

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA - MESTRADO

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM MEIO ALTERNATIVO DE
MANIPUEIRA ENRIQUECIDO COM BICARBONATO DE SÓDIO**

GUILHERME HENRIQUE PORFÍRIO SANTOS

TOLEDO – PR – BRASIL

Setembro de 2019

GUILHERME HENRIQUE PORFÍRIO SANTOS

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM MEIO ALTERNATIVO DE
MANIPUEIRA ENRIQUECIDO COM BICARBONATO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia – Mestrado em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis.

Orientadora: Prof.^a Dra. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner

TOLEDO – PR – BRASIL

Setembro de 2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Santos, Guilherme Henrique Porfírio
Produção de biomassa de microalgas em meio alternativo de manipueira enriquecido com bicarbonato de sódio / Guilherme Henrique Porfírio Santos; orientador(a), Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner, 2019.
81 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2019.

1. microalgas. 2. lipídeos. 3. produtividade. 4. biocombustíveis. I. Baumgartner, Tatiana Rodrigues da Silva. II. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por GUILHERME
HENRIQUE PORFIRIO SANTOS perante a Comissão Julgadora do Curso de
Mestrado em Bioenergia em 09 de setembro de 2019

COMISSÃO JULGADORA



Prof.ª. Dr.ª. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner

Orientador



Prof.ª Dr.ª Maria Luiza Fernandes Rodrigues

Membro



Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien

Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força e auxílio para completar parte desta missão atribuída a mim.

A toda minha família, principalmente minha mãe Marisa, meu pai Aguinaldo e minhas irmãs Tahis e Gabriela por todo amor incondicional, por serem meu firmamento.

A Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner, por toda a sua orientação e seus ensinamentos, que me trouxeram conhecimentos os quais levarei para toda a vida.

A Veridyana por todo amor e compreensão durante o decorrer do trabalho.

Aos colegas que atuam no Gerpel por todo o apoio e auxílio durante o período de trabalho, pelo carinho e por toda a paciência durante a realização das pesquisas.

Aos meus professores do PPGB pelo ensino de excelência e todas as lições adquiridas durante o curso.

A Dirce pela excelência em seu trabalho e pelos auxílios sempre que necessário.

Ao instituto BMAK e ao grupo de pesquisa liderado pelo professor Adilson Ricken Schuelter por cederem os inóculos das microalgas utilizadas no trabalho.

Em memória a José Sidnei e Rosana por compartilharem tantos momentos felizes durante sua estadia neste plano.

A Capes pela concessão da bolsa e dos recursos financeiros para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
ABREVIACÕES	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. MANDIOCA, FÉCULA E MANIPUEIRA	5
3.2. MICROALGAS	12
3.3. PRODUÇÃO DE MICROALGAS	14
3.3.1. HISTÓRICO	14
3.3.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO	15
3.3.2.1. Método De Nutrição	15
3.3.2.2. Meio De Cultura	17
3.3.2.3. Sistemas de cultivo	18
3.3.2.4. Forma de operação do cultivo	20
3.3.3. FATORES COM INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO	21
3.3.3.1. Temperatura	22
3.3.3.2. Potencial hidrogeniônico (pH)	22
3.3.3.3. Luminosidade	23
3.3.3.4. Aeração e agitação	24
3.3.3.5. Pureza da Cultura	25
3.3.3.6. Salinidade	25
3.3.4. BICARBONATO DE SÓDIO EM CULTIVOS	26
3.3.5. APLICAÇÕES E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS	27
3.3.5.1 Biodiesel	29
3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32

4.1. MICRORGANISMOS	32
4.2. EFLUENTE UTILIZADO	32
4.3. AMBIENTE DE CULTIVO	33
4.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	35
4.4.1. Inoculação	35
4.4.2. Cultivo preliminar	37
4.4.3. Cultivo subsequente	38
4.4.4. Caracterização Final	40
4.5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	40
4.5.1. Tratamento de Vidrarias e Meio de Cultivo	40
4.5.2. Análises de pH	41
4.5.3. Colheita das microalgas	41
4.5.5. Desenvolvimento Celular	42
4.5.6. Concentração Máxima de biomassa	43
4.5.7. Quantificação de Lipídeos	44
4.5.8. Produção de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos	44
4.5.9. Caracterização dos Ésteres Metílicos	45
4.5.10. Análises estatísticas	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA MANIPUEIRA	47
5.2. CULTIVO PRELIMINAR	47
5.2.1. Comparação entre as Cepa PPEQ – 02 e BMAK07	47
5.1.2. Crescimento da cepa PPEQ-02 em meio BBM enriquecido com CBS	51
5.2 CULTIVO SUBSEQUENTE	52
5.2.1. Desenvolvimento das microalgas e variação de pH	52
5.2.2. Resultado DCCR da produção de <i>Chlorella sp.</i>	55
5.3 Caracterização dos ésteres metílicos	64
6. CONCLUSÃO	67
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Produção Nacional de Fécula.	7
Figura 3.2 – Fluxograma básico de produção da fécula..	7
Figura 3.3: Manipueira, resíduo líquido do processamento da fécula.	9
Figura 3.4: Microalgas <i>Chlorella sp.</i> observadas em lente objetiva 40x.	13
Figura 3.5: Fluxograma da variação metabólica das microalgas.	16
Figura 3.6: Ao lado esquerdo, um biorreator do tipo tanque aberto; do lado direito, uma lagoa natural contendo microalgas.	18
Figura 3.7: Modelos de fotobiorreatores fechados.	19
Figura 3.8: Fases do crescimento microalgal	21
Figura 3.9: Reação de Solvay.	26
Figura 3.10: Aplicações das microalgas na atualidade.	28
Figura 3.11: Reação de esterificação para obtenção de biodiesel.	30
Figura 4.1: Processos unitários onde há geração de manipueira	32
Figura 4.2: Amostras de manipueira armazenadas em congelador.	33
Figura 4.3: Ambiente de crescimento das microalgas	34
Figura 4.4 – Fluxograma do esquema de realização dos experimentos.	35
Figura 4.5: Meio de Cultura preparado para a autoclavagem.	41
Figura 4.6: Centrífuga recebendo o cultivo para iniciar a operação.	42
Figura 4.7: Gráfico com modelo matemático e curva de crescimento.	43
Figura 4.8: Filtragem da amostra do cultivo.	43
Figura 5.1: Relação entre a produtividade de biomassa e lipídeos ($\text{mg.L}^{-1} \cdot 120\text{h}^{-1}$) .	50
Figura 5.2: Desenvolvimento celular da estirpe PPEQ-02 em cultivo com meio BBM enriquecido com bicarbonato de sódio (0,1% _{op/v})	51
Figura 5.3: Desenvolvimento celular de microalgas PPEQ – 02 durante o cultivo subsequente em diferentes concentrações de manipueira e bicarbonato de sódio..	53
Figura 5.4: Variação de pH durante o cultivo subsequente utilizando PPEQ – 02...	54
Figura 5.5: Gráfico de pareto ($\alpha:0,10$) para as variáveis concentração de biomassa (a) e teor de lipídeos (b)	58
Figura 5.6: Gráfico de resíduos vs valores preditos ($\alpha: 0,10$).	61

Figura 5.7: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos ($\alpha: 0,10$).	61
Figura 5.8: Superfície de Resposta da Concentração Final de Biomassa (a) e Teor de Lipídeos (b)	62
Figura 5.9: Perfil de valores preditos da Concentração de biomassa e Teor de Lipídeos e desejabilidade do experimento realizado no estudo utilizando PPEQ -02 ($\alpha: 0,10$).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Caracterização da manipueira segundo vários autores.....	11
Tabela 4.1: Composição química do meio de cultura padrão BBM.....	36
Tabela 4.2: Delineamento experimental 2 ² utilizados no cultivo preliminar.	37
Tabela 4.3: Delineamento experimental DCCR realizado no cultivo subsequente...	39
Tabela 5.1: Características da manipueira utilizada no estudo.	47
Tabela 5.2: Resultados do Cultivo Preliminar com meio de cultivo enriquecido por manipueira.	48
Tabela 5.3: Resultados da concentração de biomassa e teor de lipídeos obtidos no DCCR.	55
Tabela 5.4: Efeitos e Coeficientes de regressão quadrática do DCCR para concentração de biomassa e lipídeos com a microalga PPEQ – 02.....	59
Tabela 5.5: Análise de variância do DCCR para concentração de biomassa do cultivo de microalga PPEQ – 02.....	60
Tabela 5.6: Análise de variância do DCCR para conteúdo lipídico presente na biomassa do cultivo de microalga PPEQ – 02.....	62
Tabela 5.7: Caracterização do perfil de ésteres obtidos (%).	64

ABREVIATÖES

BBM	Bold Basal Medium
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
BMAK	Banco de Microorganismos Marinhos Aidar & Kutner
PPEQ	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Gerpel	Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia
CCAP	Culture Colletion of algae and Protozoa
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
pH	Potencial Hidrogeniônico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
HCN	Cianeto de Hidrogênio
SOx	Óxidos de Enxofre
CM	Concentração de manipueira (%v/v)
CBS	Concentração de bicarbonato de sódio (g litro ⁻¹)
F _{tab}	F-valor tabelado
F _{calc}	F-valor calculado

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM MEIO ALTERNATIVO DE MANIPUEIRA ENRIQUECIDO COM BICARBONATO DE SÓDIO

AUTOR: GUILHERME HENRIQUE PORFÍRIO SANTOS

ORIENTADORA: PROF. DRA. TATIANA RODRIGUES DA SILVA BAUMGARTNER

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brasil, defendida em 09 de setembro de 2019. 83 p.

RESUMO

A produção de biodiesel utilizando biomassa de microalgas pode ser considerada uma alternativa promissora para o setor energético, visto que estes microrganismos possuem elevada produtividade e teor de lipídeos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento de microalgas *Chlorella sp.* em manipueira enriquecida com bicarbonato de sódio. Inicialmente foi realizado um cultivo preliminar para avaliar o desenvolvimento de diferentes cepas (BMAK07 e PPEQ – 02) sob os métodos de nutrição mixotrófico e heterotrófico. Após a comparação, foi encontrada a melhor condição de cultivo, no qual foi realizado um delineamento DCCR com diferentes concentrações de manipueira e diferentes suplementações com bicarbonato de sódio como variáveis independentes. A condição com melhor resultado no cultivo preliminar foi obtida com a cepa PPEQ-02 sob o método de nutrição mixotrófico e resultou em $643 \pm 28,1$ mg.L⁻¹ de biomassa e $13,43 \pm 1,0$ % de lipídeos. Os melhores resultados para a produtividade máxima de biomassa (820 mg.L⁻¹) e teor de lipídeos (59%) encontradas nos cultivos foi alcançada no ensaio doze (12) com concentração de manipueira de 17% (v/v) e suplementação de bicarbonato de sódio de 15 g.L⁻¹. Os resultados obtidos demonstram que o meio alternativo tem potencial de utilização para o cultivo de microalgas do gênero.

Palavras-chave: biocombustíveis, microalgas, lipídeos, PPEQ – 02, produtividade.

BIOMASS PRODUCTION BY MICROALGAS IN ALTERNATIVE MEDIUM OF MANIPUEIRA ENRICHED WITH SODIUM BICARBONATE

AUTHOR: GUILHERME HENRIQUE PORFÍRIO SANTOS

ADVISOR: PROF. DRA. TATIANA RODRIGUES DA SILVA BAUMGARTNER

Master Thesis; Bioenergy Postgraduate Program; Western Paraná State University, College is Street, 645; CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brazil, presented on September, 09th 2019. 83 p.

ABSTRACT

Biodiesel production using microalgal biomass can be considered an alternative for the energy sector, since these microorganisms have high productivity and high lipid content. Thus, the objective of this work was to study the development of microalgae *Chlorella sp.* in alternative medium containing of manipueira enriched with sodium bicarbonate. Initially a preliminary cultivation was performed to evaluate the development of different strains (BMAK07 and PPEQ – 02) under the mixotrophic and heterotrophic nutrition methods. After comparison, was found the best condition to follow for cultivation, where a DCCR design was carried out with different concentrations of manipueira and different sodium bicarbonate supplements as independent variables. The condition with the best result in the preliminary cultivation was obtained with the strain PPEQ – 02 under the mixotrophic nutrition method and resulted in 643 ± 28.1 mg.L⁻¹ of biomass and $13.43 \pm 1.0\%$ of lipids. In cultivation, the best results for the maximum yield of biomass (820 mg.L⁻¹) and lipid content (59%) were achieved in the test twelve (12) with a concentration of 17% (v/v) and supplementation of 15 g.L⁻¹ sodium bicarbonate. The results show that the alternative medium has potential of use for the cultivation of microalgae of the genus.

Keywords: biofuels, microalgae, lipids, PPEQ – 02, productivity.

1. INTRODUÇÃO

O setor automotivo possui vários problemas devido a matriz energética atual ser sustentada principalmente por combustíveis fósseis. Por isto, a utilização de combustíveis renováveis está cada vez mais disseminada, visto que estas fontes se apresentam como uma ótima alternativa para transpor não somente os problemas futuros relacionados a escassez de fontes energéticas, mas também possuem alto potencial para mitigar os problemas ambientais relacionados as emissões atmosféricas de compostos poluentes pela combustão de derivados do petróleo.

O biodiesel é considerado uma fonte promissora entre os combustíveis renováveis automotivos, visto que possui as características necessárias para substituir o diesel de petróleo, além de ser biodegradável e ter uma exaustão mais limpa devido a sua composição. A produção de biodiesel também se destaca pelas diversas matérias-primas utilizáveis, incluindo óleos vegetais, gorduras animais e óleos reutilizáveis. Dentre as matérias-primas de óleos vegetais, as microalgas possuem um potencial promissor para o futuro da produção de biodiesel devido ao alto teor de lipídeos encontrados em sua biomassa e principalmente pela alta produtividade.

Os cultivos de microalgas possuem vários benefícios quando comparados a outros cultivos vegetais. Este modelo de produção se destaca principalmente pela sua alta produtividade que supera qualquer outra cultura vegetal produzida no mundo, pois seus rendimentos em biomassa seca e lipídeos após a colheita são superiores às outras culturas oleaginosas tradicionais.

Mesmo com os benefícios encontrados no cultivo de microalgas ainda existem gargalos relacionados a produção em larga escala, onde um dos principais entraves é o custo elevado dos compostos químicos necessários para a constituição de meios de cultivos padrão, que por sua vez encarecem toda a cadeia produtiva das microalgas. Este custo por muitas vezes inviabiliza a produção de microalgas para utilização comercial e desta forma, torna-se imprescindível a busca por alternativas capazes de contornar este problema e criar um cenário promissor para a produção rentável de microalgas.

Uma alternativa promissora para contornar esse problema é a utilização de meios de cultivo alternativos, capazes de suprir a necessidade nutricional das microalgas e minimizar os custos relacionados à constituição dos meios de cultivo. Entre estes meios de cultivo alternativos, se destacam os estudos que utilizam resíduos industriais como fonte de nutrientes para as microalgas, não somente por apresentarem vários benefícios econômicos, mas também ambientais.

Os benefícios trazidos pela utilização de resíduos industriais se destacam pela diminuição dos custos com compostos químicos dos meios de cultura, além da assimilação de compostos com potencial poluidor pela biomassa das microalgas, de forma a reciclar e reintroduzi-los como coprodutos em outra cadeia produtiva para gerar um cenário de produção sustentável.

Durante o processo de industrialização da mandioca com a finalidade de produção de fécula é gerado um resíduo líquido com elevada carga orgânica e outros compostos com capacidade poluente, que pode ser considerado uma alternativa para o cultivo de microalgas. Este resíduo líquido é conhecido popularmente como manipueira.

A utilização do bicarbonato de sódio nos meios de cultivos alternativos encontra-se como uma ferramenta para contornar outros problemas relacionados à composição do meio e a produção de microalgas. O bicarbonato de sódio pode ser considerado uma alternativa viável para o enriquecimento dos meios de cultivo, uma vez que ele serve como fonte auxiliar de carbono para as microalgas, estabilizador de pH e como um sal capaz de aumentar a alcalinidade do meio, de forma a melhorar o crescimento da cultura e também agem como um importante antimicrobiano, diminuindo a capacidade do crescimento de microrganismos competidores no meio.

