivo* usando um fluorômetro Turner Design 10005R para a determinação das curvas de crescimento.

2.2 Remoção de nutrientes e composição bioquímica das microalgas nas condições de cultivo estabelecidas

A absorção de nutrientes pelas três espécies de microalgas cultivadas no meio controle e em extrato de biocomposto foi analisada a cada dois dias, através das determinações de nitrato (método do ácido fenoldissulfônico) e fosfato (método do ácido ascórbico), segundo as recomendações do Standard Methods (APHA, 1998).

Proteínas, carboidratos, lipídeos e ésteres foram analisados no início da fase log, na fase log e na fase estacionária quando os cultivos foram interrompidos. As proteínas foram quantificadas segundo o método de Lowry et al., (1951), usando albumina bovina como padrão; os carboidratos foram analisados pelo método adaptado de Kochert (1978), empregando-se glicose como padrão; os lipídeos totais foram obtidos por gravimetria, de acordo com metodologia adaptada de Folch et al., (1957). Os ésteres de ácidos graxos foram quantificados segundo o procedimento de transesterificação direta da biomassa adaptado para microescala, conforme Menezes et al., (2013).

Análises dos indicativos lipídicos, de proteínas e de carboidratos por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), segundo Pistorius et al., (2009), foram efetuadas em amostras de biomassa retiradas a cada quatro dias dos cultivos. A biomassa foi concentrada em centrífuga refrigerada a 18°C , congelada em ultrafreezer (-30°C) e liofilizada a -40°C . A biomassa seca de cada espécie foi pulverizada e misturada com KBr para formação da pastilha e realização da análise, seguindo as recomendações de Meng et al., (2014) e Isleten-Hosoglu et al., (2013), onde foi utilizado um espectrofotômetro modelo IR PRESTIGE-21 (Shimadzu®) por transformada de Fourier, na faixa de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$.

2.3 Análise termogravimétrica da biomassa de *Chlamydomonas* sp.

As curvas termogravimétricas (TG/DTA) foram efetuadas apenas na biomassa de *Chlamydomonas* sp e em três momentos da curva de crescimento (início da fase log, fase log e fase estacionária), usando um analisador térmico simultâneo da Shimadzu®, modelo DTG-60H, em condições não-isotérmicas. Foram utilizadas cerca de 10 mg de amostra em cadinho de platina, com atmosfera de ar sintético e taxa de fluxo de 50 mL min⁻¹. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10 °C min⁻¹, no intervalo de temperatura de 25-600 °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características físicas e químicas do extrato de biocomposto

O extrato de biocomposto apresentou valores de pH de 6,8, baixa turbidez e elevada concentração de sólidos totais dissolvidos que corroboram com o alto valor de condutividade elétrica (Tabela 5.1). Os teores de nitrato correspondem ao dobro do fosfato. Sendo que esse valor de fosfato é extremamente superior aos dos meios sintéticos utilizados como controle (2,8 e 12,6 mg L⁻¹, respectivamente para o meio WC e Zarrouk).

Tabela 5.1 – Análises físicas e químicas do extrato de biocomposto hortifrutis.

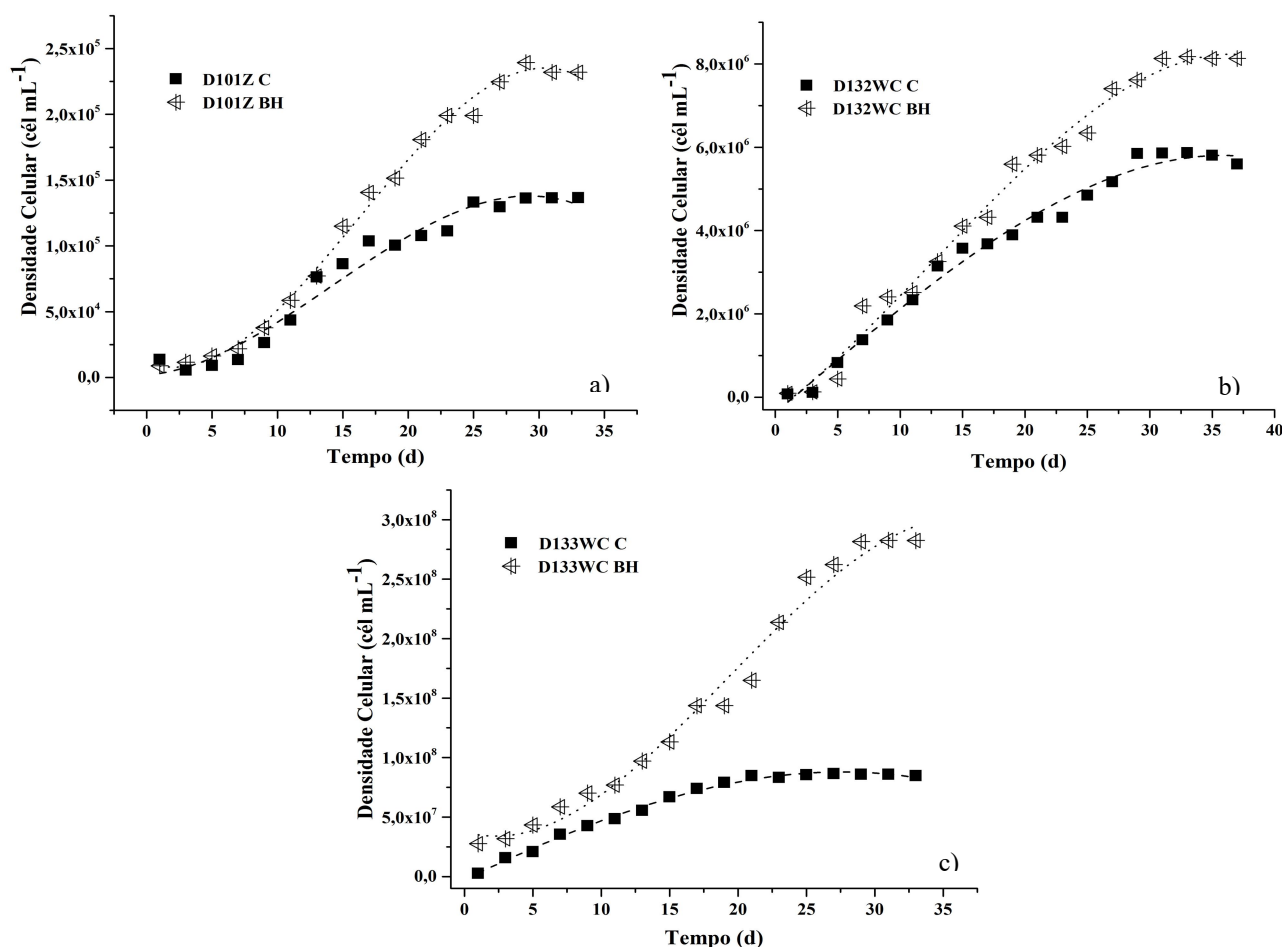
Parâmetros	Valores
pH	6,8
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	63,7
NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,475
NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	1,3
PO ₄ ⁻ (mg L ⁻¹)	31,6
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	62
Condutividade elétrica (mS cm ⁻¹)	0,374
Sólidos totais dissolvidos (mg L ⁻¹)	243
Turbidez (NTU)	4,40
DQO (mg O ₂ L ⁻¹)	208

3.2 Crescimento das espécies e remoção de nutrientes nas condições testadas

Os ensaios evidenciaram um crescimento considerável das três espécies testadas no extrato de biocomposto, superando, ao final dos cultivos, o crescimento no meio controle. O

maior rendimento foi observado em *Lagerheimia longiseta* ($>3,0 \times 10^8$ células/L), valor este que é superior em cerca de 100x aos obtidos nas outras duas espécies (Figura 5.1). Comparado ao controle, o crescimento desta espécie em BH acentuou-se a partir do 13º dia, atingindo ao final do cultivo um rendimento celular 3x maior. A espécie *Chlorella* sp. apresentou crescimento similar nas duas condições de cultivos até o 13º dia, porém em seguida o crescimento foi muito mais acentuado em BH, chegando ao final do cultivo com aproximadamente o dobro do rendimento celular observado no meio controle. O crescimento de *Chlamydomonas* sp. também foi similar nos dois meios testados até o 14º dia, acentuando-se em seguida em BH, atingindo ao final do cultivo um rendimento celular de aproximadamente 30% maior do registrado no controle. Os maiores valores do k calculado foram observadas em *L. longiseta* (1,4 divisões/dia) e *Chlorella* sp. (0,67 divisões/dia) em extrato de biocomposto (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Curvas de crescimento da *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp. e *Lagerheimia longiseta* em meio sintético e biocomposto.