O estudo buscou realizar o cultivo de microalgas em meios alternativos compostos por resíduos industriais enriquecidos, capazes de suprir a necessidade das microalgas, visando a produção de biomassa e principalmente de lipídeos capazes de serem utilizados na produção de biodiesel. Dentro deste contexto, o objetivo desta pesquisa foi investigar a produção de microalgas do gênero *Chlorella sp.* em meio de cultura composto por manipueira enriquecida com bicarbonato de sódio. Este

processo combina as vantagens de produção de biomassa rica em óleo que pode ser utilizada na síntese de bicomcombustível, além da reciclagem do efluente industrial, transformando-o em coproduto de outro processo produtivo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar o efeito do efluente proveniente de fecularias enriquecido com bicarbonato de sódio na produção de biomassa e lipídeos em microalga do gênero *Chlorella sp.*

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar o potencial de produção de biomassa de duas cepas distintas, denominadas PPEQ-02 e BMAK07;
- Conhecer a quantidade de biomassa e lipídeos produzida pelas diferentes cepas sob regime de produção mixotrófico e heterotrófico;
- Avaliar o desenvolvimento da cepa denominada PPEQ-02, sob condição de cultivo padrão enriquecido com bicarbonato de sódio;
- Estabelecer um modelo matemático da produção de PPEQ-02, com variação dos fatores concentração de manipuladora (%_{ov/v}) e bicarbonato de sódio (g.L⁻¹);
- Analisar o perfil dos ésteres presentes nos melhores resultados obtidos no modelo matemático;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MANDIOCA, FÉCULA E MANIPUEIRA

A mandioca é uma planta originária da região centro e sul-americana. Sua utilização e cultivo remete a antiguidade, pois os nativos utilizavam estas raízes no preparo de várias receitas destinadas a alimentação (EMBRAPA, 2006). Segundo Conceição (1987), durante a colonização, os índios brasileiros apresentaram aos imigrantes seus produtos alimentares e suas bebidas obtidas a partir da mandioca, demonstrando o potencial desta cultura nativa para a subsistência dos primeiros exploradores do país.

O termo mandioca compreende todas as subespécies da espécie *Manihot Esculenta Crantz* (Embrapa, 2006). O tubérculo caracteriza-se pela fácil propagação, desenvolvimento em solos pouco férteis e sua tolerância às condições climáticas diversas e são muito cultivadas por produtores familiares e sociedades em desenvolvimento (LEONEL, OLIVEIRA & FILHO, 2005; PINTO, 2008). Devido as suas características, esta planta é uma das culturas mais difundidas, com grande aplicação nos setores da agroindústria, indústria têxtil, farmacêutica, química, entre outras.

Sua aplicabilidade é destacada na área da indústria alimentícia, pois o setor utiliza a mandioca na obtenção de vários tipos de produtos, como por exemplo na produção de farinha, amidos modificados, fécula, polvilho doce e azedo (CEPEA, 2018; CEREDA, 2001). O cultivo da mandioca nos últimos tempos, está sendo mais explorado, principalmente pelo desenvolvimento de novas tecnologias que aumentam gradativamente a produtividade da planta.

A produção de mandioca aproxima-se de 270 milhões de toneladas de raiz no mundo, esta produtividade confere a cultura um aspecto muito importante para o desenvolvimento mundial, seja pela geração de empregos, geração de renda e principalmente na segurança alimentar das populações (SEAB, 2017; EMBRAPA, 2006). O Brasil classifica-se como o quarto maior produtor mundial de mandioca atualmente, sendo ultrapassado somente pela Nigéria, Tailândia e Indonésia neste

ranking, expondo a importância desta planta também no cenário nacional (SEAB, 2017).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2018), a área utilizada para plantio de mandioca no Brasil gira em torno de 2,27 milhões de hectares por ano, com um rendimento médio de 14,5 toneladas por hectare plantado. Além disso, a produção de raízes frescas alcançou uma média anual de 25,7 milhões de toneladas colhidas entre os anos de 2006 e 2018.

Aproximadamente 11% da produção brasileira de mandioca destina-se às fecularias nacionais, onde é realizado o processamento da mandioca com a finalidade de se obter a fécula (CEPEA, 2016). A fécula é um produto conhecido também como polvilho, goma ou amido de mandioca, é insolúvel em água fria e apresenta gelatinização quando aquecida em água. Os termos técnicos aplicados caracterizam o amido como o produto processado a partir da parte aérea da planta, já a fécula é retirada da parte inferior, ou seja, das raízes, bulbos e tubérculos (MATSUURA; FOLEGATTI; SARMENTO, 2003).

As características apresentadas fazem com que a fécula possa ser utilizada na fabricação de uma infinidade de produtos em diversos setores, como por exemplo, sagu, polvilho, tapioca, xarope de glicose, sopas, pudins, fermento em pó, fósforos, comprimidos, embalagens biodegradáveis, cremes dentais, etc. (CEREDA, 2001; MATSUURA; FOLEGATTI; SARMENTO, 2003).

As fecularias nacionais processaram uma média anual de aproximadamente 2.264,4 ± 205,8 mil toneladas de mandioca, como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 3.1 (CEPEA, 2016). Porém, a capacidade de processamento ultrapassa as 5.360 mil toneladas por ano, desta forma, o potencial brasileiro de produção de fécula não se encontra, ainda, totalmente explorado. Esta capacidade está concentrada nos estados da Bahia (1%), Santa Catarina (2%), São Paulo (9%), Mato Grosso do Sul (21%) e principalmente no Paraná (67%), que se encontra na vanguarda dos estados produtores de fécula.

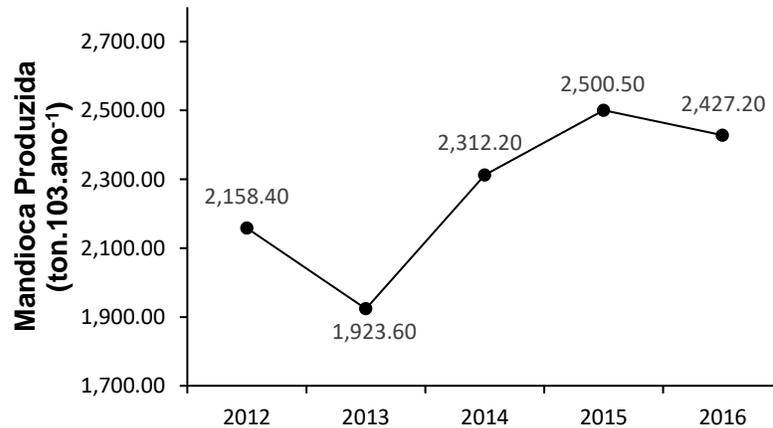


Figura 3.1: Produção Nacional de Fécula. Fonte: CEPEA (2016)

O processamento da mandioca em fecularias acontece através de várias operações unitárias que podem ser observados na Figura 3.2. Todas as operações básicas do processo de produção da fécula estão descritas neste fluxograma.

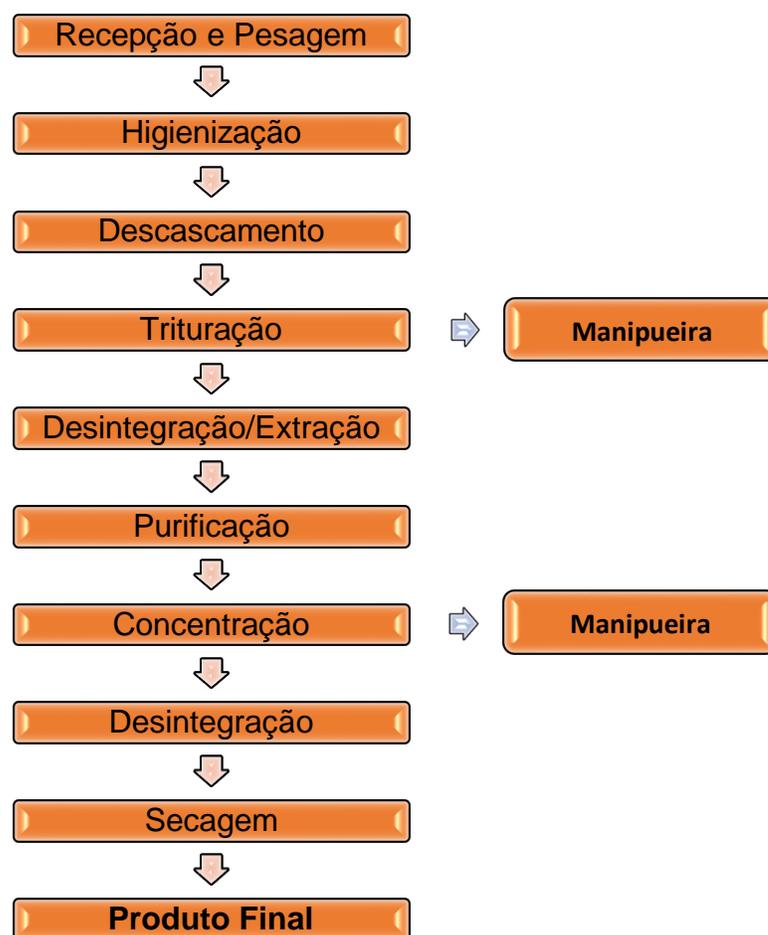


Figura 3.2 – Fluxograma básico de produção da fécula. Fonte: Santos (2019).

As operações do fluxograma estão descritas a seguir, para uma melhor descrição mais elucidada:

- Recepção e Pesagem: Fase onde é mensurada a quantidade de mandioca inserida no processo através da pesagem em balança de caminhões. Também são realizadas análises para a classificação da mandioca, quantificação da umidade e grau de impureza da carga.

- Higienização: As raízes de mandioca são destinadas aos tanques de lavagem através de rosca rotativa e esguichadas com jatos de água, onde são retirados resquícios de terra ou outras impurezas presentes na superfície das cascas do tubérculo. Nesta fase do processo é gerada uma grande quantidade de resíduo líquido que é encaminhado as lagoas junto a manipueira.

- Descascamento: Após o processo de higienização, a mandioca é transportada para um segundo tanque afunilado, dotado de uma rosca rotativa na parte inferior. Esta rosca faz com que as raízes sejam descascadas através do efeito gerado pelo atrito entre as raízes com as paredes do tanque, a rosca e propriamente entre si.

- Trituração: Nesta fase, as mandiocas já limpas e descascadas são levadas a outra rosca rotativa para a trituração da massa. Isto ocorre simultaneamente com a injeção de água no sistema. Esta fase tem a função de padronizar o tamanho das partículas da matéria prima e também aumentar a suscetibilidade do amido presente na massa a ser extraído na próxima fase. Durante a trituração, a massa triturada segue para a próxima etapa e parte do líquido é descartado.

- Desintegração e Extração da Fécula: Esta operação ocorre através da fragmentação da massa úmida através da ação de um cilindro rotativo de alta velocidade dotado de lâminas dentadas. O resultado deste procedimento gera uma pasta composta por água e fécula, que são separadas da fibra através da extração em peneiras rotativas (GLS). A fibra proveniente do processo é descartada do processo na forma de resíduo sólido.

- Concentração: A pasta obtida durante a extração é transportada ao equipamento para extração de água, este procedimento é realizado através de filtros

rotativos à vácuo ou centrífugas. O processo de concentração reduz a umidade significativamente e possibilita a realização da próxima operação de forma otimizada. A água extraída durante esta fase também é descartada como efluente líquido.

- Desidratação: A fécula obtida após a concentração é depositada em um desidratador centrífugo ou um filtro a vácuo com a finalidade de diminuir a humidade remanescente, e assim diminuir a utilização de energia necessária para a secagem final do produto.

- Secagem: Esta etapa do processo é realizada através de jatos de ar quente que são enviados sob regime de contracorrente ao fluxo do amido, com a finalidade de diminuir ao máximo os níveis de humidade, diminuindo assim a perecibilidade e possibilidade de contaminação do produto final. A partir disso, o produto segue para o empacotamento.

O resíduo líquido retirado do processo durante as etapas de trituração e concentração apresenta aspecto leitoso e coloração clara (Figura 3.3). Este líquido é conhecido como manipueira, termo que remete a linguagem tupi-guarani e significa “o que brota da mandioca” (CEREDA, 2001). A manipueira tem caracterização físico-química variada, a depender das operações realizadas durante o processamento e das origens botânicas da mandioca.



Figura 3.3: Manipueira, resíduo líquido do processamento da fécula. Fonte: Santos (2019).

A manipueira obtida através do processo de extração da fécula também é produzida durante a produção de farinha. As fecularias produzem um líquido mais diluído e desta forma, apresenta maior volume em relação ao resíduo originado em farinheiras, porém com cargas orgânicas mais baixas. São gerados aproximadamente 600 litros de efluente por tonelada de mandioca processada (MATOS, 2011), com umidade próxima a 95% (CEREDA, 2001). Já em farinheiras são gerados aproximadamente 300 litros por tonelada (MATOS, 2011; NITSCHKE; PASTORE, 2003).

O descarte inadequado da manipueira gera problemas ambientais devido as suas elevadas quantidades de poluentes, principalmente a carga orgânica em forma de carboidratos simples ou complexos e vários tipos de nutrientes presentes no meio, além do cianeto gerado devido a linamarina e lataustralin presentes nas raízes da mandioca (MARÓSTICA JR.; PASTORE, 2006; NITSCHKE; PASTORE, 2005).

Vários impactos são causados pelos componentes presentes no meio líquido, como por exemplo: os nutrientes nitrogênio e fósforo são essenciais para o crescimento de algas, porém, em concentrações elevadas aumentam demasiadamente os níveis destes organismos e geram o impacto conhecido como eutrofização (SPERLING et al., 2009); a intoxicação de animais e humanos pela ingestão de cianeto ou inalação de ácido cianídrico, pois estes elementos têm elevada afinidade com ferro existente no sangue e ao entrarem em contato com a hemoglobina, formam a cianohemoglobina podendo ocasionar a morte do indivíduo em poucos minutos (AMORIM et al., 2006); o lançamento da manipueira em corpos hídricos provoca a redução dos níveis de oxigênio dissolvido na água onde for lançada, causando decréscimo da qualidade da água e colocam a fauna aquática em risco de vida (MATOS, 2011); a percolação da manipueira em solos pode acarretar na formação de nitratos nas águas subterrâneas, que prejudicam a saúde pública das sociedades abastecidas por essas fontes (SPERLING et al., 2009).

Vários outros resíduos sólidos e líquidos são gerados na cadeia produtiva da fécula, porém a vasta aplicabilidade desses resíduos torna-os subprodutos com alto

valor agregado (PINTO, 2008). Os subprodutos sólidos são geralmente aproveitados na agricultura e na alimentação animal (CEREDA, 2001).

Mesmo com a variação físico-química da manipueira, sua carga orgânica aproximada é de 13.500 mg.L⁻¹ (RIBAS, 2003), mas a quantidade de carbono pode aumentar e diminuir conforme os processos utilizados na extração da fécula, pelas espécies e idade das raízes utilizadas. Da mesma forma que a carga orgânica, os níveis de nutrientes variam representativamente, mas a manipueira sempre apresenta elevados níveis de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, sais minerais, entre outros compostos com elevado potencial de aplicação em diversas áreas (CEREDA, 2001; LEONEL; CEREDA, 1995; NITSCHKE; PASTORE, 2003). A Tabela 3.1, mostra algumas características da quantificação da manipueira apresentada na literatura.

Tabela 3.1: Caracterização da manipueira segundo vários autores.

Parâmetro	Pinto (2008)	Nitschke (2005)	Damasceno (2003)	Borghetti (2009)	Leonel e Cereda (1995)
pH	6,63	5,9	5,5	4,4	6,27
DQO g (O ₂ .L ⁻¹)	14,3	55,82	60,0	6,18	-
Nitrogênio total (ppm)	360,0	2500,0	1600,0	154,15	1421,0
Fósforo (ppm)	42,0	225,9	83,3	19,26	293,0
Potássio (ppm)	1268,0	2665,1	895,0	1463,4	2650,0
Cálcio (ppm)	-	292,5	184,0	-	220,0
HCN total (ppm)	12,6	-	-	61,91	459,86

Fonte: Adaptado por Guilherme (2019).

Segundo (CEREDA, 2001), a manipueira é um recurso não-esgotado e sua utilização em nutrição do solo e plantas é promissora, desde que seja realizada de forma adequada. Vários estudos estão relacionados com a influência da utilização de manipueira como fonte de nutrientes em várias culturas.

Dentro do processo de construção de uma cadeia sustentável para a manipueira produzida em fecularias, a utilização na produção de microalgas pode ser considerada uma alternativa promissora, pois é evidenciado o potencial das microalgas no tratamento de águas residuais, biofixação de carbono e compostos poluentes, além disto, geram biomassa microalgal comerciável, agregando ainda mais valor a este subproduto devido a possibilidade de retorno econômico no processo (BORGHETTI, 2009; CHISTI, 2007).

3.2. MICROALGAS

Os fósseis das primeiras microalgas descobertas em rochas estão avaliados em 3,4 bilhões de anos atrás, mostrando que elas se encontram entre os primeiros seres vivos existentes na Terra, desta forma, são consideradas precedentes a todos os outros organismos vegetais presentes no planeta (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996). Conforme Li et al. (2008) e Lourenço (2006), as microalgas são seres microscópicos, procariontes ou eucariontes capazes de realizar ação fotossintética e alcançar altas taxas de crescimento devido as suas estruturas simples. Porém, atualmente essa definição abrange mais do que somente os organismos autotróficos, pois algumas microalgas apresentam crescimento heterotrófico, realizado através da utilização de fontes de carbono orgânico para suprir a necessidade de energia (LI et al., 2008; LOURENÇO, 2006).