As quantificações de nitrato e fosfato efetuadas nos cultivos na fase exponencial e ao término dos experimentos mostraram diferenças entre as espécies na assimilação desses nutrientes, com maiores taxas de remoção nos cultivos controle, porém isso não foi uma regra. Para o nitrato, a remoção foi maior no frasco controle na fase exponencial, muito embora em extrato de biocomposto a absorção desse nutriente tenha sido expressiva, com valores de remoção entre 62,13% na espécie D101Z a 73,95% na espécie D132WC. Ao final do cultivo, no entanto, todas as espécies haviam removido praticamente 100% do teor de nitrato nas condições testadas, exceto na espécie D101Z cuja remoção chegou aproximadamente a 90% em BH. Para o fosfato as diferenças foram muito marcantes na fase exponencial, com absorção maior no extrato de biocomposto em D101Z e D133WC quando comparada ao cultivo controle (82,3% contra 67,24% e 77% contra 45%, respectivamente). A espécie D132WC, por sua vez, mostrou menor taxa de absorção de fosfato na fase exponencial em BH, do que no controle. Ao final do cultivo as espécies haviam reduzido acima de 95% dos teores de fosfato, exceto em D133BH, cuja redução chegou a 100% (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Remoção de nutrientes, pelas microalgas estudadas, ao longo da fase *log* e ao final dos cultivos nas condições testadas.

Espécie estudada	% Remoção NO_3^-		% Remoção PO_4^-	
	Fase log	Fase estacionária	Fase log	Fase estacionária
D101Z C	84,3	99,0	67,2	95,4
D101Z BH	62,1	89,4	82,3	96,1
D132WC C	94,3	99,4	93,3	97,9
D132WC BH	73,9	99,4	51,9	99,6
D133WC C	85,5	99,8	45,0	99,4
D133WC BH	67,1	99,6	77,0	100,0

Os dados obtidos para os cultivos em BH demonstram que as três espécies estudadas crescem muito bem neste tipo de meio, evidenciando que esse efluente pode ser utilizado em cultivos em massa para produzir concentrados de microalgas. A eficiência na remoção de nutrientes por essas espécies, em extrato de biocomposto, indica que estas também podem ser utilizadas para reduzir cargas de nutrientes de outros tipos de águas residuais, podendo assim gerar biomassa de menor custo destinada à produção de biodiesel e co-produtos (JI et al., 2013). As diferenças observadas nos padrões de assimilação de nutrientes entre as espécies,

particularmente durante a fase exponencial, podem refletir na composição bioquímica de cada espécie e, por conseguinte, nos padrões das curvas de FTIR obtidas. Ressalta-se, ainda, que as culturas não eram axênicas, de maneira que algumas das diferenças observadas podem estar associadas à presença de bactérias.

A efetividade de remoção de nutrientes em meios alternativos em cultivos de microalgas também já foi demonstrada com outros tipos de efluentes (LIM et al., 2010). Cho et al. (2011) constataram que *Chlorella* sp. cultivada em águas municipais residuais mostrava um poder de absorção de 92,1% de nitrogênio e 93,3% de fósforo após 9 dias de cultivo. Outras espécies de microalgas apontadas como promissoras para produção de biodiesel, também apresentam crescimento acentuado e altas taxas de assimilação de nitrogênio e fósforo em meios alternativos (CHINNASAMY et al., 2010). Woertz et al., (2009), por exemplo, cultivaram um mix das espécies *Actinastrum*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Spirogyra*, *Nitzschia*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Chlorococcum*, *Closterium* e *Euglena* em efluentes de laticínios diluído a 10% obtendo biomassa com concentração de 0,5 g L⁻¹.

3.3 Resultados das análises da composição bioquímica das espécies cultivadas por técnicas extrativas e FTIR

Os espectros de FTIR de *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp. e *Lagerheimia longiseta* cultivadas em meio sintético e em BH, obtidos a cada quatro dias de cultivo, apresentaram bandas características de grupos de macromoléculas como os relatados por Mayers et al. (2013) e Miglio et al., (2013).

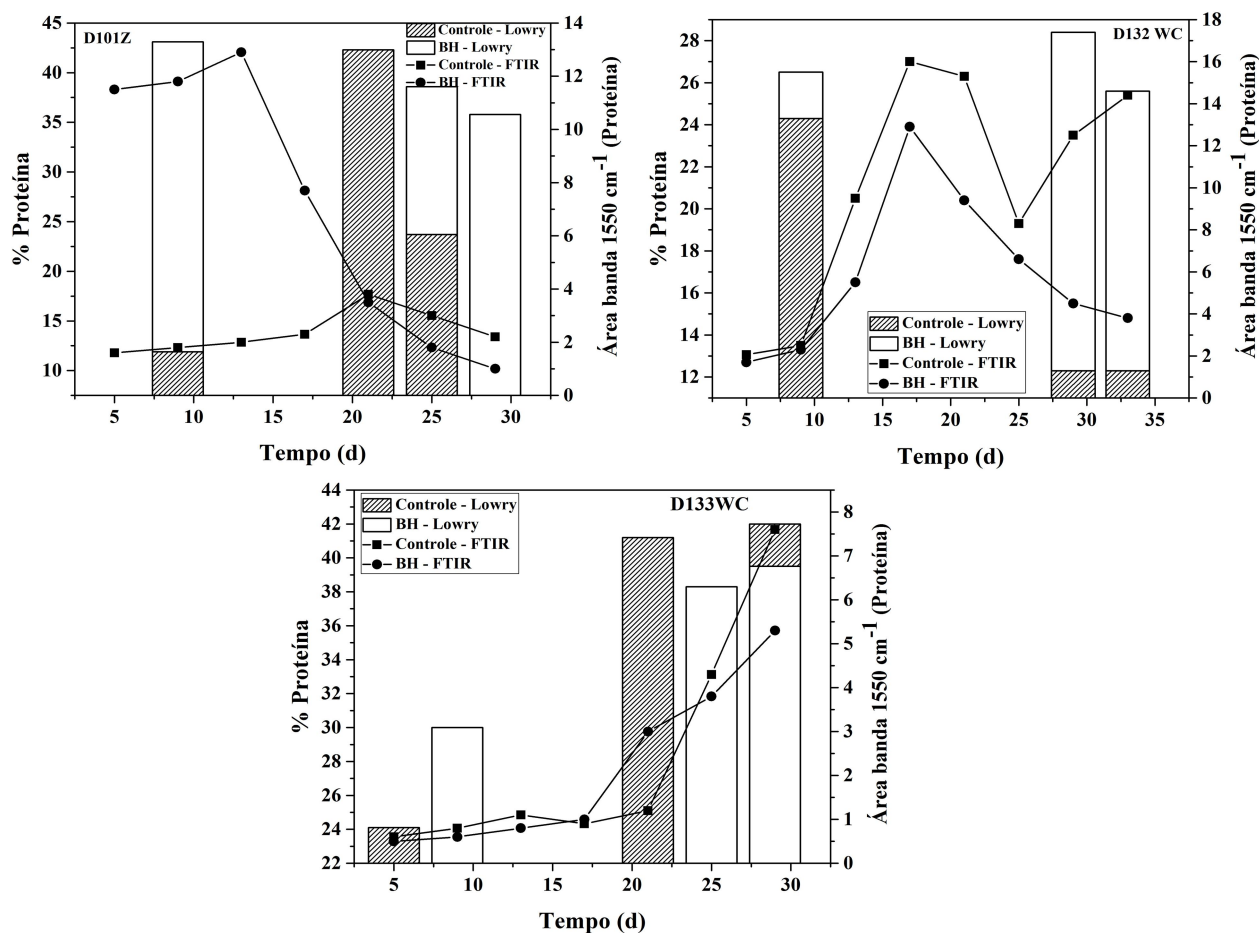
As principais atribuições nas regiões do espectro de absorção do infravermelho das amostras foram em 3000-2800 cm⁻¹ referente ao estiramento C-H de lipídeos, 1650 cm⁻¹ do estiramento C=O de amidas associadas a proteínas (amida I), 1550 cm⁻¹ indicativo da deformação de N-H de amidas de proteínas (amida II), 1455 cm⁻¹ das deformações assimétricas de CH₃ e CH₂ de proteínas, 1230 cm⁻¹ do estiramento assimétrico de P=O de fosfodiéster de ácido nucléico e 1200-900 cm⁻¹ do estiramento C-O-C de polissacarídeos (carboidratos) (SILVERSTEIN et al., 2007). Destas, três bandas (2930, 1050 e 1550 cm⁻¹) foram utilizadas para acompanhar a acumulação dos lipídeos, carboidratos e proteínas, respectivamente, contrastando com os métodos convencionais de análise.

Os dados de FTIR mostraram padrões distintos na biossíntese desses compostos, variando ao longo dos cultivos, com comportamentos que podem ser semelhantes no controle

e em extrato de biocomposto como em D133WC (proteínas e carboidratos), ou diferentes entre as duas condições nas demais espécies, para proteínas, carboidratos e lipídeos. Quando comparados com os valores obtidos pelos métodos convencionais de análise extrativa, os valores de lipídeos, carboidratos e proteínas determinados nas fases log e estacionária mostraram, em muitas ocasiões, respostas similares aos valores das três bandas de absorção do infravermelho utilizadas para acompanhar a acumulação intracelular desses compostos.

Para proteínas, Figura 5.2, observa-se uma relação direta entre os dados obtidos pela técnica extrativa e as leituras de FTIR na espécie D133WC, com valores crescentes nas fases log e estacionária. Em *Chlorella* sp. (D101Z) os valores de FTIR no meio BH diminuíram de forma mais acentuada da fase log para a estacionária do que os valores desse composto registrados pelo método extrativo, porém no controle seguiram o padrão observado pela técnica extrativa. Na D132WC não é possível observar relação direta entre as duas técnicas, principalmente para o cultivo controle.

Figura 5.2 – Acompanhamento da acumulação de proteínas durante o cultivo das microalgas estudadas.

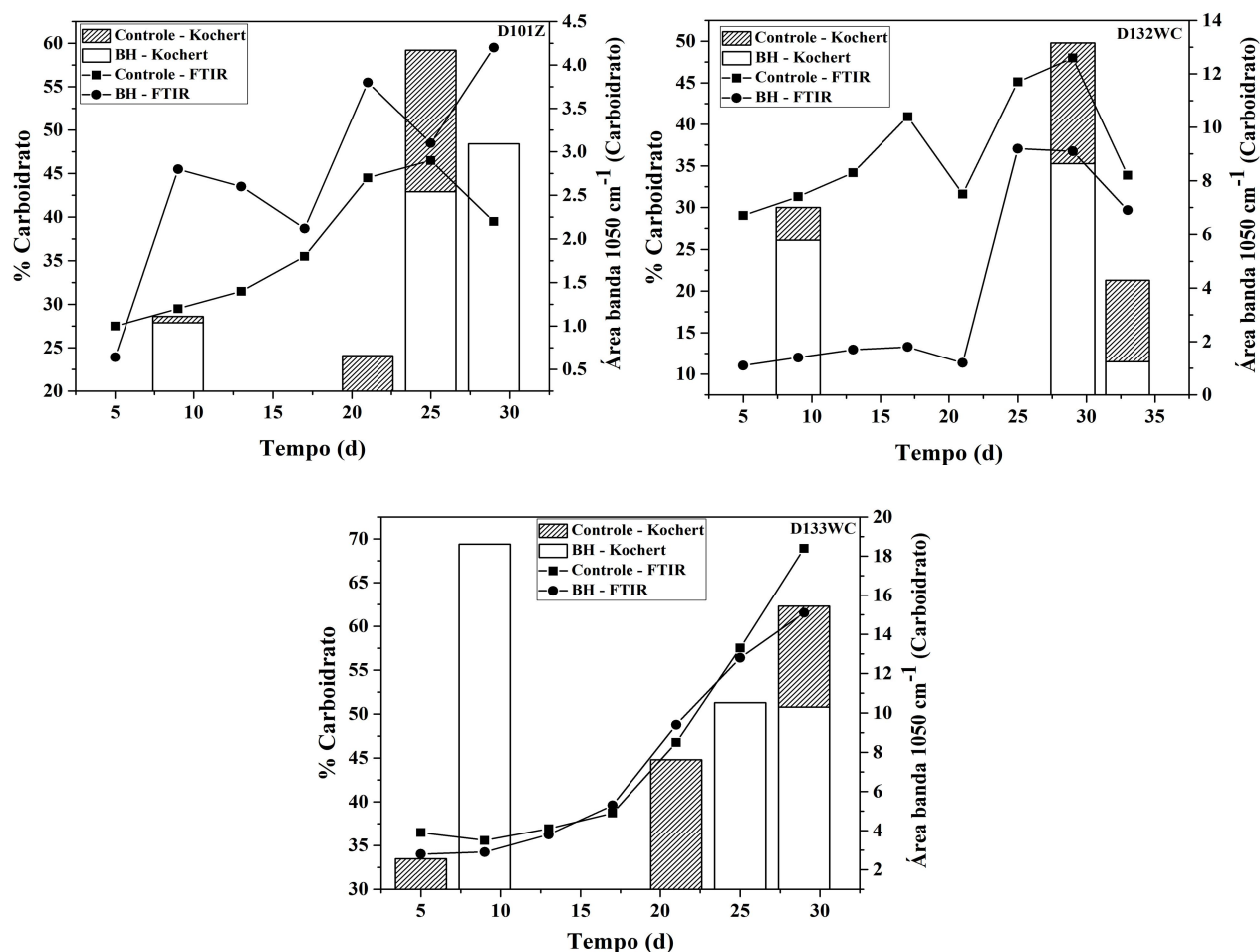


Esses achados demonstram que não há como prever e apontar regras de acumulação das proteínas, visto que uma mesma espécie apresenta concentrações e tendências distintas ao variar o meio de cultivo. No entanto, apesar das divergências em alguns resultados apreende-se que as variações na síntese de proteínas, ao longo dos cultivos, podem ser monitoradas pela técnica de FTIR, tornando rápida a análise. Variações nos valores de proteínas em resposta ao tempo de cultivo também foram registrados em diferentes graus na microalga *Tribonema* sp., por Wang et al. (2014).