Elas podem ser encontradas nos mais diversos ambientes, como águas doces, salgadas, salobras e ainda, sobre diversos ecossistemas terrestres, pois alcançam uma grande aceitação à variação de condições ambientais. Se encontram tanto na forma livre, como também sob associação simbiótica com uma variedade de outros microrganismos (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014a; RICHMOND, 2004). Elas são consideradas os organismos responsáveis pela produção do dióxido (O_2) presente na atmosfera primitiva, pois desempenham um importante papel na composição dos gases atmosféricos na atualidade e principalmente regular o fluxo de energia da terra (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

Segundo (LOURENÇO, 2006), os estudos relacionados a fisiologia e microbiologia desses organismos é realizado a mais de 140 anos. Isto possibilitou uma vasta gama de conhecimento relacionados a estes microrganismos, onde estima-se que atualmente são reconhecidas aproximadamente 30.000 espécies diferentes de microalgas. Porém, estimativas apontam que existam mais de 50.000 espécies no planeta (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; RICHMOND, 2004).

Devido a quantidade excepcional de espécies de microalgas e as características peculiares de cada uma, fica evidenciada que a necessidade de estudos relacionados a este tema ainda é muito extensa.

As microalgas podem ser divididas em seres com estrutura celular procarionte, representada por duas divisões (*Cyanophyta* e *Prochlorophyta*). Também podem ter estrutura celular eucarionte, onde existem outras 9 divisões (*Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, etc.). A partir desta divisão, será realizada uma descrição geral somente do gênero *Chlorella* sp. (Figura 3.4), pois este é alvo dos estudos realizados nesta dissertação.

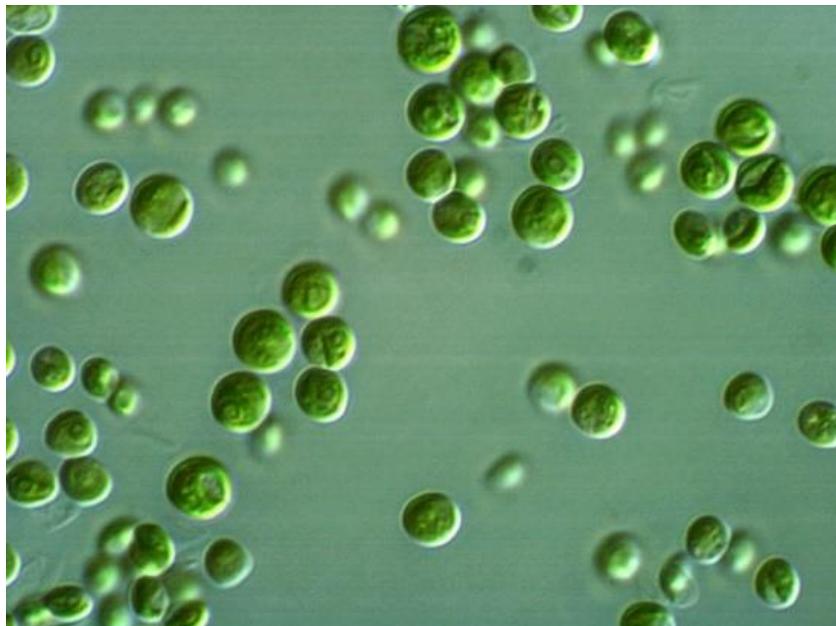


Figura 3.4: Microalgas *Chlorella* sp. observadas em lente objetiva 40x. Fonte: Borghetti (2009).

A classificação das microalgas leva em conta as características morfológicas, estrutura celular, composição bioquímica, cloroplastos, ultraestrutura celular, ciclo de

vida e genomas (ANDERSEN, 2005). Segundo Andrade e Colozzi Filho (2014a), podemos classificar *Chlorella sp.* como pertencendo a divisão *Chlorophyta*, seguindo para classe *Trebouxiophyceae*, ordem *Chlorellales*, família *Chlorellaceae*, gênero *Chlorella*.

O gênero *Chlorella sp.* apresenta características estruturais e morfológicas distintas, com formato esférico e seu tamanho varia entre 2 e 10 μm , também são unicelulares e não flagelados. Sua reprodução acontece de forma assexuada por autósporos, que são esporos que dão origem a segunda geração de células praticamente idênticas as primeiras (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014a).

3.3. PRODUÇÃO DE MICROALGAS

3.3.1. HISTÓRICO

O primeiro relato de estudos relacionados a produção de microalgas pode ser atribuído a Cohn (1850), que manteve espécimes da microalga *Haematococcus* vivas em laboratório. Porém, vários autores consideram que o estudo propriamente dito de microalgas teve início entre 1870 e 1880, quando os primeiros cultivos isolados e com meio de cultura próprio foram desenvolvidos por Famintzin (1871). De forma correlata, pode-se considerar que ambos os pesquisadores estiveram na vanguarda da busca pelo conhecimento relacionado as microalgas (ANDERSEN, 2005; LOURENÇO, 2006).

Durante as três décadas consequentes ao estudo realizado por Famintzin, vários pesquisadores buscaram as condições ideais de nutrição e reprodução de microalgas em laboratório, trazendo um avanço nos campos da fisiologia desses microrganismos. Nesta época foram estabelecidos por Molisch (1895, 1896) e Beneke (1898) as primeiras soluções-estoque, contidas por elementos inorgânicos essenciais para a sobrevivência de diferentes espécies e Klebs (1896) realizou os primeiros cultivos unialgáceos (LOURENÇO, 2006).

O cultivo de microalgas abrangeu somente o caráter biológico até meados da década de 1940, quando as primeiras pesquisas relacionadas a produção e sua

aplicabilidade foram iniciadas. Foi dada alta relevância nessa época a utilização de biomassa para a alimentação animal e humana, como apresentado por Spoher e Milner (1947, 1949) citados por Lourenço (2006). Nessa época, também foram realizados estudos promissores sobre cultivos em larga escala.

Durante o decorrer de todos os anos seguintes, foram realizadas várias pesquisas relacionadas a diferentes formas de cultivo de microalgas. Este conteúdo continua sendo foco de várias pesquisas até a atualidade, principalmente pela sua aplicabilidade atual e relativo potencial no futuro.

3.3.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

No decorrer das décadas de 1960 e 1970 vários estudos relacionados ao crescimento de microalgas sob diferentes condições foram realizados, mostrando a existência das variáveis que interferem no crescimento celular. Elucidar de forma mais correlata as várias variáveis que interferem no cultivo de microalgas auxilia no conhecimento relacionado ao tema. Para isso, este capítulo mostrará de forma sucinta as diferentes condições de cultivo que interferem no crescimento das microalgas.

3.3.2.1. Método De Nutrição

A grande diversidade de microalgas relacionadas aos tipos de nutrição existentes acarreta uma grande versatilidade metabólica celular. A forma do metabolismo celular pode ocorrer pela variação das condições ambientais e pela característica de cada espécie. De acordo com estudos apresentados por Andrade e Colozzi Filho (2014a), Mata, Martins e Caetano (2010), o metabolismo destes microrganismos pode ser autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico, como demonstrado na Figura 3.5.

Os organismos autotróficos utilizam elementos inorgânicos para obtenção de energia, principalmente dióxido de carbono (CO_2), convertidos em elementos essenciais para a sobrevivência das células através do processo de fotossíntese, que ocorre na presença de luz.

As microalgas que utilizam como fonte de energia os compostos orgânicos obtidos externamente, podem ser classificadas como heterotróficas. Essas espécies são marcadas por poderem ser cultivadas somente em substrato orgânico, sem necessidade restrita à energia luminosa para sua sobrevivência.

O metabolismo mixotrófico ocorre quando a nutrição dos organismos pode ocorrer tanto via fotossíntese, como também através da assimilação de matéria orgânica, variando conforme as necessidades da microalga e com as condições ambientais existentes. Neste caso, a microlaga pode utilizar dióxido de carbono e os compostos orgânicos como fonte de carbono. Já os organismos fotoheterotróficos necessitam estritamente da presença de luz para que consigam assimilar as fontes de carbono existentes nos meios de cultivo (RICHMOND, 2004).

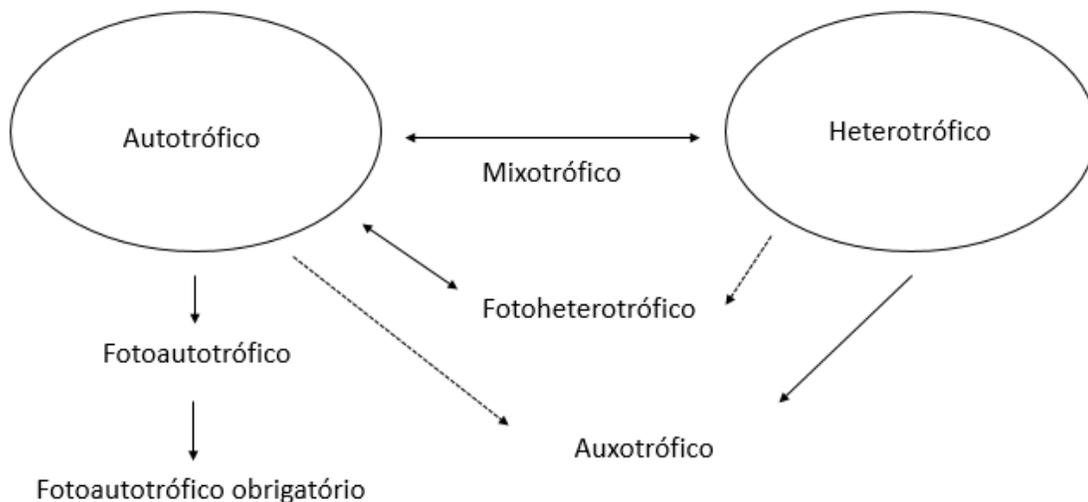


Figura 3.5: Fluxograma da variação metabólica das microalgas. Fonte: Adaptado de Richmond (2004).

Determinadas espécies de microalgas possuem a capacidade de adaptação do metabolismo, da sua composição bioquímica e também sua morfologia devido a variação das condições ambientais (LEONARDI; POPOVIICH; DAMIANI, 2011). Por isso, é necessário considerar o método de nutrição correto e os vários aspectos da espécie utilizada para que os objetivos principais das pesquisas sejam alcançados.

3.3.2.2. Meio De Cultura

O meio de cultura empregado também apresenta alta relevância sobre o desenvolvimento das microalgas, afetando principalmente a taxa de crescimento e a composição química da biomassa produzida. Pode ser dividido em meios de cultura: quimicamente definidos, preparados a partir da adição de dosagens perfeitamente controladas de nutrientes em água com elevada pureza; semi-definidos, onde uma dosagem conhecida de determinados componentes é adicionada a um meio não totalmente controlado, como por exemplo água do mar; e indefinidos, onde são adicionados uma quantidade desconhecida de nutrientes a um meio de cultura não controlado (LOURENÇO, 2006).

Os meios de cultura definidos normalmente são constituídos de reagentes químicos comerciais. Esta composição limita o processo devido aos altos custos de produção (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014a). A substituição dos meios definidos por meios alternativos apresenta-se como uma forma eficaz de minimizar os custos, e ainda, procurar estabelecer um substrato eficiente ao cultivo de microalgas (MOREIRA, 2007).

Os meios indefinidos apresentam baixo custo quando comparados aos meios totalmente definidos, mas a falta de composição química estável acarreta problemas para a condução do cultivo, além de que, estudos relacionados a nutrição de microalgas é dificultosa (LOURENÇO, 2006). Desta forma, os meios semi-definidos podem se apresentar como uma alternativa atrativa para a reprodução de microalgas.

Os meios de cultura semi-definidos apresentam custos relativamente baixos, viabilizando o uso em atividades variadas, como a manutenção de estoques de cultivos em laboratório, a realização de pesquisas e a produção de biomassa algácea com finalidade comercial.

Os meios de cultura podem ainda receber ou não concentrações adicionais de nutrientes com o intuito de melhorar as condições de crescimento das microalgas. Os cultivos onde são adicionados nutrientes são conhecidos como enriquecidos, já onde não há adição dos mesmos, são os não enriquecidos (LOURENÇO, 2006). Também podendo ser chamados de sistemas suplementados ou não suplementados.

3.3.2.3. Sistemas de cultivo

No decorrer dos estudos relacionados as microalgas, foram desenvolvidos diferentes sistemas de cultivo. Vários biorreatores foram projetados, com estruturas, formas e arranjos variados, objetivando melhorar o desenvolvimento das microalgas. Estes biorreatores puderam ser divididos em sistemas abertos, fechados e híbridos (LOURENÇO, 2006; SILVA, 2016).

Os sistemas de cultivo abertos possuem características semelhantes aos locais onde são encontradas a maioria das microalgas no meio ambiente, porém sua estrutura é otimizada para melhorar as condições de cultivo. Vários destes sistemas utilizam suportes para a produção, como a utilização de pás giratórias e braços giratórios para a movimentação do meio de cultura e aeração do meio (Figura 3.6).

Esses tanques abertos são os sistemas mais utilizados por possuir baixo custo de construção e operação (MORWEISER et al., 2010), principalmente devido aos materiais utilizados serem acessíveis, como por exemplo, concreto, tijolos ou até mesmo terra compactada. O sistema ainda pode ser construído em locais degradados e terras com baixo potencial agrícola (ANDERSEN, 2005).



Figura 3.6: Ao lado esquerdo, um biorreator do tipo tanque aberto; do lado direito, uma lagoa natural contendo microalgas. Fonte: Borghetti (2009).

Existem alguns inconvenientes relacionados aos cultivos abertos, principalmente pelo aumento das chances de contaminação biológica, que influencia negativamente a produção. A diminuição da quantidade de luz decorrente da

profundidade dos biorreatores abertos também é considerada desfavorável, delimitando uma baixa profundidade dos tanques construídos, e conseqüentemente, biorreatores com baixos volumes cultiváveis. Essa forma de cultivo apresenta baixas densidades celulares finais, que aumenta o custo da colheita da biomassa produzida e evidencia um gargalo na produção (LOURENÇO, 2006; MORWEISER et al., 2010; PENG et al., 2015).

Os sistemas fechados são diferenciados dos anteriores, pois apresentam capacidade de controle superior devido ao contato mínimo do cultivo com fatores bioclimáticos (HARUN et al., 2010). Este controle operacional é a principal vantagem apresentada pela utilização de biorreatores fechados, pois eles possibilitam minimizar possíveis contaminações biológicas, regulação de potencial hidrogeniônico (pH), temperatura, além da homogeneização uniforme do meio e conseqüentemente aumento da produtividade (HARUN et al., 2010; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Os fotobiorreatores (Figura 3.7) se destacam como os principais modelos nos sistemas de cultivos fechado. Apresentam vários pontos positivos como os citados anteriormente e são alvo de extensivos estudos na atualidade, na busca por otimização da produtividade e minimização dos custos operacionais para possibilitar a aplicação em larga escala (MORWEISER et al., 2010), porém ainda apresentam altos custos de implantação e operação quando comparados aos sistemas abertos (PENG et al., 2015).



Figura 3.7: Modelos de fotobiorreatores fechados. Fontes: Souza (2012), Locare (2018).

Os sistemas híbridos combinam os cultivos abertos e fechados, onde primeiramente é realizado o cultivo nos sistemas fechados, com a finalidade de elevar a densidade celular e evitar contaminações. Após o cultivo em sistema fechado, as microalgas são transferidas para tanques abertos (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014b). Este modo de cultivo ganhou destaque na atualidade pois minimiza os altos custos de produção encontrados em cultivos de sistema fechado e a contaminação encontrada nos sistemas abertos, porém apresenta custos de implantação mais elevados quando comparados aos outros dois sistemas (ADESANYA et al., 2014).

3.3.2.4. Forma de operação do cultivo

A classificação dos métodos de cultivo mostra as diferentes formas de operação dos biorreatores, dividida basicamente em cultivos em batelada (estanque), cultivos semicontínuos e cultivos contínuos (ANDERSEN, 2005; RIZWAN et al., 2018).

Os cultivos em batelada são demarcados pela adição inicial do meio de cultura no biorreator, seguido pela inoculação de células no processo de produção. A partir disto, nenhum outro componente é inserido no sistema até o encerramento do cultivo. Aportes para amostragem podem ser realizados durante esse processo, porém não há reposição do volume removido (LOURENÇO, 2006).

Nos cultivos em batelada também ficam evidenciados as cinco fases de crescimento dos microrganismos (Figura 3.8), independentemente do tempo de duração presente em cada uma delas. Os meios são modificados intensamente ao longo destas fases devido ao crescimento celular, consumo de nutrientes e liberação de metabólitos celulares (LOURENÇO, 2006).

No cultivo semicontínuo, a produção é realizada através da introdução dos componentes (meio de cultivo e inóculo) nos biorreatores. Após um período, parcelas são retiradas e renovadas por meio de cultura puro. A função principal desse método de cultivo é realizar a coleta e reintroduzir nutrientes durante a fase exponencial do cultivo, com a finalidade de mantê-lo com atividade celular alta e conseqüentemente aumentar a produtividade. A limitação imposta por este método de cultivo é a chance

de contaminação devido ao elevado manejo aplicado ao cultivo (ANDERSEN, 2005; LOURENÇO, 2006).