A redução drástica de proteína na espécie D101Z BH na fase log parece relacionar-se com a intensa absorção de nitrato e fosfato nessa fase, o que também ocorre na espécie D132WC que apresentou em ambos os cultivos, um decréscimo acentuado nas proteínas ainda na fase log quando os teores de fosfato e nitrato já haviam sido praticamente esgotados dos meios. Esses achados corroboram com Fuentes-Grunewald et al., (2015) quando o mesmo acompanhou o cultivo de *Porphyridium purpureum* por FTIR.

Para os carboidratos, pode-se constatar que a cepa D132WC apresentou respostas similares entre as técnicas e os meios utilizados, constatando-se um incremento importante na fase *log* e uma redução acentuada a seguir, quando os menores teores foram registrados (21,3% e 11,5%, respectivamente, para o controle e para o meio BH). As espécies D101Z e D133WC, por sua vez, também mostraram uma tendência de acumulação dos carboidratos ao longo dos cultivos, com valores crescentes de FTIR e da porcentagem de carboidrato determinada pela técnica extrativa nas fases log e ao final dos cultivos (Figura 5.3).

Figura 5.3 – Acúmulo de carboidratos durante o crescimento das três cepas

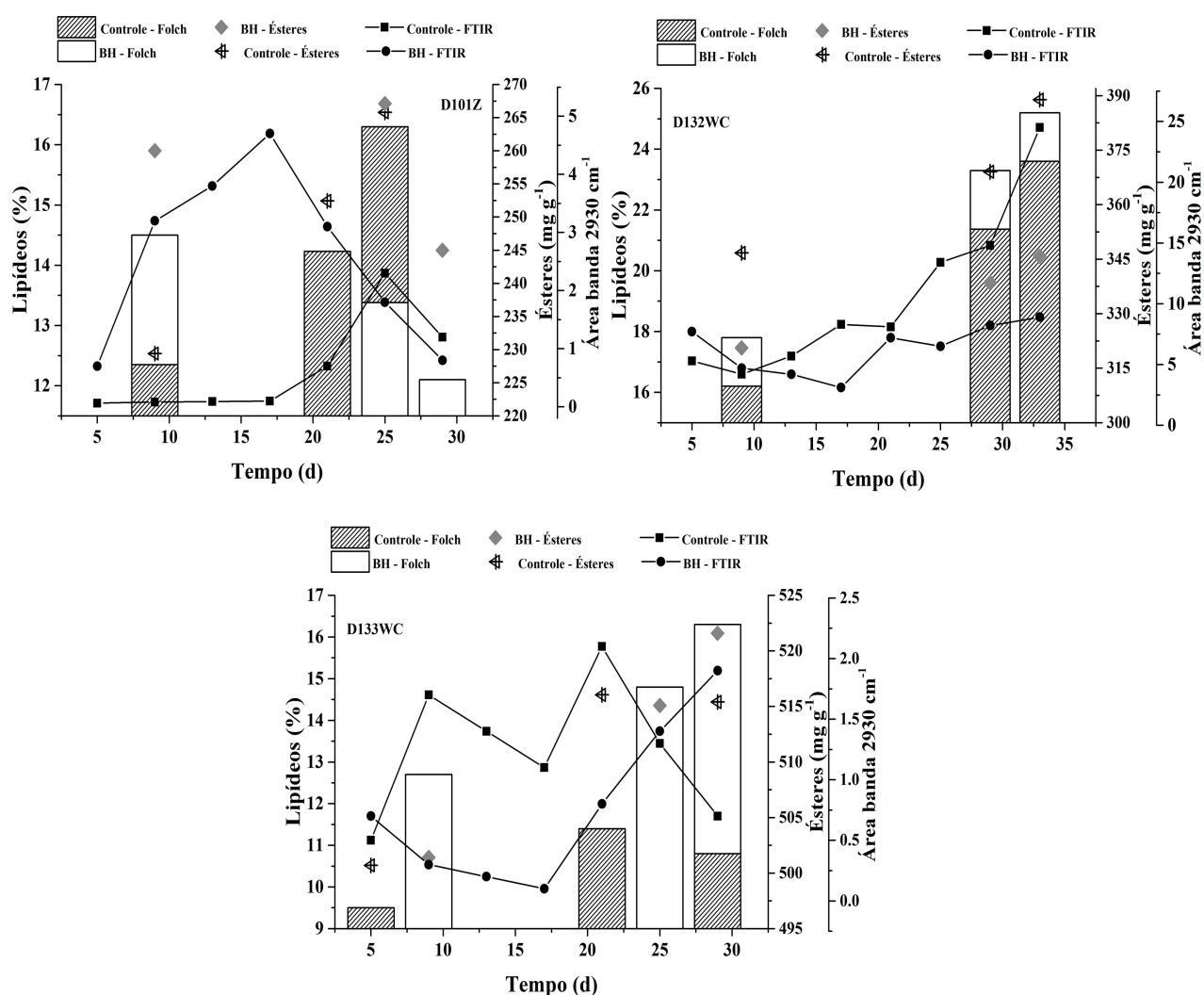


Esses dados corroboram com os de Viçose et al., (2012) quando avaliaram padrões de crescimento e variações na composição bioquímica em *Proschkinia* sp., *Nitzschia* sp., e *Amphora* sp., pertencentes ao grupo das diatomáceas, e constataram que estas espécies apresentaram maior teor de carboidratos na fase estacionária (19-27%). Mas isso não parece ser uma regra, porque os mesmos autores observaram que *Navicula incerta* apresentava o maior valor desse metabólito (27,2%) na fase logarítmica.

No que concerne ao metabolismo lipídico e de ésteres nas microalgas estudadas, observou-se uma relação direta nos resultados das duas técnicas de análises empregadas para todas as espécies (Figura 5.4), com diferenças no acúmulo de lipídeos nas fases log e estacionária. Para a espécie D101Z C (controle), por exemplo, observa-se um aumento na concentração lipídica e de éster com teores máximos respectivos de 16,7% e 265,8 mg g⁻¹ na fase estacionária, mas com uma redução após essa fase conforme dados da análise por FTIR. Enquanto que para a amostra em meio BH se observa os maiores teores quando o cultivo

ainda estava na fase log, declinando a seguir na fase estacionária, corroborando esses dados com os resultados obtidos pela técnica extrativa. Na espécie *Lagerheimia longiseta* (D133WC) foram observados aumento e reduções no teor lipídico durante os cultivos na amostra controle, mas no frasco contendo extrato de biocomposto o padrão obtido pela técnica do FTIR seguiu o observado pela técnica extrativa, com aumento progressivo nos teores de lipídios até a fase estacionária.

Figura 5.4 – Lipídeos e ésteres acompanhados durante as fases de cultivo por métodos convencionais e por FTIR



A espécie D132WC (*Chlamydomonas* sp.), por sua vez, apresentou dados contrastantes das demais espécies, com acúmulo progressivo de éster e de lipídeos ao longo dos cultivos detectado pelas duas técnicas de análise empregadas. Esses achados corroboram

com os padrões disseminados na literatura, de que com o aumento da idade da cultura ocorre aumento na síntese de lipídeos devido à limitação de nutrientes, principalmente nitrogênio (HU et al., 2008; XU et al., 2008). Entretanto, tal assertiva parece não ser uma regra geral dentre as microalgas, razão pela qual é mais coerente considerar que as respostas do metabolismo lipídico são espécies específicas, ou seja, são características individualizadas de cada espécie em cada condição de cultivo, uma vez que Huerlimann et al., (2010), demonstraram que as *Rhodomonas* sp. e *Isochrysis* sp. cultivadas em distintos meios sintéticos apresentavam maior conteúdo lipídico durante e no final da fase logarítmica de crescimento. Este padrão provavelmente é um reflexo de respostas bioquímicas específicas de espécies induzidas pelos diferentes meios de crescimento, ratificando no caso deste trabalho, os valores obtidos para a D133WC Controle e D101Z BH.

Como não há padrão único de acúmulo de lipídeos para todas as espécies, percebe-se que algumas apresentam variações pouco expressivas no decorrer do cultivo, diferentemente do que ocorre para os carboidratos que também se constituem como substância de reserva, corroborando com os estudos de Wang et al., (2014) e Cakmak et al., (2012). Essa potencial concorrência entre a síntese de lipídeos e carboidratos se constitui como um importante fator para a tomada de estratégias pela indústria de biocombustíveis. Lipídeos de microalgas são utilizados para a produção de biodiesel, enquanto que os carboidratos são excelentes substratos para produção de bioetanol (CHOI et al., 2010).

A quantidade de nutrientes presentes nos meios de cultivo é evidentemente o maior responsável pelas modificações metabólicas das microalgas. Neste estudo pode-se inferir que para grande parte das espécies, a síntese de lipídeos e carboidratos se relaciona com a disponibilidade de nitrogênio e fósforo do meio, a exemplo da D132WC Controle que demonstrou incremento acentuado nos índices lipídicos a partir do 13º dia quando o decaimento de nutrientes chega a 78,7% de nitrato e 71,9% de fosfato. Além da D132WC BH que tem um acréscimo considerável de lipídeos e carboidratos após o 17º dia, contrastando com a redução das proteínas e declínio acentuado de nitrato e fosfato.

O esgotamento de nutrientes, como foi visto geralmente se associa com o aumento das frações lipídicas, principalmente os triacilglicerídios (TAG). Essa síntese de TAG ajuda a dissipar o excesso de energia fotossintética e, por ser esta uma molécula de armazenamento, utiliza essa energia armazenada para manter os requisitos metabólicos específicos para o crescimento celular (FUENTES-GRÜNEWALD et al, 2012.; LI et al., 2008).

Atualmente, a estratégia de esgotamento de nutrientes é amplamente usada, a fim de se obter concentrações mais elevadas de lipídeos e/ou carboidratos em diversas espécies de

microalgas visando incrementar a produtividade do cultivo e reduzir os custos de produção (CONVERTI et al., 2009; FUENTES-GRÜNEWALD et al., 2013.; LI et al., 2008).

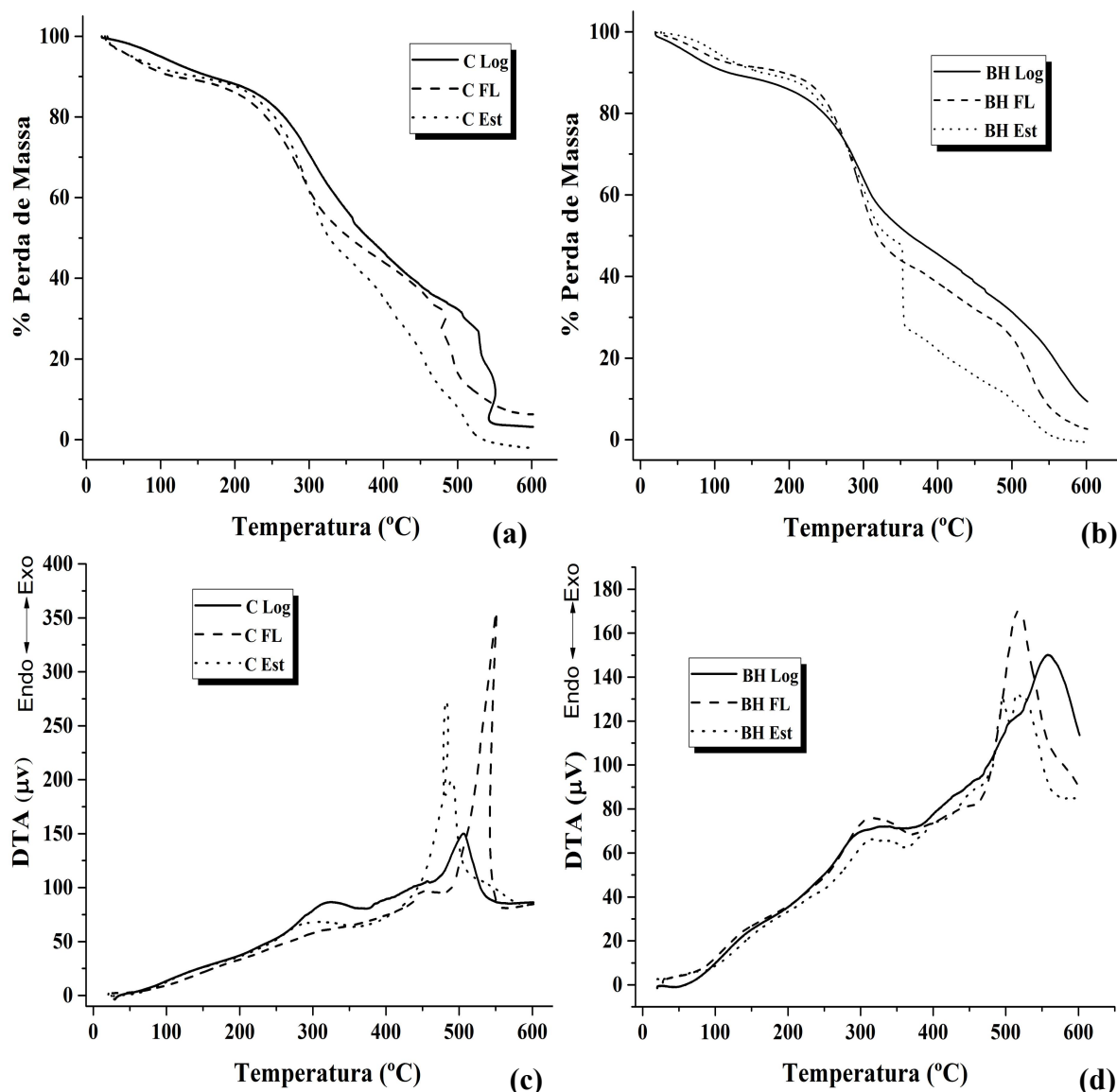
De forma geral, o acompanhamento de componentes bioquímicos por FTIR demonstra eficácia e rapidez (GIORDANO et al., 2001; PISTORIUS et al., 2009) e boa relação com os métodos convencionais de análise. Tendo ainda como vantagem a não necessidade de uso de metodologias laboriosas que fazem uso de reagentes tóxicos, como as tradicionalmente utilizadas. E como os espectros de FTIR de microalgas são espécies-específicas é ainda possível utilizar essa técnica como uma ferramenta adicional para suporte na identificação de espécies (DOMENIGHINI e GIORDANO, 2009).

3.4 Perfil Térmico da biomassa da microalga *Chlamydomonas* sp. durante cultivo

As curvas de perda de massa das amostras de biomassa da espécie *Chlamydomonas* sp. apresentaram, em todas as fases de crescimento e nos dois meios testados, quatro eventos térmicos (Figura 5.5).

O primeiro, variando de 28-144 °C, corresponde a processos de desidratação, devido à presença da água na forma livre e/ou fracamente ligada a biomoléculas (ZOU et al., 2010; PENG et al., 2001). O segundo (127-319 °C), está relacionado a um processo de volatilização, incluindo despolimerização e descarboxilação, atribuído principalmente à decomposição térmica de carboidratos e proteínas (RIZZO et al., 2013), o qual se constitui como um dos principais eventos de perda de massa, especialmente porque estes dois componentes são encontrados em quantidades elevadas na microalga em estudo, principalmente no que concerne aos carboidratos.