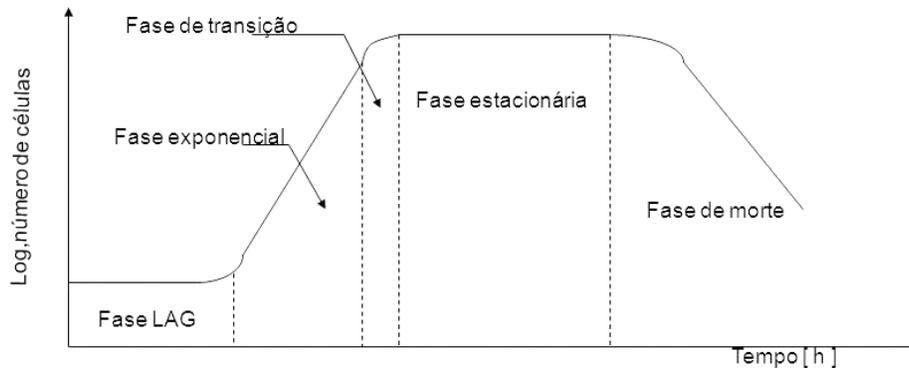


Figura 3.8: Fases do crescimento microalgal. Fonte: Adaptado de Rettori e Volpe (2000).

Os cultivos contínuos são processos permanentemente balanceados com a entrada de meio de cultura e saída de meio com a biomassa de interesse, caracterizando assim, um cultivo em estado firme tendendo ao infinito. Este método de cultivo é mais complexo quando comparado aos outros, devido aos cuidados constantes necessários e os custos também se elevam em função disto (LOURENÇO, 2006).

3.3.3. FATORES COM INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO

O cultivo de microalgas sofre influência de vários fatores biológicos, químicos e físicos envolvidos no desenvolvimento celular. Nos estudos realizados, a busca por condições ótimas de cultivo com capacidade de potencializar a produtividade são extremamente importantes para alcançar resultados satisfatórios (ANDERSEN, 2005; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014b). Além de que, a modificação dos fatores do meio de cultura altera consideravelmente o metabolismo e a morfologia das células de microalgas (LEONARDI; POPOVIICH; DAMIANI, 2011), modificando também as características bioquímicas da biomassa obtida ao final do cultivo.

Dentre os fatores com capacidade de interferência significativa sobre a produção de microalgas estão: temperatura; potencial hidrogeniônico (pH);

luminosidade; agitação e aeração; pureza da cultura e salinidade; (ANDERSEN, 2005; RIZWAN et al., 2018). Estes fatores serão discutidos a seguir para demonstrar como influenciam no processo de produção.

3.3.3.1. Temperatura

Os microrganismos vivos são altamente influenciados pela temperatura, principalmente devido a interferência causada na velocidade das reações celulares, na taxa metabólica, na composição celular e na concentração de biomassa produzida. A temperatura presente em cultivos deve respeitar a aceitabilidade de cada espécie de microalga, pois a adaptabilidade de algumas espécies ocorre somente em determinadas faixas de temperatura.

Usualmente emprega-se uma faixa entre 16°C e 37°C como ideal para o cultivo de microalgas (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014a; LOURENÇO, 2006). Porém, estudos relatam espécies tolerantes a altas temperaturas, como é o caso de determinada cepa de *Chlorella* sp. capaz de suportar temperaturas de até 42°C (SAKAI et al., 1995).

Estudos laboratoriais realizados com a finalidade de avaliar o crescimento das microalgas utilizam o controle da temperatura durante o processo de produção, buscando possibilitar a replicação dos experimentos, principalmente porque a temperatura afeta na forma com que as células metabolizam os componentes do meio e na energia de ativação das reações bioquímicas (BORGHETTI, 2009). Além disso, a temperatura afeta diretamente o teor de proteínas, carboidratos e lipídeos produzidos pelas microalgas.

3.3.3.2. Potencial hidrogeniônico (pH)

Esse parâmetro pode ser considerado muito relevante para o desenvolvimento das microalgas, pois determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio de cultura, portanto, tem efeito direto ou indireto sobre o metabolismo das células

(ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014a). Além disto, Rizwan et al. (2018), afirma que o pH tem grande influência sobre a produção de agentes microbianos no meio.

Em cultivos de microalgas, a variação do pH ocorre de acordo com a composição do meio de cultura, presença de bicarbonatos, temperatura, capacidade tamponante, níveis de dióxido de carbono dissolvido e atividade metabólica das células, entre outros (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014a; BORGHETTI, 2009; TOMAS, 2016).

Cada espécie de microalgas demanda uma diferente faixa de pH para sua sobrevivência, reprodução e metabolização de nutrientes. Os autores evidenciam uma ampla faixa de pH utilizada para a produção do gênero *Chlorella sp.*, porém valores neutros e alcalinos são aconselháveis aos cultivos (RAVEN, 1990).

3.3.3.3. Luminosidade

Espécies fotossintetizantes necessitam estritamente de luz para o seu desenvolvimento, sejam elas fotoautotróficas ou fetoheterotróficas (RICHMOND, 2004). Os níveis de energia luminosa estão estritamente ligados a quantidade de carbono fixado pelas células, e repercutem na velocidade de crescimento, na quantidade de biomassa e no tipo de biomassa produzida no cultivo (DERNER, 2006).

A luminosidade pode ser classificada por dois termos distintos, sendo: o primeiro conhecido como fotoperíodo, que determina o tempo de exposição diária das culturas microalgais a luz, divididos em ciclos de claro e escuro; o segundo termo está relacionado a qualidade e intensidade da luz, ou seja, relaciona-se ao comprimento da onda espectral aplicada sobre a cultura (RICHMOND, 2004). Estes dois termos têm alta influência direta sobre os cultivos de microalgas.

A regulação da luminosidade aplicada ao sistema é fundamental durante todo o processo de produção, para que sejam dispostos níveis e períodos de forma adequada para o cultivo ocorrer da melhor forma possível. A variação e aplicação inadequada da iluminação afetam de forma significativa os resultados finais do cultivo, sejam eles a quantidade de biomassa produzida, como as características da biomassa

produzida (RICHMOND, 2004). Exemplo disso é a fotoinibição, causada pelo excesso de iluminação que afeta os fotossistemas das células.

Comumente os fotoperíodos são fixados em 12 horas de luz: 12 horas de escuro ou 16 horas de luz:8 horas de escuro de forma a fixar está variável e melhorar a manutenção dos cultivos, auxiliando na reprodução em outros estudos (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014a). Segundo (LOURENÇO, 2006), a exposição a fotoperíodos com maiores horas de luz estimulam maior produção de biomassa em cultivos. Cultivos heterotróficos por outro lado utilizam ciclos completamente escuros para a produção de microalgas (RICHMOND, 2004).

3.3.3.4. Aeração e agitação

A agitação é um fator muito importante para a distribuição homogênea dos nutrientes, para evitar a sedimentação das células, evitar a estratificação térmica e também a deposição de matéria orgânica no fundo do biorreator (BORGHETTI, 2009; RICHMOND, 2004).

A aeração é de extrema importância para a respiração das microalgas, principalmente pela necessidade de dióxido de carbono inorgânico (CO₂) que as plantas apresentam para seu desenvolvimento (RICHMOND, 2004). A adição do meio com CO₂ durante a aeração é alvo de várias pesquisas desenvolvidas na atualidade. Esta prática aumenta substancialmente a densidade celular alcançada nos cultivos (LI et al., 2018; NAYAK et al., 2018).

Nos estudos realizados em laboratórios, o cultivo geralmente recebe agitação e aeração de maneira simultânea através da injeção de ar por mangueiras acopladas a bombas externas (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014a). Esses fatores devem ser sempre controlados, pois altos níveis podem causar efeitos adversos ao cultivo devido ao cisalhamento causado pela alta agitação de água e a colisão com outras microalgas. Isto pode acarretar no desmembramento das células e conseqüentemente morte (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2004).

A relação baixa destes fatores atrelado a ação gravitacional podem causar a deposição celular no fundo dos biorreatores, dificultando o acesso das microalgas aos nutrientes e diminuindo as taxas de reprodução (RICHMOND, 2004).

3.3.3.5. Pureza da Cultura

O grau de pureza envolve a possibilidade de existência de diferentes microalgas ou microrganismos (bactérias e fungos) no cultivo. Duas categorias distintas são levantadas quando relaciona-se a pureza com a quantidade de espécies de microalgas na produção de microalgas: monoalgáceos, onde há presença de somente uma população de microalga no cultivo; e o misto, quando existem duas ou mais espécies cultivadas no meio (LOURENÇO, 2006).

Cultivos monoalgáceos são mais comumente utilizados nas pesquisas, pois proporcionam maior capacidade de controle dos resultados. Porém estudos buscando avaliar a competição de recursos entre duas espécies são desenvolvidos em cultivos mistos (LOURENÇO, 2006).

A presença de outros agentes microbianos ou a inexistência dos mesmos são designadas por dois termos, cultivos axênicos e não-axênicos (ou xênicos), onde os cultivos axênicos são caracterizados por serem constituídos somente pelas microalgas de interesse, sem a presença de outros microrganismos como bactérias e fungos. Os cultivos não-axênicos possuem outros microrganismos em convívio com a microalga. Isto não necessariamente apresenta um obstáculo na produção, desde que os outros microrganismos apresentem baixas densidades celulares quando comparados as microalgas de forma a não disputar pelos nutrientes presentes no meio (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2004; TU et al., 2018).

3.3.3.6. Salinidade

O efeito da salinidade sobre as microalgas está ligado principalmente aos mecanismos bioquímicos do desenvolvimento e crescimento celular. Várias espécies são capazes de sobreviver em meios salinos ou salobros. As microalgas adaptáveis

aos meios salinos são conhecidas como halotolerantes, já as microalgas halofílicas são as espécies que necessitam estritamente de sal para seu desenvolvimento ótimo (RAO et al., 2007; VENKATA MOHAN; DEVI, 2014).

Altas salinidades levam muitas microalgas ao estresse celular, e assim, alteram seu metabolismo para se adaptar ao meio ambiente (KAN et al., 2012). Estes microrganismos são alterados através da variação do conteúdo lipídico celular (KALITA et al., 2011), dos carotenoides (SHARIATI; HADI, 2011) e produção de polióis (RICHMOND, 2004). Desta forma, a salinidade tem elevada importância sobre as características bioquímicas da biomassa ao final do cultivo.

3.3.4. BICARBONATO DE SÓDIO EM CULTIVOS

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) é um sal composto pelo ânion poliatômico (HCO_3)²⁻ (hidrogeno carbonato) e pelo cátion Na^{1+} (sódio), com característica sólida e coloração branca nas condições ambientes (EL-NAAS; AL-MARZOUQI; CHAALAL, 2010).

A produção de bicarbonato de sódio é realizada através do processo conhecido como Solvay (Figura 3.9), em homenagem ao pesquisador Ernest Solvay (1881). O processo é considerado um mecanismo limpo devido a captura de CO_2 (EL-NAAS; AL-MARZOUQI; CHAALAL, 2010).

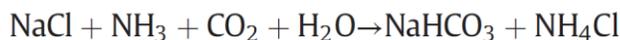


Figura 3.9: Reação de Solvay. Fonte: El-Naas, Al-Marzouqi e Chaalal (2010).

No processo Solvay, o gás amoníaco e o gás carbônico são inseridos em uma solução de cloreto de sódio (saturada) com o intuito de formar o cloreto de amônio solúvel e um precipitado de bicarbonato de sódio. Ao final do processo, a amônia pode ser recuperada através do aquecimento do cloreto de amônio com hidróxido de cálcio (EL-NAAS et al., 2017).

O bicarbonato de sódio é amplamente utilizado no mundo inteiro para diversas finalidades. Uma das aplicações estudada nos últimos anos é a suplementação em

cultivos de microalgas (LI et al., 2018; MONDAL et al., 2017; NAYAK et al., 2018; SHAH et al., 2016).

A utilização de meios enriquecidos com bicarbonato de sódio traz vários efeitos positivos para o cultivo de microalgas, dentre eles, a capacidade tamponante do bicarbonato que eleva a estabilidade dos níveis de pH para o meio de cultivo. A dissociação do composto no meio acarreta em meios mais alcalinos, que por sua vez, são mais aconselhados do que meios ácidos ao cultivo de microalgas (NAYAK et al., 2018; WANG; WANG; LI, 2014).

A utilização de bicarbonato de sódio como antibactericida em meios de cultivo é comprovada pelo estudo realizado por Tu et al. (2018), onde foi relatada a diminuição dos níveis de até 91% *Escherichia coli*. A prática pode ser comparada ao uso de antibióticos, e por sua vez, pode ser considerada promissora, pois os valores do composto são relativamente baixos e superam um importante gargalo para a produção de microalgas.

O composto também pode ser conferido como uma fonte extra de carbono no meio, pois há dissociação do composto em carbonatos em contato com temperaturas altas ou na presença de bases. Várias microalgas são capazes de utilizar carbonatos como fonte de nutrientes através da sua assimilação (ANDERSEN, 2005; RIZWAN et al., 2018).

Relatos da elevação do teor de lipídeos pela adição de sais foram desbravados anteriormente, na seção 3.3.3.6. Outros estudos evidenciam o aumento considerável da produção de lipídeos devido ao estresse causado pela adição de bicarbonato de sódio no meio de cultivo (MONDAL et al., 2017; SHAH et al., 2016). Estes fatos demonstram os benefícios da utilização do bicarbonato de sódio como suplemento na produção de microalgas.

3.3.5. APLICAÇÕES E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS

Estudos e tecnologias desenvolvidos para o cultivo de microalgas estão relacionados principalmente aos compostos produzidos na biomassa (SOUZA, 2012;

SPOLAORE et al., 2006). A utilização destes compostos está relacionada a alimentação, pois é realizada desde a antiguidade (DERNER, 2006; LOURENÇO, 2006). Atualmente, este mercado é explorado em vários países de todas as regiões do mundo, como ingredientes introduzidos na produção de produção de pães, massas, bebidas, sopas, biscoitos e outros (RIZWAN et al., 2018).

A aplicação comercial das microalgas, todavia, não se aplica somente a indústria alimentícia, principalmente pela sua capacidade de produção de diferentes compostos bioquímicos e potencial renovável (DERNER, 2006; RIZWAN et al., 2018), que conferem as microalgas uma vasta aplicação sobre as mais diversas áreas (Figura 3.10), tais como: suplementação alimentar para seres humanos, devido as elevadas fontes de proteínas, vitaminas essenciais, carotenoides e antioxidantes; extração de substâncias utilizadas na produção de drogas antimicrobianas, antivirais e remediadoras do câncer; produção de cosméticos; tratamento de efluentes industriais e domésticos; mitigação dos gases de efeito estufa; fertilização dos solos e das plantas; fitorremediação de solos; obtenção de enzimas, lipídeos, polímeros, toxinas, pigmentos e produção de diversos biocombustíveis (LOURENÇO, 2006; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; RICHMOND, 2004; RIZWAN et al., 2018).

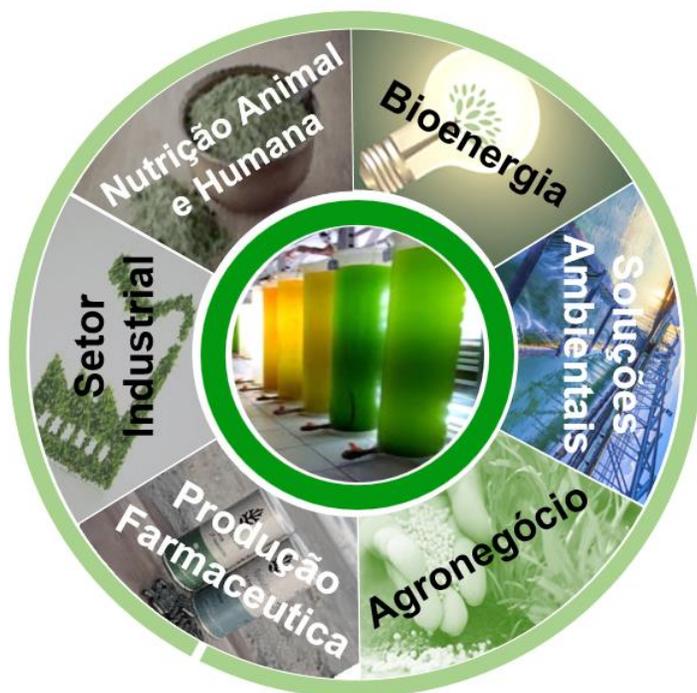


Figura 3.10: Aplicações das microalgas na atualidade. Fonte: Santos (2019).

O potencial de utilização das microalgas para a produção de biocombustíveis é evidenciado, principalmente pela alta capacidade de produção de biomassa que elas apresentam (RICHMOND, 2004), além de serem consideradas um modelo verde de produção, por apresentarem bioprocessamento e tecnologias químicas de baixo impacto ambiental (SUGANYA et al., 2016). Como exemplo de modelo sustentável podemos destacar a capacidade de fixação de CO₂ e capacidade de assimilação de compostos poluentes.

A utilização de microalgas na produção de biocombustíveis substitutos do petróleo vem ganhando destaque gradativamente. As tecnologias desenvolvidas atualmente demonstram o potencial das microalgas de se tornarem altamente rentáveis nessa área do mercado através de estratégias de integração de valores por coprodutos finos de alto valor, como β-caroteno, astaxantina e C-ficocianina (RIZWAN et al., 2018).

A produção de biocombustíveis provenientes de microalgas é variada. Pesquisas destacam a produção de biohidrogênio através da foto-catálise celular (KAPDAN; KARGI, 2006), o biogás obtido através da digestão anaeróbia da biomassa residual de outros processos (CHISTI, 2007; SPOLAORE et al., 2006) e a produção de biodiesel através da elevada quantidade de lipídeos produzida na biomassa (BORGHETTI, 2009; CHISTI, 2007).