Figura 5.5 – Curvas TG/DTA de amostras de biomassa provenientes do cultivo de *Chlamydomonas* sp. em meio sintético (a,c) e biocomposto hortifrutis (b,d).



A terceira etapa (326-474 °C) que para alguns autores se constitui como um segundo estágio do segundo evento térmico, também está relacionada à decomposição de proteínas e carboidratos presentes na microalga. No quarto evento, que pode variar de 459-544 °C têm-se a decomposição do material lipídico, principalmente triglicerídeos (MARCILLA et al., 2009; RIZZO et al., 2013), sendo demarcado por um pico menos evidente no gráfico pela menor concentração desse material em relação aos demais componentes bioquímicos analisados. Para a amostra BH, fase log, a quarta etapa de decomposição se encontra na faixa de 525-602

°C que pode ser atribuída à decomposição de materiais carbonáceos presentes nos resíduos sólidos. (LIU et al., 2002; RIZZO et al., 2013).

As curvas de DTA, Figura 5.5c-d, apresentaram de forma geral um ligeiro pico endotérmico durante a primeira etapa de perda de massa, corroborando com o processo de desidratação da biomassa. A segunda e terceira etapa, observadas na TG, resultam em apenas um pico exotérmico do processo de decomposição das proteínas e carboidratos. Um último evento exotérmico variando nas amostras entre 480-550 °C é atribuído à decomposição de lipídeos e produtos decorrentes desse processo. Os dados obtidos corroboram com os relatados por Agrawal e Chakraborty, (2013).

Ao analisar as amostras entre as diferentes fases de crescimento das microalgas, constata-se que existe uma relação direta entre os valores de perda de massa dos eventos decorrentes da decomposição de proteínas, carboidratos e lipídeos com os teores destes componentes bioquímicos que foram quantificados via método tradicional. É visível em ambos os meios, um decaimento na curva termogravimétrica durante o decorrer das fases de crescimento, principalmente em temperaturas superiores a 400 °C relacionado à decomposição lipídica. Assim, tem-se um aumento gradual de perda de massa entre as fases de crescimento da microalga corroborando com o aumento dos lipídeos obtidos por gravimetria.

Quando se soma os teores de carboidratos e proteínas - já que a síntese de carboidrato pode estar associado à diminuição das proteínas - também se observa que os percentuais de perda de massa nas etapas 2 e 3 seguem o mesmo padrão para as análises extrativas (Tabela 5.3). Esses dados também sugerem a possibilidade de acompanhamento da acumulação bioquímica na biomassa de microalgas através de análises termogravimétricas.

Tabela 5.3 – Dados termogravimétricos da biomassa de *Chlamydomonas* sp. obtida do cultivo em meio sintético e BH e em diferentes fases de crescimento.

Amostra	Eventos Térmicos	ΔT (°C)	Δm (%)
D132C Log	1	28 - 127	8,9
	2	127-326	40,5
	3	326-476	37,2
	4	476-544	13,4
D132C FL	1	60-144	10,7
	2	256-319	27,7
	3	358-370	25,0
	4	528-543	28,8
D132C Est	1	37-96	10,9
	2	234-312	36,5
	3	398-474	13,6
	4	478-490	29,2
D132BH Log	1	44-100	10,7
	2	249-318	37,9
	3	459-463	15,1
	4	525-602	21,3
D132BH FL	1	75-106	11,9
	2	260-316	36,7
	3	352-353	28,4
	4	493-543	18,7
D132BH Est	1	52-86	9,8
	2	259-317	46,2
	3	379-388	8,4
	4	493-544	29,2

4. CONCLUSÕES

Todas as espécies testadas apresentaram bom crescimento em cultivos com meios oriundos de biocompostagem, por demonstrarem melhor desempenho quando comparado aos meios sintéticos, principalmente a espécie *Lagerheimia longiseta*. As espécies também apresentaram elevadas taxas de remoção de nitrato e fosfato dos meios, o que possibilita o uso das mesmas em processos de biorremediação.

A partir deste estudo, constatou-se que não há como prever e apontar regras de acumulação das proteínas e carboidratos durante as fases de crescimento, visto que uma mesma espécie apresenta concentrações e tendências distintas ao variar o meio de cultivo, devido a variações nos teores de nitrogênio e fósforo, principalmente. O que sinaliza a

necessidade real do acompanhamento da síntese desses compostos para assegurar o melhor momento para coleta da biomassa com o teor máximo do componente bioquímico desejado.

A técnica de FTIR demonstrou eficiência no acompanhamento do acúmulo dos principais componentes bioquímicos da biomassa, principalmente dos lipídeos, que apresentou para todas as amostras uma relação direta com a técnica convencional. As divergências encontradas entre alguns resultados mostram que as respostas metabólicas relacionadas à síntese dos componentes bioquímicos são específicas de cada espécie e dependem das condições de cultivo.

A análise termogravimétrica também apresentou eficácia para análise da biomassa de microalga entre as diferentes fases de crescimento, por apresentar relação direta entre os valores de perda de massa dos eventos decorrentes da decomposição de proteínas, carboidratos e lipídeos com os teores destes componentes bioquímicos que foram quantificados via método tradicional.

Os resultados de FTIR e das análises termogravimétricas abrem caminho para novas pesquisas a respeito, sugerindo que essas técnicas, por serem mais rápidas e não necessitarem de reagentes químicos tóxicos e elevadas quantidades de biomassa podem, de fato, serem utilizadas para o monitoramento de produtos de interesse em cultivos em massa para propósitos tecnológicos de utilização das microalgas.

REFERÊNCIAS

- ADESANYA, V.O.; DAVEY, M.P.; SCOTT, S.A.; SMITH, A.G. Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. **Bioresource technology**, v.157, p.293-304, 2014.
- AGRAWAL, A.; CHAKRABORTY, S. A kinetic study of pyrolysis and combustion of microalgae *Chlorella vulgaris* using thermo-gravimetric analysis. **Bioresour Technol**, v.128, p.72-80, 2013.
- APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American public health Association. American Water Works Association, **Water Environmental Federation**, 20th ed. Washington, 1998.
- CAKMAK, T.; ANGUN, P.; DEMIRAY, Y.E.; OZKAN, A.D.; ELIBOL, Z.; TEKINAY, T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnol Bioeng**, v.109, p.1947–1957, 2012.

CALIXTO, C. D.; SILVA, R.P.; SILVA, E. V.; MELO, M. A. R.; ANTONIOSI FILHO, N. R. ; COSTA, C. F. ; CONCEIÇÃO, M.M ; SASSI, R. . Bioprospecção em algumas espécies de microalgas do Nordeste do Brasil em relação ao seu uso potencial para produção de biodiesel. **Revista de Química Industrial**, v. 752, p. 67-77, 2016.

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, R. W.; DAS, K.C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresour. Technol**, v.101, n.9, p.3097-3105, 2010.

CHO, S.; LUONG, T.T.; LEE, D.; OH, U.-K.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresour. Technol**, v.102, p.8639–8645, 2011.

CHOI, S.P.; NGUYEN, M.T.; SIM, S.J. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Bioresour Technol**, v.101, p.5330–5336, 2010.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A.A.; ORTIZ, E.Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chem. Eng. Process**, v.48, p.1146–1151, 2009.

DOMENIGHINI, A.; GIORDANO, M. Fourier transform infrared spectroscopy of microalgae as a novel tool for biodiversity studies, species identification, and the assessment of water quality. **J. Phycol**, v.45, p.522–531, 2009.

FENG, F.Y.; YANG, W.; JIANG, G.Z.; XU, Y.N.; KUANG, T.Y. Enhancement of fatty acid production of *Chlorella* sp.(Chlorophyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. **Process biochemistry**, v.40, n.3, p.1315-1318, 2005.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem**, v.226, p.497–509, 1957.

FUENTES-GRUNEWALD, C.; GARCES, E.; ALACID, E.; ROSSI, S.; CAMP, J. Biomass and lipid production of dinoflagellates and raphidophytes in indoor and outdoor photobioreactors. **Mar. Biotechnol**, v.15, p.37–47, 2013.

FUENTES-GRUNEWALD, C., GARCES, E., ALACID, E., SAMPEDRO, N., ROSSI, S., CAMP, J. Improvement of lipid production in the marine strains *Alexandrium minutum* and *Heterosigma akashiwo* by utilizing abiotic parameters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 207–216, 2012.

FUENTES-GRUNEWALD, C., GARCES, E., ROSSI, S., CAMP, J.. Use of the dinoflagellate *Karlodinium veneticum* as a sustainable source of biodiesel production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1215–1224, 2009.

FUENTES-GRUNEWALD, C.; BAYLISS; ZANAIN, M.; POOLEY, C.; SCOLAMACCHIA, M.; SILKINA, M. Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform

Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production. **Bioresource Technology**, v.189, p.357–363, 2015.

GEORGE, B.; PANCH, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GHOSH, T.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*—A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource technology**, v.171, p.367-374, 2014.

GINZBERG, A.; KORIN, E.; ARAD, S. Effect of drying on the biological activities of a red microalgal polysaccharide. **Biotechnol. Bioeng**, v.99, p.411–420, 2008.

GIORDANO, M.; KANSIZ, M.; HERAUD, P.; BEARDALL, J.; WOOD, B.; MCNAUGHTON, D. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). **J Phycol**, v.37, p.271–279, 2001.

GROSS, F. Notes on the culture of some marine organisms. **J. Marine Biol**, v.21, p.753-768, 1937.

GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllidc. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972.

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

HUERLIMANN, R., DE NYS, R.; HEIMANN, K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. **Biotechnol. Bioeng**, v.107, p.245–257, 2010.

ISLETEN-HOSOGLU, M.; AYYILDIZ-TAMIS, D.; ZENGİN, G.; ELIBOL, M. Enhanced growth and lipid accumulation by a new *Ettlia texensis* isolate under optimized photoheterotrophic condition. **Bioresource Technology**, v.131, p.258–265, 2013.

JL, M.-K.; JEON, B.-H.; KIM, H.-C.; SAPIREDDY, V. R.; YUN, H.-S.; ABOU-SHANAB, R.A.I.; CHOI, J.; LEE, W.; TIMMES, T.C.; INAMUDDIN. Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* ysw-04. **Applied microbiology and biotechnology**, v.97, n.6, p.2701–2710, 2013.

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by phenol–sulfuric acid method, In: Hellebust, J.A., Craigie, J.S. (Eds.), *Handbook of Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 96–97, 1978.

KUO, C.; CHEN, T.; LIN, T.; KAO, C.; LAI, J.; CHANG, J.; LIN, C. Cultivation of *Chlorella* sp. GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. **Bioresour. Technol**, v.194, p.326–333, 2015.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.81, p.629–636, 2008.

LIM, S-L.; CHU, W-L.; PHANG, S-M. Use *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7314-7322, 2010.

LIU, N.A.; FAN, W.; DOBASHI, R.; HUANG, L. Kinetic modeling of thermal decomposition of natural cellulosic materials in air atmosphere. **J Anal Appl Pyrolysis**, v.63, p.303-25, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265–275, 1951.

MANDAL, S., SINGH, R., PATEL, V. Isolation and characterization of exopolysaccharide secreted by a toxic dinoflagellate, *Amphidinium carterae* hulburt 1957 and its probable role in Harmful Algal Blooms (HABs). **Microb. Ecol**, v.62, p.518–527, 2011.

MARCILLA, A.; GOMEZ-SIURANA, A.; GOMIS, C.; CHAPULI, E.; CATALA, M.C.; VALDES, F.J. Characterization of microalgal species through TGA/FTIR analysis: application to *Nannochloropsis* sp. *Thermochim Acta*, v.484, p.41-7, 2009.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E.; ACOSTA-SALMÓN, H.; SOUTHGATE, P.C. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. **Aquaculture**, v.257, n.1, p.491-503, 2006.

MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable Sustainable Energy Ver**, v.14, p.217–232, 2010.

MAYERS, J.J.; FLYNN, K.J.; SHIELDS, R.J. Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-transform Infrared spectroscopy. **Bioresour. Technol**, v.148, p.215–220, 2013.

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.M.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Quim. Nova**, v.13, n.1, p.10-15, 2013.

MENG, Y.; YAO, C.; XUE, S.; YANG, H. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. **Bioresource Technology**, v.151, p.347–354, 2014.

MIGLIO, R.; PALMERY, S.; SALVALAGGIO, M.; CARNELLI, L.; CAPUANO, F.; BORRELLI, R. Microalgae triacylglycerols content by FT-IR spectroscopy. **J. Appl. Phycol**, v.25, p.1621–1631, 2013.

MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresour. Technol**, v.100, p.3382–3386, 2009.

MOHAN, S.V.; DEVI, M.P.; MOHANAKRISHNA, G.; AMARNATH, N.; BABU, M.L.; SARMA, P.N. Potential of mixed microalgae to harness biodiesel from ecological water-bodies with simultaneous treatment, v.102, p.1109–1117, 2011.

NATRAH, F.M.I.; YUSOFF, F.M.; SHARIFF, M.; ABAS, F.; MARIANA, N.S. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 6, p. 711-718, 2007.

ORFAO, J.J.M.; ANTUNES, F.J.A.; FIGUEIREDO, J.L. Pyrolysis kinetics of lignocellulosic materials-three independent reactions model. **Fuel**, v.78, p.349–358, 1999.

PENG, W. Pyrolytic characteristics of microalgae as renewable energy source determined by thermogravimetric analysis. **Bioresour Technol**, v.80, p.1-7, 2001.

PIGNOLET, O.; JUBEAU, S.; VACA-GARCIA, C.; MICHAUD, P. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v.40, p.781–796, 2013.

PISTORIUS, A.M.A.; DEGRIP, W.J.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T.A. Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy. **Biotechnol. Bioeng**, v.103, p.123–129, 2009.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – a review. **J. Algal Biomass Utln**, v.3, n.4, p.89–100, 2012.

PROCHÁZKOVÁ, G.; BRÁNYIKOVÁ, I.; ZACHLEDER, V.; BRÁNYIK, T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v.26, n.3, p.1359-1377, 2014.

RAPOSO, M.F.J.; DE MORAIS, R.M.S.C.; DE MORAIS, A.M.M.B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life sciences**, v. 93, n. 15, p. 479-486, 2013.

RENAUD, S.M.; THINH, L.V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D.L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, n. 1, p. 195-214, 2002.

RIZZO, A.M.; PRUSSI, M.; BETTUCCI, L.; LIBELLI, I.M.; CHIARAMONTI, D. Characterization of microalga Chlorella as a fuel and its thermogravimetric behavior. **Appl Energy**, v.102, p.24-31, 2013.

SANMUKH, S.; BRUNO, B.; RAMAKRISHNAN, U.; KHAIRNAR, K.; SWAMINATHAN, S.; PAUNIKAR, W. Bioactive compounds derived from microalgae showing antimicrobial activities. **J. Aquac. Res. Dev**, v.5, n.3, 2014.

SHARMA, K.K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P.M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, v.5, n.5, p.1532-1553, 2012.