3.3.5.1 Biodiesel

O combustível designado biodiesel é resultado da conversão de lipídeos de origem animal ou vegetal em compostos com características semelhantes ao diesel de petróleo. Este biocombustível ganha destaque por ser produzido através de fontes renováveis de energia mediante a reações químicas conhecidas como transesterificação, esterificação (Figura 3.11) ou hidroesterificação (DELATORRE et al., 2011; TOMAS, 2016).

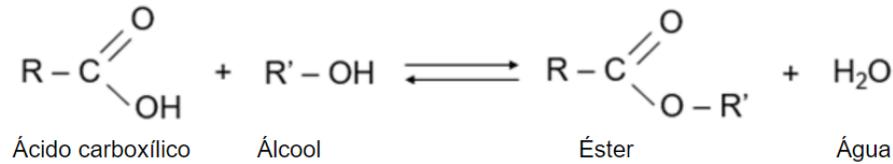


Figura 3.11: Reação de Esterificação para obtenção de biodiesel. Fonte: Adaptado de Melo (2007).

O biodiesel apresenta-se como uma fonte de energia com elevado potencial de substituição ao diesel de petróleo, pois suas características físicas e químicas garantem sua utilização em motores de ciclo diesel com a mínima necessidade de adaptação dos componentes (DELATORRE et al., 2011).

No Brasil, a regulamentação do biodiesel é realizada pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). A mesma, define biodiesel (B100) através da resolução n. 7, de 19/03/2008 como o “combustível composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais”.

Através dos avanços das políticas relacionadas ao desenvolvimento sustentável, regulamentações relacionadas a utilização de biodiesel são cada vez mais implementadas, tornando o combustível indispensável para nossa matriz energética. A exemplo disto, atualmente o diesel comercializado necessita de misturas obrigatórios de 10% de biodiesel (B10) desde março de 2019 (Brasil, 2016).

Este biocombustível apresenta vários outros pontos positivos no cenário ambiental, quando comparado ao diesel de petróleo, pois além de ser renovável e biodegradável também se caracteriza por uma combustão menos poluente. Ele emite menores quantidades de monóxido de carbono atmosférico, de material particulado (fumaça) e de óxidos de enxofre (SOx) (GONG; JIANG, 2011)

A matéria-prima utilizada na produção de biodiesel podem ser originárias de várias fontes animais ou vegetais. Dentre as fontes vegetais podemos destacar a mamona, dendê, girassol, pinhão manso, e principalmente a soja. Como fontes animais destacamos gordura obtida através resíduos do processamento de bois, peixes, frangos e porcos (vísceras), além das alternativas de produção de biodiesel

através de óleos residuais de frituras resultantes de processos industriais e comerciais (DELATORRE et al., 2011).

A composição química dos lipídeos é variável e podem ser divididas em glicerídeos (monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos) e ácidos graxos livres. Para a aplicação na produção de biodiesel, somente as porções lipídicas compreendidas pelos ácidos graxos livres e triglicerídeos são susceptíveis a produzir biocombustíveis de qualidade (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2008).

3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de meios alternativos em cultivos de microalgas pode ser considerada uma alternativa para minimizar os custos de produção e desta forma auxiliar na viabilização da produção de biodiesel a partir desta cultura. A utilização da manipueira enriquecida para a composição do meio de cultivo visa a sustentabilidade do ciclo produtivo, principalmente pela reciclagem de um resíduo em nova cadeia produtiva. Na primeira fase do trabalho, foi realizada a comparação de duas estirpes de *Chlorella sp.* sob diferentes métodos de nutrição. A escolha do bicarbonato de sódio como fonte suplementar ao meio de cultivo foi realizada principalmente pelas características que o composto oferece ao meio, visto que otimiza a condições de crescimento mixotrófico da microalga em vários aspectos. Poucos trabalhos relacionados a esta temática foram encontrados na literatura em ambos os sentidos, seja na utilização da manipueira para a composição do meio de cultivo ou na suplementação com bicarbonato de sódio, demonstrando a necessidade de aprofundamento dos conhecimentos nesta área. Além disto, nenhum trabalho relacionado a produção de microalgas utilizando o meio alternativo composto por manipueira suplementada com bicarbonato de sódio foi encontrada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMOS

As microalgas do gênero *Chlorella sp.*, objeto desta pesquisa são oriundas de duas diferentes fontes. O primeiro inóculo foi gentilmente cedido pelo Instituto de Oceanografia da Universidade de São Paulo (IOUSP), onde se encontra o Banco de Microrganismos Aidar & Kutner com a cepa denominada BMAK07. O segundo inóculo foi gentilmente cedido pelo professor Phd. Adilson Ricken Schuelter, disponível no banco de microalgas do laboratório de Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), isolada em 2016 e intitulada como PPEQ-02.

4.2. EFLUENTE UTILIZADO

O efluente foi doado pela indústria Fino Alimentos Ltda., localizada no distrito de Concórdia do Oeste, no município de Toledo/PR - Brasil. Nessa unidade industrial, é realizada a produção de fécula de mandioca e conseqüentemente gerada grande quantidade de manipueira (Figura 4.1).



Figura 4.1: Processos unitários onde há geração de manipueira. Fonte: Santos (2019).

As coletas da manipueira utilizada nos experimentos foram realizadas com frascos plásticos previamente identificados, que após a coleta foram acondicionados em caixas de isopor com gelo para o transporte até o laboratório. Em seguida, foram acondicionadas em congelador (Figura 4.2), no Laboratório de Qualidade de Água, do

Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia (Gerpel), Unioeste – Toledo/PR.



Figura 4.2: Amostras de manipueira armazenadas em congelador. Fonte: Santos (2019).

As seguintes análises foram realizadas para caracterizar o efluente utilizado no experimento: pH, DQO, cor verdadeira e sólidos sedimentáveis.

4.3. AMBIENTE DE CULTIVO

O ambiente de cultivo aplicado aos experimentos foi parcialmente controlado e construído em bancada dotada de iluminação realizada por lâmpadas fluorescentes na parte posterior aos biorreatores, com o intuito de favorecer a luminosidade nos cultivos (Figura 4.3). A temperatura ambiente foi acompanhada e regulada por ar-condicionado para limitar as variações. Além disso, foram utilizadas bombas de aquário ligadas a tubos de silicone e pipetas de vidro para manter a aeração e movimentação do meio de cultivo, afim de evitar a decantação das células no biorreator.

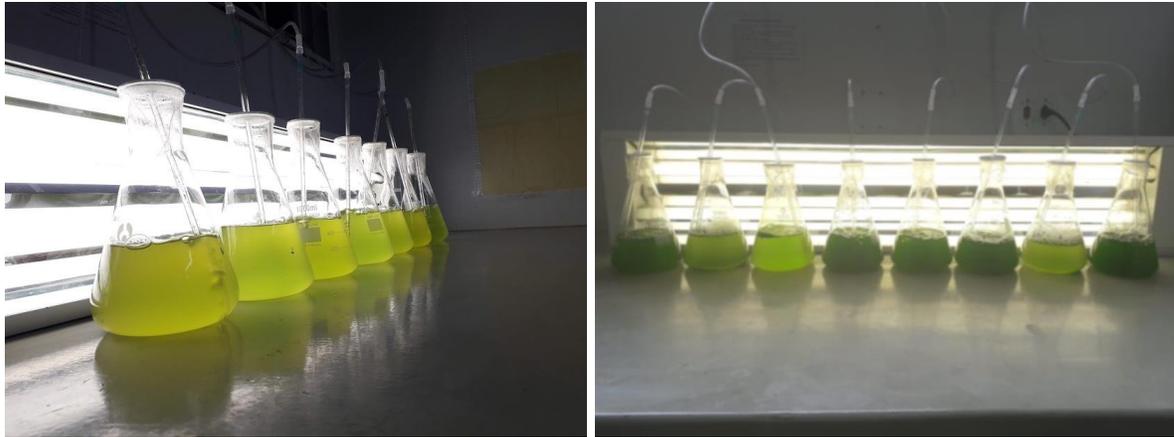


Figura 4.3: Ambiente de crescimento das microalgas. Fonte: Santos (2019).

As posições dos biorreatores foram alternadas diariamente para garantir a variabilidade e a aleatoriedade nos experimentos, sem afetar a casualidade dos resultados e minimizar as chances de erro. Também foi realizada a agitação manual diária com o intuito de suspender as células das microalgas acumuladas no fundo dos biorreatores.

As características do ambiente de cultivo estão descritas a seguir, de forma a demonstrar discriminadamente a operação dos experimentos:

- Sistema de cultivo: Fechado, com biorreatores do tipo Erlenmeyer;
- Método de operação: Batelada;
- Aeração e agitação: contínua através de bombas de ar ($8,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$);
- Sistema de controle da temperatura: Ar-condicionado split 12.000 BTU;
- Sistema de iluminação: Lâmpadas Fluorescentes (20 watts);
- Biorreatores: Erlenmeyer de 250 mL, 500 mL e 1.000 mL.
- Complementos: tubos de plástico atóxico, pipetas graduadas (2 mL) e tubos de látex.

4.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para uma melhor compreensão das etapas do estudo, os experimentos foram divididos em diferentes estágios, conforme descrito na Figura 4.4, a seguir.

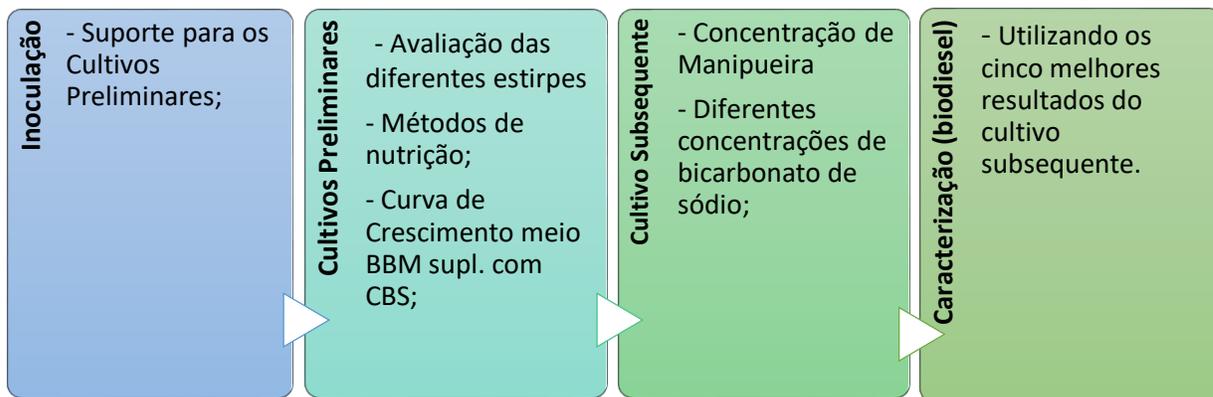


Figura 4.4 – Fluxograma do esquema de realização dos experimentos. Fonte: Santos (2019).

4.4.1. Inoculação

A primeira fase do estudo buscou obter uma densidade celular apropriada para os próximos experimentos. Para isso, foi realizada a inoculação da microalga *Chlorella sp.* (PPEQ-02 e BMAK07) em Meio Bold's Basal (BBM) adaptado do método utilizado pela Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) (2014), preparado conforme descrito posteriormente.

Primeiramente, foram preparadas as soluções estoque através de adição das quantidades estipuladas (Tabela 4.1) dos reagentes em 500 mL de água deionizada dispostas em 6 Erlenmeyers distintos. Foram preparadas também as soluções de elementos traço, através da adição dos reagentes em 4 Erlenmeyers, sendo divididas em soluções (1), (2), (3) e (4). Após isto, as soluções foram autoclavadas por 20 minutos, com temperatura regulada em 120 °C, com a finalidade de dissolução dos reagentes no meio. Os reagentes foram então acondicionados em refrigerador e utilizados conforme a necessidade dos estudos, como descrito na preparação do meio (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Composição química do meio de cultura padrão BBM.

Soluções Estoque (g.L⁻¹)	
NaNO ₃	25,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5
NaCl	2,5
K ₂ HPO ₄	7,5
KH ₂ PO ₄	17,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5
Soluções Traço* (g.L⁻¹)	
(1) ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44
MoO ₃	0,71
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49
(2) H ₃ BO ₃	11,4
(3) Na ₂ EDTA	50,0
KOH	31,0
(4) FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98
H ₂ SO ₄ (conc.)	1,84
Preparação do Meio (L⁻¹)	
Soluções Estoque	10.0 mL
Soluções Traço	1.0 mL

Fonte: CCAP (2014).

A inoculação das microalgas foi iniciada através da transferência das cepas para o meio de cultura líquido em Erlenmeyers de 250 mL, contido de 150 mL de meio de cultura. Os Erlenmeyers foram dispostos em ambiente de cultivo (27 ± 2 °C) para o desenvolvimento da cultura durante um período de 15 dias até alcançar alta densidade.

Os meios foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 500 mL, aos quais foram adicionados 250 mL de BBM para garantir a necessidade nutricional do inóculo durante período posterior. Após a transferência, os biorreatores foram mantidos sob regime de crescimento autotrófico durante mais 8 dias, com a finalidade de alcançar a concentração inicial suficiente para os cultivos preliminares. A partir disto, foram mantidos durante todo o experimento, cultivos paralelos em meio líquido (BBM) com a finalidade de manter o inóculo necessário para a realização dos cultivos.

A função principal da manutenção da cultura foi garantir a viabilidade dos microrganismos em condições adequadas para realização dos estudos e ainda manter a coleção *in vivo* de forma axênica evitando assim, possíveis contaminações ocasionadas nos cultivos. Segundo Andrade e Colozzi (2014a), os métodos de preservação devem apresentar simplicidade, baixo custo e rápida execução para serem eficientes. Por isto foi escolhida a manutenção em meio líquido.

Todos os procedimentos de transferência e inoculação foram realizados em câmara de fluxo laminar previamente desinfetados com álcool 70% e UV por 15 minutos.

4.4.2. Cultivo preliminar

Os cultivos realizados nesta fase do estudo visaram realizar uma análise prévia do desenvolvimento das microalgas no meio enriquecido com manipueira. Para isso, os cultivos foram preparados utilizando BBM e manipueira na razão de 4:1 (v/v), da mesma forma como o melhor resultado da mistura obtido por Borghetti (2009).

Estes cultivos tiveram como função avaliar o método de nutrição (Tabela 4.2) com maior potencialidade de crescimento da densidade de microalgas e obtenção de lipídeos no meio enriquecido de manipueira. Isto foi obtido através da avaliação da concentração máxima de biomassa e de lipídeos produzidos pelas microalgas. Para isto, foi realizado um cultivo em biorreatores durante o período de 120 horas para avaliar a biomassa máxima produzida pelas microalgas.

Tabela 4.2: Delineamento experimental ²² utilizados no cultivo preliminar.

Cepas	Nutrição
PPEQ – 02	Mixotrófica
PPEQ – 02	Heterotrófica
BMAK07	Mixotrófica
BMAK07	Heterotrófica

Fonte: Santos (2019).

Os biorreatores utilizados nesta fase do cultivo foram Erlenmeyers com volume útil de 1000 mL, preenchidos com 600 mL de cultura com proporções de 80% de meio

de cultura com manipueira e 20% de inóculo na fase de crescimento exponencial (BORGHETTI, 2009), considerando 250 mg.L^{-1} de inóculo inicial correspondente a 50 mg.L^{-1} no meio. O pH inicial do meio de cultura para os experimentos foi de 6,45.

Os cultivos realizados sob condições heterotróficas receberam vedação com papel alumínio, impedindo qualquer entrada de luz possível para que somente fosse realizada a assimilação de compostos orgânicos pelas microalgas. Os cultivos mixotróficos receberam iluminação por 24 horas (fotoperíodo integral) na câmara de crescimento para que também ocorresse o processo de fotossíntese.

Durante esta fase de experimento, também foi realizada a avaliação do crescimento da cepa com maior potencial de crescimento em BBM enriquecido com 0,1% (p/v) de bicarbonato de sódio, com a finalidade de verificar a capacidade da microalga em crescer sob este tipo de suplementação, sem sofrer inibição de crescimento. Para isto, foram realizados cultivos em biorreatores como os descritos anteriormente, com o mesmo volume útil de cultura (600 mL), com proporções de 80% de meio de cultura e 20% de inóculo em fase de crescimento exponencial, onde o inóculo inicial contido de aproximadamente 625 mg.L^{-1} , após inoculado no cultivo, correspondeu a 125 mg.L^{-1} de concentração.

Estes cultivos receberam as mesmas condições de iluminação do cultivo mixotrófico, através de fotoperíodo integral na câmara de crescimento. O pH inicial da cultura foi estabelecido em 8,43 e o crescimento foi monitorado pelo período de 240 horas ao final do cultivo.

4.4.3. Cultivo subsequente

Nesta fase do estudo, foi realizado um delineamento experimental utilizando as variáveis concentração de manipueira (CM) e bicarbonato de sódio (CBS), com a finalidade de avaliar o efeito sobre o crescimento das microalgas. Para isto, foi realizado um delineamento de composto central rotacional ($-\alpha$, -1 , 0 , 1 , α) conforme demonstrado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Delineamento experimental DCCR realizado no cultivo subsequente.