SIDERIUS, M.; MUSGRAVE, A.; ENDE, H.; KOERTEN, H.; CAMBIER, P.; MEER, P. Chlamydomonas eugametos (chlorophyta) stores phosphate in polyphosphate bodies together with calcium¹. **Journal of phycology**, v. 32, n. 3, p. 402-409, 1996.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. In: **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Ltc, 2007.

SUN, L.; WANG, L.; LI, J.; LIU, H. Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from two marine Chrysophyta. **Food Chem**, v.160, p.1–7, 2014.

VAMVUKA, D.; SFAKIOTAKIS, S. Effects of heating rate and water leaching of perennial energy crops on pyrolysis characteristics and kinetics. **Renewable Energy**, v.36, p.2433–2439, 2011.

VIÇOSE, G.C.; PORTA, A.; VIERA, M.P.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; IZQUIERDO, M.S. Effects of density on growth rates of four benthic diatoms and variations in biochemical composition associated with growth phase. **J Appl Phycol**, v.24, p.1427–1437, 2012.

WAGNER, H.; LIU, Z.; LANGNER, U.; STEHFEST, K.; WILHELM, C. The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. **J. Biophoton**, v.3, p.557–566, 2010.

WANG, H.; JI, B.; WANG, J.F.; GUO, F.J.; ZHOU, W.J.; GAO, L.L.; LIU, T.Z. Growth and biochemical composition of filamentous microalgae *Tribonema* sp. as potential biofuel feedstock. **Bioprocess. Biosyst. Eng**, v.37, p.2607–2613, 2014.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C.C.; JU, Y.H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae. **Chem. Eng**, v.40, p.13–20, 2009.

WOERTZ, I.; FEFFER, A.; LUNDQUIST, T.; NELSON, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **Journal of Environmental Engineering**, v.135, n.11, p.1115–1122, 2009.

XU, Z.B.; YAN, X.J.; PEI, L.Q.; LUO, Q.J.; XU, J.L. Changes in fatty acids and sterols during batch growth of *Pavlova viridis* in photobioreactor. **J Appl Phycol**, v.20, p.237–243, 2008.

YILDIZ, F.H.; DAVIES, J.P.; GROSSMAN, A.R. Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient growth. **Plant physiology**, v.104, n.3, p.981–987, 1994.

YU, J.; TAKAHASHI, P. Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green microalgae. **Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol.**, p.79–89, 2007.

ZARROUK, C. Contribution a l'etuded'unecyanophycee: influence de divers facteurs physiques etchimiquessur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. Theises. Faculty of Science.Universite des Paris; 1966.

ZOU, S. P.; WU, Y. L.; YANG, M. D.; LI, C.; TONG, J. M. Bio-oil production from sub- and supercritical water liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* and related properties. **Energy Environ. Sci.**, v.3, p.1073–1078, 2010.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES GERAIS

Das vinte e cinco espécies de microalgas inicialmente estudadas constatou-se que seis (M84C, D101Z, D115WC, D121WC, D132WC e D133WC) demonstraram potencialidade de produção de biodiesel em massa, tendo em vista suas elevadas taxas de crescimento celular, concentração de biomassa e teor de ésteres superior à soja.

Das doze espécies distribuídas nos dois grupos de microalgas avaliados, constatou-se que dez apresentariam biodieseis que atenderiam as especificações de qualidade combustível normatizadas. Sendo a clorofícea *Chlorella* sp. (D101Z), uma das espécies mais promissoras para produção deste biocombustível, por reunir elevada produtividade de biomassa e de lipídeo e melhores parâmetros de qualidade. Entretanto, as espécies D132WC, D121WC, D115WC e M3C também se mostraram adequadas, tanto em termos de produtividade, quanto de propriedades combustíveis.

Quatro clorofíceas (*Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp., *Lagerheimia longiseta*, e *Pediastrum Tetras*) mostraram capacidade em crescer nos meios alternativos formulados a partir de resíduos humanos e agroindustriais, evidenciando possibilidades reais de sua utilização na produção de biodiesel atrelada a programas de biorremediação. Destacando a *Lagerheimia longiseta*, por ser uma espécie praticamente inexplorada pela literatura, e que demonstrou relevância para cultivos em larga escala devido sua facilidade de crescimento e separação da biomassa, produção de ésteres e outros compostos bioquímicos que agregam valor ao processo produtivo.

Os dados obtidos nas análises de FTIR foram suficientemente robustos indicando ser possível a utilização dessa técnica para avaliar a síntese de compostos de interesse em cultivos de microalgas. A termogravimetria também demonstrou eficiência para este fim mostrando que técnicas analíticas, como as duas citadas, podem ser ferramentas eficientes para analisar a composição da microalga, por serem menos laboriosas e necessitarem de uma quantidade reduzida de biomassa.

ANEXOS

Composição dos meios de Cultivo

Composição do meio Zarrouk

Solução de trabalho	Quantidade
1 KNO ₃	15,0 g em 200 mL
2 NaCl	33,0 g em 200 mL
3 MgSO ₄ .7H ₂ O	1,50 g em 200 mL
4 K ₂ HPO ₄	1,50 g em 200 mL
5 CaCl ₂ .2H ₂ O	0,58 g em 200 mL
6 Na ₂ EDTA	6,40 g em 100 mL
7 FeSO ₄ .7H ₂ O	0,50 g em 100 mL
8 H ₃ BO ₃	1,142 g em 100 mL
9 Solução mista	*
*Solução mista	Quantidade
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,049 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,144 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,882 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0157 g
MoO ₃	0,071 g
Água destilada	100 mL

Preparação de 1,0 L de meio de cultura (água destilada)

A - Dissolver em 600 mL de água destilada 15,0 g de NaHCO₃ e 2,0 g de Na₂CO₃.

B - Acrescentar 10,0 mL das soluções 1, 2, 3, 4 e 5.

C - Acrescentar 1,0 mL das soluções 6, 7, 8 e 9.

D - Completar o volume a 1.000 mL.

Fonte: Zarrouk (1966).

Composição do meio WC

Solução estoque	Quantidades
CaCl ₂ .2H ₂ O	36,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	37,0 g
NaHCO ₃	12,6 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	11,4 g
NaNO ₃	85,0 g
Água destilada	1.000 mL
Solução de silicato	Quantidades
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	21,2 g
Água destilada	1.000 mL
Solução de micronutrientes	Quantidades
Na ₂ EDTA	4,36 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006 g
H ₃ BO ₃	1,0 g
Água destilada	1.000 mL
Solução de vitaminas	Quantidades
Tiamina HCl	0,1 g
Biotina	0,0005 g
Água destilada	1.000 mL
Constituição de 1,0L de meio de cultura	Volume
Água destilada e autoclavada	1.000 mL
Solução estoque	1 mL
Solução de silicato	1 mL
Solução de micronutrientes	1 mL
Solução de vitaminas	1 mL
Tri(hidroximetil)-amino metano	0,115 g

Fonte: Guillard e Lorenzen (1972).

Composição do meio Conway

Solução Principal	Quantidade
EDTA	45,0 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,30 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36 g
H ₃ BO ₃	33,6 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	20,0 g
NaNO ₃	100,0 g
Solução de metais*	1,0 mL
Água destilada	1000,0 mL
*Solução de metais	Quantidade
ZnCl ₂	2,1 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,90 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,0 g
Água destilada	100,0 mL
Solução de vitaminas	Quantidade
Tiamina (B1)	100,0 mg
Cianocobalamina (B12)	2,0 mg
Biotina (H)	1,0 mg
Água destilada	100,0 mL
Constituição de 1,0L de meio de cultura	Volume
Água do mar filtrada e autoclavada	1000,0 mL
Solução principal	1,0 mL
Solução de vitaminas	1,0 mL
Solução de silicato	2,0 mL

Fonte: Walne (1966).