Ensaio	VARIÁVEIS CODIFICADAS		VARIÁVEIS REAIS	
	CM	CBS	CM	CBS
1	-1	-1	7	2,2
2	-1	1	7	12,8
3	1	-1	26	2,2
4	1	1	26	12,8
5	0	0	17	7,5
6	0	0	17	7,5
7	0	0	17	7,5
8	0	0	17	7,5
9	0	0	17	7,5
10	0	0	17	7,5
11	0	-1,41	17	0,1
12	0	1,41	17	15,0
13	-1,41	0	3	7,5
14	1,41	0	30	7,5
Controle	-	-	-	-
Controle	-	-	-	-
Controle	-	-	-	-

Onde: DCCR = Delineamento de composto central rotacional; CM = Concentração de manipueira (%v/v); CBS = Concentração de bicarbonato de sódio (g.L⁻¹).

Fonte: Santos (2019).

Os parâmetros do cultivo foram fixados para minimizar os efeitos de variáveis “paralelas” sobre a resposta. Para isto, a câmara de crescimento foi ajustada para receber iluminação por 24 horas (fotoperíodo integral), assim como realizado no trabalho de Baumgartner et al., (2013). O sistema de iluminação artificial foi descrito na seção 4.3. Além disto, toda a água evaporada foi repostada diariamente com água deionizada.

Durante o processo de produção realizado nesta fase do estudo, foram avaliadas a produtividade através de quantificação da concentração celular (g.L⁻¹) e o teor de lipídeos (%m/m) produzidos pelas células. A partir disto, foi possível montar uma superfície de resposta para o modelo e definir o melhor ajuste para o modelo de produção, através de análises estatísticas dos dados utilizando STATISTICA 10.0 e ACTION 2.9.

Também foram realizadas várias amostragens da densidade óptica e os níveis de pH durante o funcionamento dos reatores, possibilitando montar os gráficos de desenvolvimento das microalgas no decorrer do tempo e também da variação de pH do cultivo.

É válido ressaltar que foram realizados controles do desenvolvimento da microalga utilizando o meio padrão BBM.

4.4.4. Caracterização Final

A utilização das microalgas na produção do biodiesel de qualidade depende diretamente do produto formado após as suas reações de formação. A partir disto, foi de suma importância ao trabalho realizar a caracterização de ésteres metílicos obtidos pela esterificação *in situ* da biomassa de microalgas e também nos melhores resultados da fase de cultivo subsequente, para avaliar a possibilidade de utilização do mesmo como combustível, com a finalidade de buscar as características do biodiesel produzido.

4.5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.5.1. Tratamento de Vidrarias e Meio de Cultivo

Primeiramente, foi feita a filtragem a vácuo da manipueira, com o objetivo de separar mecanicamente, os sólidos em suspensão do líquido por um meio filtrante (SILVA et al. 2014). Este procedimento teve como objetivo remover os sólidos que tem capacidade de ocasionar o efeito de varredura das células e assim alterar os resultados das análises posteriores.

Os Erlenmeyers utilizados nos cultivos das microalgas, bem como tubos de silicone atóxico e outras vidrarias, foram lavados com água e sabão neutro, em seguida enxaguados com água destilada e secos em estufa a 70°C por 12 horas.

Os meios de cultura foram levados aos Erlenmeyers, recobertos com papel alumínio e presos com elásticos látex, demonstrado na figura 4.5. A partir disso, foram

esterilizados por meio de autoclavagem, a temperatura de 121°C por 20 minutos, para evitar contaminações biológicas. Todos os outros procedimentos foram realizados em câmaras de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70% (p/v) e os outros instrumentos desinfetados através da suspensão em solução, preparada com hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% (v/v).

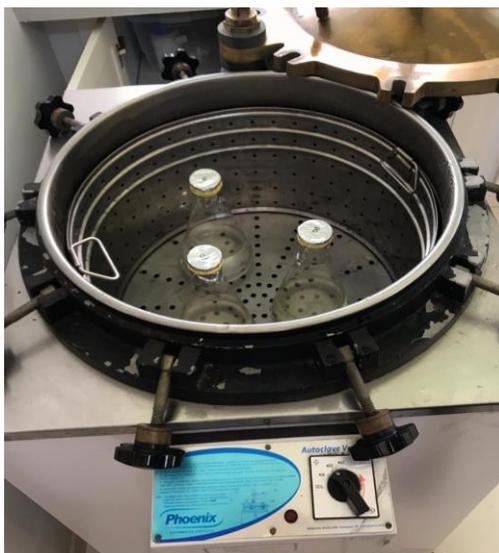


Figura 4.5: Meio de Cultura preparado para a autoclavagem Fonte: Santos (2019).

4.5.2. Análises de pH

Foi utilizado um pHmetro da marca Digimed (DM-2P) para a determinação do pH das amostras retiradas para avaliação das características do meio de cultivo durante o desenvolvimento celular.

4.5.3. Colheita das microalgas

Ao final dos cultivos, foi realizada a colheita das microalgas através do método de centrifugação. A recuperação da biomassa presente no meio foi possível através do fracionamento em tubos do tipo Falcon com 15 mL, seguidos pela centrifugação sob regime de funcionamento de 5000 rpm por 10 minutos em uma centrífuga de bancada Baby I, modelo 206-BL da marca FANEM.

A biomassa obtida após centrifugação foi levada a estufa a 60 °C para secagem até a completa evaporação da fração líquida, observada através da estabilização da massa. Foi então realizada a raspagem da biomassa utilizando espátula de aço,

seguida da trituração utilizando gral e pistilo. Por fim, realizou-se acondicionamento em potes plásticos que foram conduzidos ao congelador para a preservação das características físico-químicas da biomassa, até serem utilizadas nas fases posteriores do estudo.



Figura 4.6: Centrifuga recebendo o cultivo para iniciar a operação. Fonte: Santos (2019).

4.5.5. Desenvolvimento Celular

O desenvolvimento das microalgas durante o cultivo foi mensurado através da determinação diária da concentração celular. Esta determinação foi realizada através de análise da densidade óptica (670 nm) em espectrofotômetro UV-visível, modelo DR-2700 da marca Hach, com auxílio de curvas de calibração padrão obtidas para os cultivos de PPEQ-02 (anexo I).

A curva de calibração para crescimento autotrófico das microalgas PPEQ – 02 com adição de bicarbonato (Figura 4.7) exemplifica as curvas obtidas no estudo. Esta curva foi construída durante a fase exponencial de crescimento microalgal, através da determinação da absorbância de diferentes diluições (10; 20; 40; 60; 80; 100 %) e pela determinação do respectivo peso seco.

Para a determinação do peso seco, amostras de 50 mL foram filtradas a vácuo e os filtros foram levados em estufa a 60°C até massa constante e pesados. A curva foi construída através de *software* estatístico Action 2.9 com coeficientes de regressão: R^2 , superior a 0,99; R^2 ajustado, superior a 0,99.

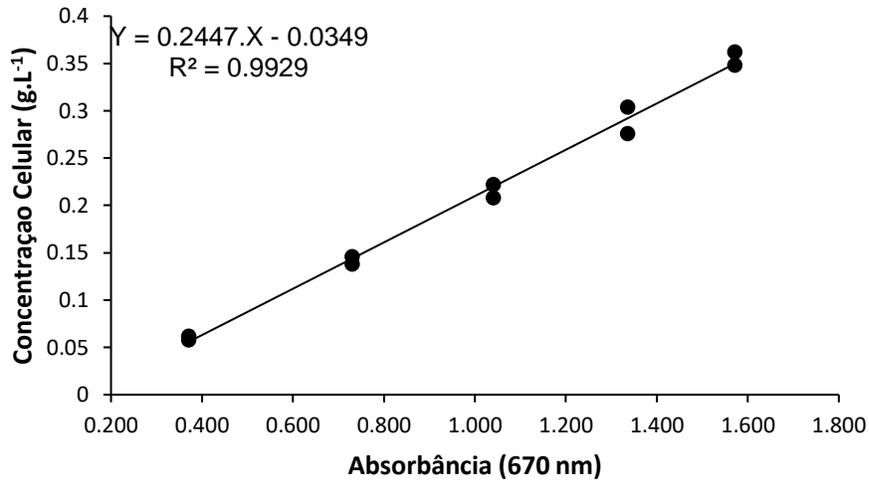


Figura 4.7: Gráfico com modelo matemático e curva de crescimento. Fonte: Santos (2019).

As avaliações das concentrações diárias possibilitaram a elaboração das curvas de crescimento.

4.5.6. Concentração Máxima de biomassa

A concentração de biomassa foi analisada através do método gravimétrico. Para isso, também foi utilizada a filtração a vácuo (Figura 4.8). Assim, ao final do cultivo, amostras de 50 mL foram filtradas com o intuito de mensuração da massa seca pelo mesmo processo descrito anteriormente.



Figura 4.8: Filtragem da amostra do cultivo. Fonte: Santos (2019).

4.5.7. Quantificação de Lipídeos

A determinação da fração lipídica foi realizada através do método de extração desenvolvido por Bligh e Dyer (1959), adaptado por outros autores como (CHEN et al., 2012; RYCKEBOSCH; MUYLEAERT; FOUBERT, 2012; SHAH et al., 2016). No estudo, 50 mg de biomassa foram dispostos em tubos tipo Falcon (15 mL), também foram adicionados uma fração de 5 mL de solventes orgânicos clorofórmio/metanol na proporção 1:2 (v/v). Os tubos foram agitados manualmente por 30 segundos e ao banho-maria por 1 hora sob temperatura de 65°C. Após o resfriamento até temperatura ambiente, foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos. A fração líquida foi retirada com auxílio de pipeta graduada ao final de cada centrifugação e disposta em tubo de ensaio com roscas com o objetivo de evitar a evaporação. Por fim, este processo foi repetido por mais uma vez com a finalidade da extração dos lipídeos remanescentes.

Foram adicionados ao tubo de ensaio, clorofórmio e solução de cloreto de sódio a 1% de forma que o volume final apresentasse proporção de 1:1:0,9 de clorofórmio/metanol/água. Após esta operação, foi realizada a agitação em agitador de tubos (vortex) por 2 vezes consecutivas e o tubo foi acomodado de forma inerte por 20 minutos, até ocorrer a total separação do líquido em duas fases distintas: a camada superior com aspecto claro e translúcido (metanol e solução de cloreto de sódio) e a camada inferior aspecto verde (clorofórmio e lipídeos). A camada inferior foi então retirada com auxílio de pipeta Pasteur e acondicionada em outro tubo de ensaio de massa conhecida.

A completa remoção dos solventes remanescentes foi realizada através da evaporação em estufa 60°C por 24 horas e a 105°C por 15 minutos. Por fim, foi realizado o aferimento da massa utilizando método gravimétrico para quantificar os lipídeos presentes na biomassa.

4.5.8. Produção de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

Para o processo de produção dos ésteres metílicos, foi utilizada a metodologia adaptada de Baumgartner (2011) e Lewis et al. (2000) . Para isto, foram pesados 40

mg de biomassa seca em um tubo de ensaio com tampa de rosca, seguidos da adição de 3 mL de solução contendo metanol (álcool), hexano (solvente) e ácido clorídrico (catalisador), e então aquecidos a 60°C por 1 hora.

Após o término da reação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente através da imersão parcial dos tubos em água e a extração do produto foi realizada através da separação com adição de 1 mL de água deionizada e 2 mL de uma mistura de hexano:clorofórmio (4:1 v/v). A fase superficial contida presente no tubo foi recolhida, pois estava contida do produto e solvente. Este passo foi repetido novamente para assegurar a total recuperação dos ésteres alquílicos produzidos na reação.

Os tubos foram levados para evaporação dos solventes em estufa a 50°C, onde permaneceram somente ésteres alquílicos. Estes foram então ressuspensos em 3 mL de n-heptano e acondicionados no refrigerador até a realização das análises.

4.5.9. Caracterização dos Ésteres Metílicos

A determinação do perfil dos ésteres metílicos presentes na biomassa foi realizada após o processo de esterificação ácida *in situ* (derivatização), que busca a geração de ésteres alquílicos com teor de volatilidade superior aos lipídeos para que possam ser aplicados ao cromatógrafo.

As análises para a qualificação dos ésteres metílicos obtidos foram realizadas no Laboratório de Catálise Heterogênea e Biodiesel, da Universidade Estadual de Maringá- UEM

Os ésteres foram identificados por comparação dos espectros de massa obtidos através dos cromatogramas resultantes e de amostras padrões predeterminados, demonstrando assim os ésteres alquílicos produzidos pelas microalgas.

4.5.10. Análises estatísticas

Ao final da fase preliminar do estudo, foi realizada a avaliação da distribuição normal dos dados através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido da

avaliação da homogeneidade de variância através do teste de Levene. Por fim, foram realizados os testes de comparação entre as médias ($\alpha = 0,1$) para verificar a diferença significativa entre as médias através do teste de Tukey e teste t utilizando os softwares Action e Statistica.

No cultivo subsequente, foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) e validação do modelo. Após isto, foi realizada a determinação da superfície de resposta dos resultados obtidos no experimento DCCR e determinação da função desejabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA MANIPUEIRA

Foram realizadas coletas de amostras de manipueira bruta obtidas após os processos industriais e posteriormente foram conduzidas para a caracterização. Esta etapa foi realizada através das análises físico-químicas da manipueira, onde foram realizadas as análises de pH, DQO, COR, sólidos sedimentáveis. Estes valores estão apresentados na tabela 5.1.

Tabela 5.1: Características da manipueira utilizada no estudo.

Descrição	Valores
pH	7,21
DQO	5359 mg O ₂ .L ⁻¹
COR	1052 uC
Sólidos sedimentáveis	0,1 mL.L ⁻¹

Fonte: Santos (2019).

A manipueira obtida durante a coleta foi utilizada para todos os estudos posteriores realizados no trabalho.

5.2. CULTIVO PRELIMINAR

5.2.1. Comparação entre as Cepa PPEQ – 02 e BMAK07

A fase de cultivo preliminar teve como objetivo avaliar a capacidade de crescimento das duas cepas da microalga *Chlorella sp.* sob condições mixotrófica e heterotrófica, durante um período de 120 horas. Nesta fase do estudo, foi realizada a comparação do desenvolvimento das cepas PPEQ – 02 e BMAK07, para verificar a cepa com maior capacidade de crescimento em meio de cultura enriquecido por manipueira. Os resultados expressos na Tabela 5.2 demonstram a concentração máxima de biomassa e porcentual de lipídeos obtidos ao final dos cultivos.

Tabela 5.2: Resultados do Cultivo Preliminar com meio de cultivo enriquecido por manipueira.

Cepas	Nutrição	Concentração de biomassa (mg.L⁻¹)	Lipídeos (% peso seco)
PPEQ – 02	Mixotrófica	643 ± 28,1	13,43 ± 1,00
PPEQ – 02	Heterotrófica	158 ± 9,1	14,27 ± 1,50
BMAK07	Mixotrófica	487 ± 30,0	7,53 ± 0,31
BMAK07	Heterotrófica	232 ± 10,8	11,37 ± 0,83

Fonte: Santos (2019).

Ficou evidenciado entre os resultados obtidos para a concentração máxima de biomassa, que ao utilizar o tratamento com a cepa PPEQ-02 sob condição nutritiva mixotrófica, obteve-se o melhor resultado. No estudo realizado por Andrade e Colozzi Filho (2014a), foi relatado que a metabolização de determinados elementos varia entre os diferentes tipos de microalgas, ressaltado que a variação ocorre tanto para diferentes gêneros e espécies, quanto para diferentes cepas. Estas variações levam ainda a diferentes resultados finais na quantidade e composição da biomassa celular.

Os resultados de produtividade máxima encontrados para os cultivos mixotróficos foram de 487 mg.L⁻¹ utilizando a estirpe BMAK07 e de 643 mg.L⁻¹ com a estirpe PPEQ-02, sendo estes, significativamente maiores quando comparados aos cultivos heterotróficos (BMAK07 com 232 mg.L⁻¹ e PPEQ-02 com 158 mg.L⁻¹), com decréscimo médio de 2,09 e 4,07 vezes para as respectivas estirpes. Isto se relaciona aos cultivos heterotróficos, contidos de carboidratos, apresentarem taxas de crescimento relativamente menores do que em cultura fotossintética. Além disto, as estirpes podem apresentar baixa afinidade com os compostos orgânicos presentes no meio (RICHMOND, 2004).

Estudos relatam que as fontes de carbono presentes no meio de cultivo podem estar relacionadas aos menores níveis de biomassa encontrados nos cultivos heterotróficos, visto que são capazes de causar comprometimento ou até inibição do crescimento celular (Richmond, 2004). Em pesquisas desenvolvidas por Shi et al. (1999), são relatados que níveis muito baixos ou muito altos de carboidratos

assimiláveis no meio de cultivo inibem o crescimento das microalgas e diminuem consideravelmente os níveis finais da concentração de biomassa de *Chlorella sp.*

O resultado da concentração máxima de biomassa encontrada na produção mixotrófica da cepa BMAK07 ($487 \pm 30 \text{ mg.L}^{-1}$) está entre a faixa de resultados obtidos por Blanco (2017), que encontrou valores entre 390 e 540 mg.L^{-1} ao cultivar microalgas da mesma cepa sob condições de cultivo mixotrófico em diferentes concentrações de esgoto sanitário.

O resultado encontrado para o tratamento PPEQ-02 em condição mixotrófica ($643 \pm 28,1 \text{ mg.L}^{-1}$) foi superior ao descrito anteriormente e também ao estudo conduzido por Osorio et al. (2018), que encontrou como melhor resultado o valor de $485,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de biomassa ao utilizar um efluente sintetizado em um cultivo realizado pelo período de 264 horas. Porém, este valor encontra-se abaixo dos valores encontrados pelos autores Ebrahimian; Kariminia; Vosoughi (2014), Kobayashi et al., (2013) e Li et al., (2013), que utilizaram diferentes tipos de efluentes residuais e obtiveram concentração máxima entre 765 e 1130 mg.L^{-1} de biomassa.

A produção de lipídeos encontrada para as duas cepas sob nutrição heterotrófica, bem como o tratamento mixotrófico com a cepa PPEQ-02, foram superiores aos resultados obtidos por Borghetti (2009), que encontrou teores lipídicos entre 8,84% e 11,08% ao cultivar *Chlorella sp.* em diferentes concentrações de manupueira. Porém, os resultados encontrados pelo autor para nível de lipídeos são estatisticamente superiores ao cultivo da cepa BMAK07 sob condição mixotrófica, onde foi encontrado $7,53 \% \pm 0,31 \text{ (m/m)}$.

Os cultivos heterotróficos tiveram aumento médio de 3,7% na produção de lipídeos para a estirpe BMAK07 e 2,8% para a estirpe PPEQ-02, quando comparados aos cultivos mixotróficos. O aumento do teor lipídico pode ser causado pelo estresse nutricional e luminoso sob os quais os experimentos foram expostos durante o cultivo heterotrófico (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014b). Além disto, vários autores relataram o aumento dos níveis de lipídeos em cultivos heterotróficos de microalgas, quando comparados aos cultivos mixotróficos, devido a mudança das vias metabólicas

que são direcionadas para a produção destes compostos (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014b).

Com a finalidade de observar qual o tratamento com maior potencial para a produção de biodiesel, é necessário relacionar a produtividade máxima de microalgas a produção de lipídeos a fim de encontrar a produtividade lipídica ao final do cultivo (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014b). Para isto, as duas respostas foram relacionadas com a finalidade de demonstrar a quantidade de lipídeos produzidos ao final do tempo de cultivo total, como pode ser observado na Figura 5.1.

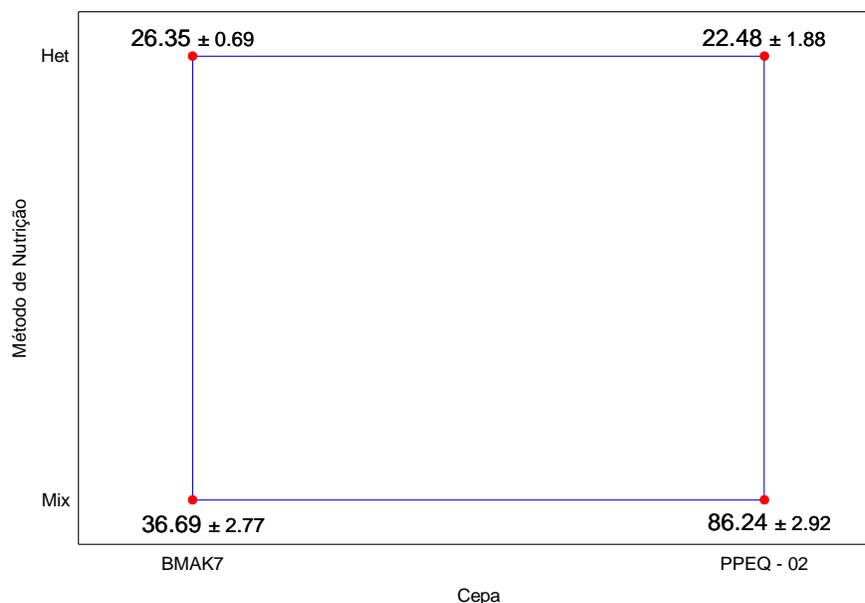


Figura 5.1: Relação entre a produtividade de biomassa e lipídeos ($\text{mg.L}_{\text{meio}}^{-1} \cdot 120\text{h}^{-1}$) Fonte: Santos (2019).

Ao observar os resultados obtidos para a produtividade lipídica, verifica-se que o experimento com a cepa PPEQ-02, sob condição Mixotrófica, foi capaz de produzir $86,24 \pm 2,92$ mg de lipídeos por litro de meio de cultura durante o período de cultivo (120 horas). Este resultado foi significativamente superior aos experimentos BMAK07 x Mixotrófico ($36,69 \pm 2,77$ mg.L^{-1}), BMAK07 x Heterotrófico ($26,35 \pm 0,69$ mg.L^{-1}) e PPEQ – 02 x Heterotrófico ($22,48 \pm 1,88$ mg.L^{-1}) ao utilizar um nível de significância de 90%.

O maior valor da produtividade lipídica obtida neste trabalho está entre os valores encontrados na pesquisa desenvolvida por Li et al., (2013), que obtiveram uma

faixa de lipídeos entre 55,12 e 195,08 mg.L⁻¹, ao utilizar diferentes cepas da microalgas *Chlorella vulgaris* cultivadas com efluentes primários da fermentação de ácido cítrico (15% v/v) durante o mesmo período (120 horas).

Os níveis de produtividade encontrados nos experimentos utilizando a estirpe PPEQ – 02 sob condição mixotrófica encontra-se na faixa demonstrada por Mata, Martins e Caetano (2010), que encontraram entre 11,2 e 40 mg.L⁻¹.d⁻¹ de produtividade lipídica em cultivos de *Chlorella vulgaris*. Porém, estes valores são inferiores se comparados ao valor demonstrado no cultivo de microalgas do gênero *Chlorella sp.* (42,1 mg.L⁻¹.d⁻¹) deste mesmo estudo.

5.1.2. Crescimento da cepa PPEQ-02 em meio BBM enriquecido com CBS

A escolha da estirpe PPEQ-02 para a continuidade dos experimentos, baseada no melhor resultado de produtividade lipídica obtida na comparação anterior, serviu de base para os próximos passos do estudo. Para a realização da próxima fase, se fez necessário avaliar a produtividade de microalga em meio enriquecido com bicarbonato de sódio, com o intuito de verificar se o composto não possui capacidade inibidora no meio. Para isto, foi realizado um cultivo onde foi aplicado 0,1 % (p/v) de bicarbonato de sódio como fonte complementar de carbono em meio de cultivo BBM, de forma a avaliar o crescimento da biomassa das microalgas demonstrado na Figura 5.2.

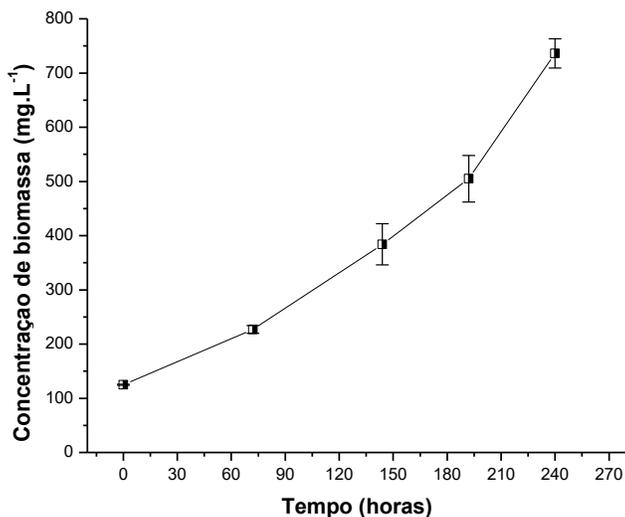


Figura 5.2: Desenvolvimento celular da estirpe PPEQ-02 em cultivo com meio BBM enriquecido com bicarbonato de sódio (0,1%_{p/v}) Fonte: Santos (2019).

O cultivo foi realizado durante o tempo máximo de 240 horas necessárias para a obtenção de biomassa suficiente para a realização dos estudos posteriores. Neste período o desenvolvimento das microalgas foi observado, demonstrando o aumento gradativo da cultura no decorrer do tempo, evidenciando que a estirpe tem capacidade de crescer em meios enriquecidos com a bicarbonato de sódio.

Foram observadas nas primeiras 72 horas de cultivo um aumento celular lento. Sperling et al. (2009), descreveu que o desenvolvimento microbiológico é composto por diferentes fases, onde a primeira é conhecida como a fase de latência de crescimento (lag), onde ocorre uma divisão celular lenta devido a exposição dos microrganismos a um novo meio de cultura.

No estágio subsequente à fase lag, foi evidenciado um crescimento celular mais acelerado das microalgas. Esta fase é definida como a fase logarítmica (log) de crescimento, em que o aumento celular supera a primeira fase pelo maior desenvolvimento celular das microalgas no meio de cultura devido à alta taxa de divisão celular.

Este experimento preliminar evidenciou a capacidade da cepa PPEQ-02 crescer em meio enriquecido com bicarbonato de sódio, sem sofrer inibição pela adição do mesmo. Ao final de 240 horas de cultivo a biomassa obtida foi de 740 mg.L^{-1} , próximo ao valor obtido (710 mg.L^{-1}) ao décimo dia de cultivo por Mokashi et al., (2016) no estudo utilizando bicarbonato de sódio como fonte suplementar de carbono em cultivos.

5.2 CULTIVO SUBSEQUENTE

5.2.1. Desenvolvimento das microalgas e variação de pH

Durante o cultivo subsequente foram realizadas amostragens da concentração da biomassa e do pH do meio de cultivo, com a finalidade de obter maiores informações durante o processo de produção.

Os gráficos apresentados na Figura 5.3 demonstram os resultados da concentração de biomassa durante as 166 horas de cultivo, obtidos através da leitura da densidade óptica realizada em espectrofotômetro e sua transformação em concentração através dos modelos matemáticos obtidos por meio da curva de regressão realizada durante o estudo (anexo I). Estes gráficos demonstram os resultados obtidos no decorrer do estudo para os diferentes ensaios do DCCR, onde foram variados a concentração de manipueira e bicarbonato de sódio (%_{v/v};g.L⁻¹).

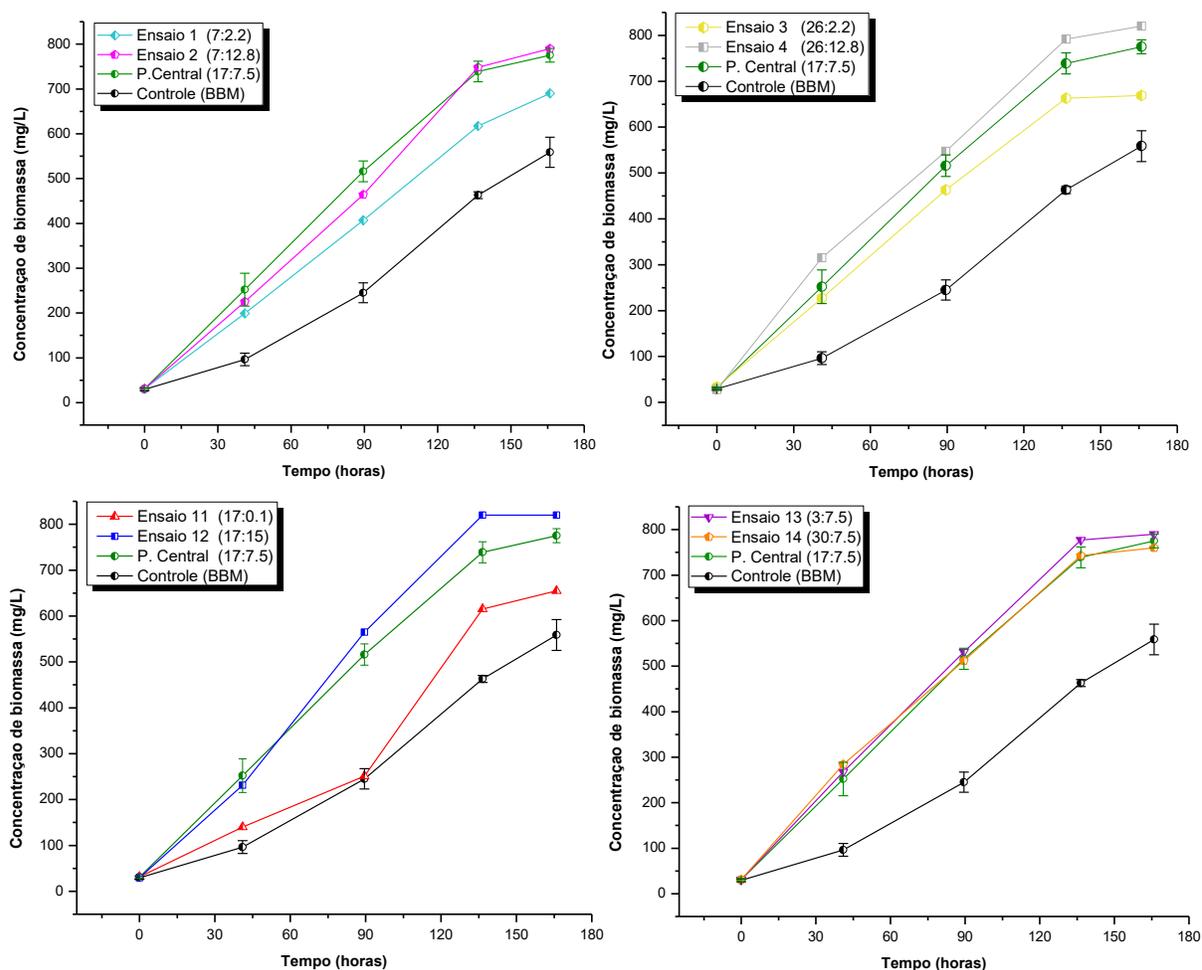


Figura 5.3: Desenvolvimento celular de microalgas PPEQ – 02 durante o cultivo subsequente em diferentes concentrações de manipueira e bicarbonato de sódio sob condição mixotrófica. Fonte: Santos (2019).

Pode-se observar, que houve um aumento gradativo das microalgas durante o período de cultivo, demonstrando que as microalgas se adaptaram e conseguiram se desenvolver no meio. O aumento crescente pode ser observado até o período próximo

ao quarto ponto amostrado (136 horas), quando iniciou a estabilização dos níveis da concentração de biomassa.

A estabilização do crescimento celular pode estar relacionada as menores quantidades de nutrientes presentes no meio devido ao consumo. No decorrer da produção, este consumo acarretou a diminuição da disponibilidade de nutrientes para as microalgas, de forma a estabilizar o crescimento (DERNER, 2006).

O gráfico exposto na Figura 5.4 evidencia a variação do pH dos meios ao longo do cultivo, onde observa-se o aumento gradativo no decorrer do tempo de todos os ensaios. Este aumento está relacionado com o acúmulo de íons bicarbonato de sódio (HCO_3^-) no meio devido a faixa de pH, pois o crescimento mixotrófico é marcado principalmente pela liberação de dióxido de carbono no meio, o qual reage para formar ácido carbônico e em nova reação gera HCO_3^- (HSUEH; CHU; YU, 2007).

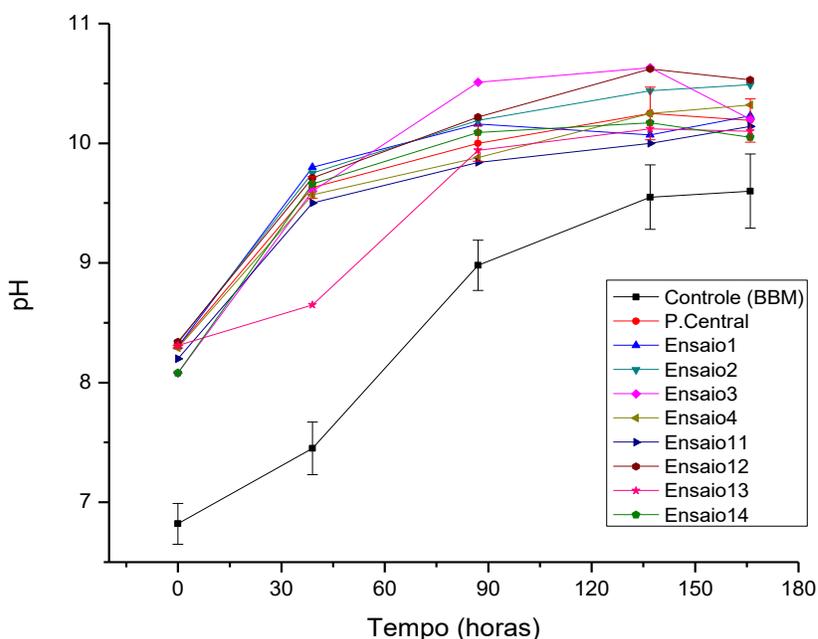


Figura 5.4: Variação de pH durante o cultivo subsequente utilizando PPEQ – 02. Fonte: Santos (2019).

A variação do pH inicial e final dos tratamentos com manieira e CBS foram consideráveis, onde a faixa de pH inicial dos cultivos foi de 8,08 - 8,34 e chegou a faixa de 10,07 – 10,54 no final dos cultivos. Nesta fase final também se verifica a diminuição da variação do pH. Andrade e Colozzi Filho (2014a), demonstram que esta

estabilização de pH pode estar associada ao início da fase estacionária do cultivo, onde há um déficit do crescimento celular das microalgas e conseqüentemente da liberação de íons CO₂ no meio.

5.2.2. Resultado DCCR da produção de *Chlorella sp.*

A Tabela 5.3 apresenta os resultados da produtividade de biomassa (mg.L⁻¹) e lipídeos (%), no tempo de 166 horas, obtidos através do planejamento DCCR com as variáveis independentes concentração de manipueira (%_{op/v}) e concentração de bicarbonato de sódio (g.L⁻¹). Pode-se observar que a maior produção de biomassa foi alcançada no ensaio 4, com 26% de manipueira e 12,8 g.L⁻¹ de CBS onde a produtividade máxima de microalgas foi de 820 mg.L⁻¹.

Tabela 5.3: Resultados da concentração de biomassa e teor de lipídeos obtidos no DCCR.

Ensaio	Manipueira (%)	CBS (g.L ⁻¹)	Biomassa Final (X _{máx} , mg.L ⁻¹)	Conteúdo Lipídico (% _{om/m})
1	7	2.2	690	37,9
2	7	12.8	790	48,8
3	26	2.2	670	46,8
4	26	12.8	820	53,3
5	17	7.5	780	49,0
6	17	7.5	770	50,4
7	17	7.5	760	50,0
8	17	7.5	760	51,3
9	17	7.5	780	48,3
10	17	7.5	800	49,1
11	17	0.1	660	45,2
12	17	15	820	59,0
13	3	7.5	790	41,3
14	30	7.5	760	49,7

Fonte: Santos (2019).

No trabalho realizado por Mondal et al. (2016), foi avaliado o desenvolvimento de uma cepa de *Chlorella sp.* denominada BTA 9031 isolada do campo de carvão utilizando diferentes fontes de carbono (acetato de sódio, glucose, soro de leite e melado). Os autores obtiveram valores aproximados de 420-1140 mg.L⁻¹. O estudo apresentou resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho ao utilizar frutose (5 g.L⁻¹) como fonte de carbono, onde chegou ao valor de 684 mg.L⁻¹ ao sétimo dia de cultivo, concordante com os resultados encontrados neste trabalho. Os autores ainda realizaram o cultivo desta cepa sob condição autotrófica utilizando meio BG-11 enriquecido com bicarbonato de sódio (5 g.L⁻¹) como fonte inorgânica de carbono, obtendo resultados aproximados a 310 mg.L⁻¹ de biomassa ao 7º dia de cultivo, superiores ao cultivo realizado somente sob a presença de meio BG-11 e aeração.

Segundo os estudos de Freitas et al. (2017), que buscaram conhecer os efeitos do desenvolvimento de diferentes espécies de microalgas utilizando pentoses como fonte de carbono orgânico para a produção sob condições mixotrófica de nutrição, os autores encontraram como melhores resultados os valores de 770 ± 10 mg.L⁻¹ ao final de 17 dias de cultivo para microalgas do gênero *Chlorella sp.*, utilizando uma solução de 114,98 mg.L⁻¹ de xilose-d e 5,37 mg.L⁻¹ de arabinose-L. Esses compostos orgânicos utilizados no estudo tiveram como função a simulação dos resíduos hidrolisados da indústria do açúcar e encontraram-se entre a faixa de resultados obtidos no presente trabalho.

Ebrahimian, Kariminia e Vosoughi (2014), estudaram o desenvolvimento de microalgas *Chlorella vulgaris* em diferentes proporções de águas residuais primárias e secundárias de esgoto doméstico tratados em sistema de lodos ativados, onde primeiramente foram otimizadas as condições de operação para o crescimento autotrófico das microalgas em meio contido de efluente secundário do tratamento enriquecido com diferentes concentrações de bicarbonato de sódio. Nestas condições, foram encontrados os melhores valores de produtividade máxima de biomassa utilizando 1 g.L⁻¹, chegando a 1030 mg.L⁻¹ ao sétimo dia de cultivo. A partir disto, foram realizados cultivos com diferentes proporções de efluente primário e secundário nas

proporções de 1:1, 3:1 e 1:3 ($V_{\text{primário}}/V_{\text{secundário}} + 1\text{g.L}^{-1}\text{ CBS}$) e no sétimo dia a produtividade era de 789,834 e 989 mg.L^{-1} , respectivamente.

Os melhores resultados para a produção de lipídeos foram obtidos no ensaio 12 (17% $_{\text{manipueira}}$ e 7,5 $\text{g.L}^{-1}\text{ CBS}$), onde o teor de lipídeos foi de 59% da biomassa seca total. Os resultados obtidos são superiores ao trabalho desenvolvido por Borghetti (2009), que encontrou como melhor resultado o valor de 11,08% $_{(m/m)}$ ao avaliar o crescimento de microalgas *Chlorella minutíssima*, em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira.

No estudo realizado por Mata, Martins e Caetano (2010), destacam as microalgas do gênero *Chlorella sp.* como uma ótima opção para a produção de biodiesel, demonstrando que o conteúdo lipídico presente na biomassa seca pode variar entre 10 - 48% $_{(m/m)}$. Os resultados demonstrados no presente trabalho encontram-se acima dos valores obtidos por estes autores.

Todos os resultados da produção lipídica encontrados neste trabalho são superiores aos resultados encontrados por Mondal et al. (2017), ao utilizarem fontes de carbono orgânico para nutrição das microalgas do gênero *Chlorella sp.* O melhor resultado apresentado pelos autores correspondem a 30% de conteúdo lipídico (m/m) utilizando melação como fonte de carbono.

A Figura 5.5 apresenta os gráficos de Pareto para as variáveis respostas concentração máxima de biomassa e concentração de lipídeos, demonstrando quais das variáveis tem maior influência no resultado.

No gráfico de Pareto, os termos que ultrapassam a linha de significância ($\alpha = 0,10$), podem ser considerados influentes sobre as respostas e quanto maior a influência, maior será a barra no gráfico. O termo que tem maior influência sobre a produtividade final de biomassa é o termo linear (L) de concentração de bicarbonato de sódio. O termo CBS quadrático (Q) também tem influência sobre o nível de significância p-valor (0,10), porém menor que o primeiro. Já os termos que tem influência sobre o conteúdo lipídico são CBS (Q), Man (L) e Man (Q) em ordem decrescente.

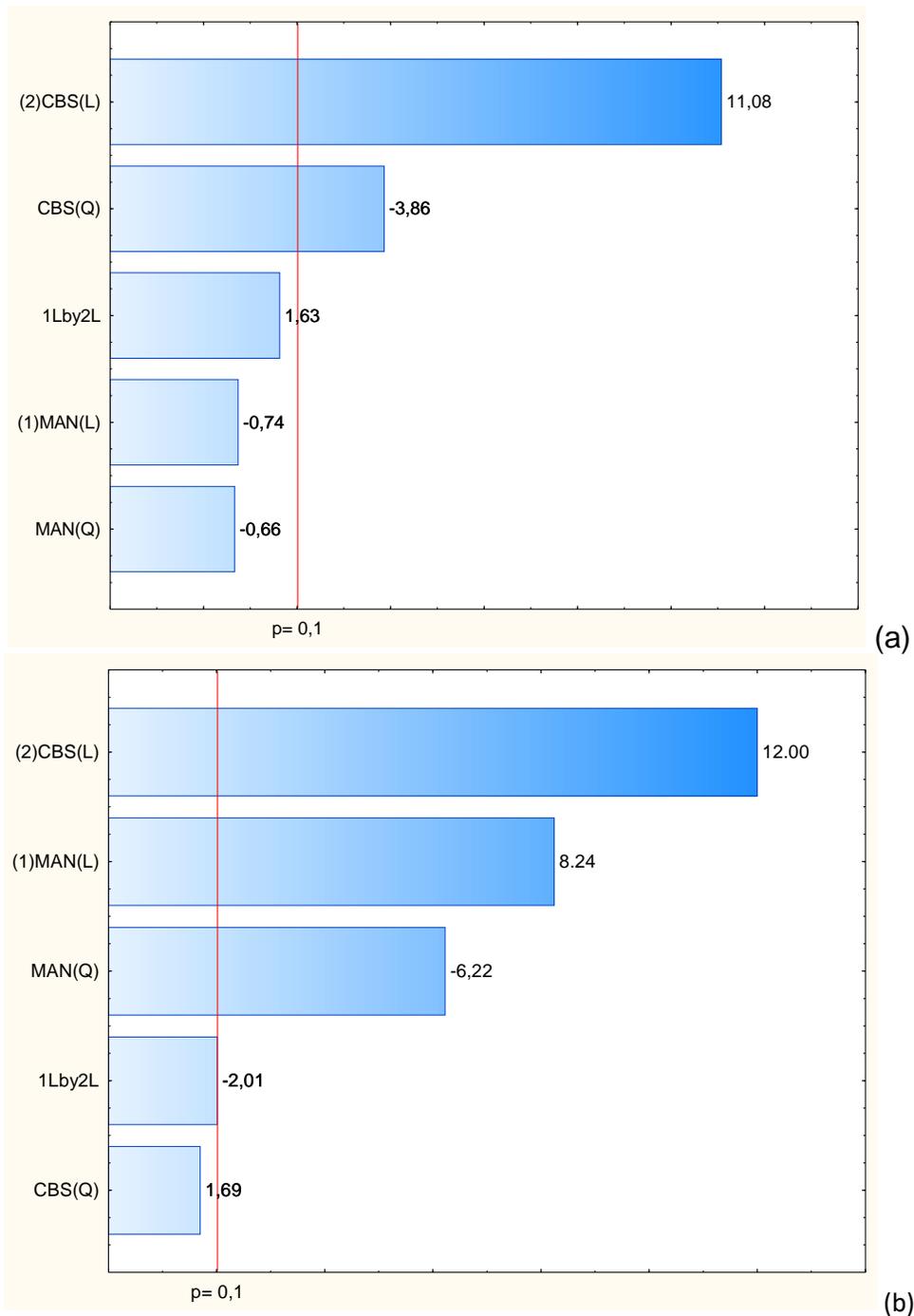


Figura 5.5: Gráfico de pareto ($\alpha:0,10$) para as variáveis concentração de biomassa (a) e teor de lipídeos (b) Fonte: Santos (2019).

A Tabela 5.4 demonstra o cálculo dos efeitos que as variáveis manipuladas e concentração de bicarbonato de sódio exercem sobre a produtividade de biomassa e lipídeos durante o cultivo mixotrófico. O nível de significância (p -valor) das variáveis

para cada termo linear (L) e quadrático (Q), comparados ao p-valor estabelecido ($\alpha = 0,10$) determinam se as variáveis são influentes sobre as respostas, sendo que, os termos com p-valor menores que os determinados são considerados significativos. Neste caso, o termo linear de CBS foi influente tanto para produtividade de biomassa, quanto para o conteúdo lipídico e o termo quadrático influenciou somente a variável biomassa. Os termos lineares e quadráticos de concentração de manipueira influenciaram somente a quantidade de lipídeos obtidos nos ensaios.

Tabela 5.4: Efeitos e Coeficientes de regressão quadrática do DCCR para concentração de biomassa e lipídeos com a microalga PPEQ – 02.

Variável	Efeito		Coeficiente		p-valor	
	Biomassa	Lipídeos	Biomassa	Lipídeos	Biomassa	Lipídeos
Mean/Interc.	775,24	49,52	775,24	49,52	0,001	0,001
(1)Man (L)	-7,93	6,34	-3,96	3,17	0,496	0,001
Man (Q)	-7,37	-4,97	-3,68	-2,49	0,541	0,002
(2) CBS (L)	119,24	9,29	59,62	4,65	0,001	0,001
CBS (Q)	-43,54	1,37	-21,77	0,69	0,005	0,216
Interação (1) x (2)	24,70	-2,19	12,35	-1,10	0,155	0,150

Fonte: Santos (2019).

Através da tabela de efeitos podemos também obter o modelo da regressão estatística, que foi:

$$Biomassa (mgL^{-1}) = 775,24 - 3,96Man - 3,68 Man^2 + 59,62 CBS - 21,77CBS^2 + 12,35 Man . CBS$$

$$Lipídeos (\% p/p) = 49,52 + 3,17Man - 2,49Man^2 + 4,65CBS + 0,69CBS^2 - 1,1 Man . CBS$$

Onde:

Man = Concentração de manipueira (%v/v);

CBS = Concentração de bicarbonato de sódio (g.L⁻¹).

A Tabela 5.5 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA) para a concentração final de biomassa. O valor encontrado para F calculado (26,18), quando comparado ao valor de $F_{tab(5;5;0,10)} = 3,45$ demonstram que o modelo obedece a

premissa para a sua validação, apresentando uma razão $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}} = 7,58$. Os valores obtidos para o R^2 (0,94) e R^2_{ajust} (0,91) indicam os altos níveis de ajuste da regressão.

Mesmo que uma regressão seja considerada significativa pelo teste F, não é necessariamente considerada útil para descrever os resultados, visto que pode cobrir uma pequena faixa de variação dos fatores estudados. Segundo Box e Wetz (1973) citado por Ribeiro et al. (2008), para uma regressão ser considerada útil para os fins preditivos, deve apresentar uma razão $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ minimamente maior que cinco, assim como a encontrada no estudo. Desta forma, podemos acrescentar que a regressão além de ser considerado significativa, também é útil para fins preditivos.

O p-valor do “modelo” ($\alpha=0,10$) baixo mostra o alto nível de significância do mesmo e alto valor da falta de ajuste ($\alpha=0,10$) representa a sua não significância, de forma a mostrar que o modelo de regressão estatística gerado é adequado para descrever os resultados obtidos nos ensaios. Isto também pode ser comprovado ao realizar a análise dos resíduos expostos na Figura 5.6, que demonstra a distribuição normal dos resíduos, pois estão aleatorizados em torno do zero no gráfico que demonstra “resíduos vs valores preditos”. Os resíduos brutos encontram-se dentro do espectro de resíduos padronizados de uma distribuição normal indicando a ausência de valores extremos ou atípicos (Figura 5.7).

Tabela 5.5: Análise de variância do DCCR para concentração de biomassa do cultivo de microalga PPEQ – 02.

Fatores	SQ	GL	MQ	F calc	p-valor
Modelo	32506,33	5	6501,27	26,18	0,0001
Falta de Ajuste	836,52	3	278,84	1,21	0,3957
Erro Puro	1150,00	5	230,00		
Resíduo	1986,52	8	248,32		
Total	34492,86	13			

Fonte: Santos (2019).

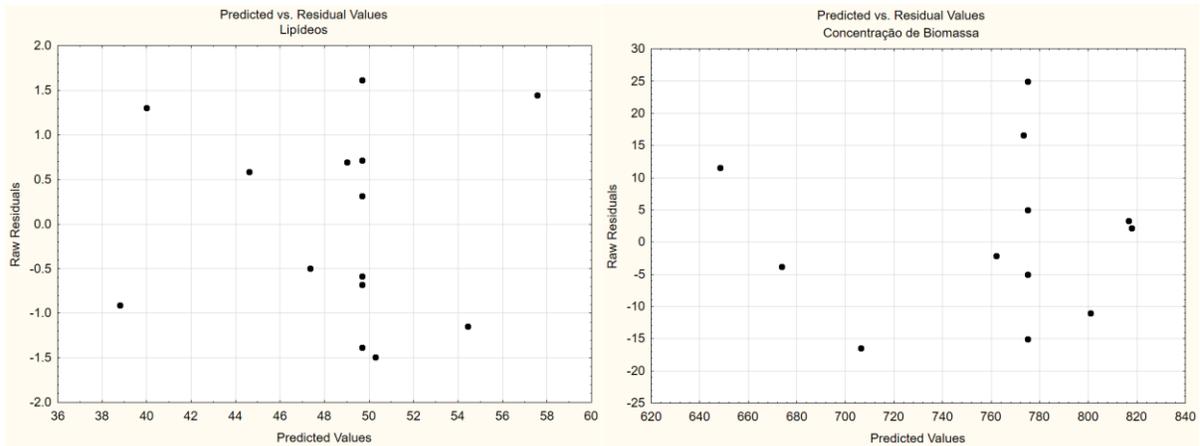


Figura 5.6: Gráfico de resíduos vs valores preditos ($\alpha: 0,10$). Fonte: Santos (2019).

A Anova obtida dos dados de conteúdo lipídico demonstra que os resultados de p-valor do “modelo” ($<0,10$) e da “falta de ajuste” ($>0,10$) indicam que o modelo está ajustado aos resultados obtidos no estudo. Além disto, a análise dos resíduos também demonstra a aleatoriedade dos resíduos em torno do zero conforme observado na Figura 5.6, no “gráfico de resíduos vs valores preditos” e demonstra a inexistência de pontos influentes ou valores atípicos no “gráfico da probabilidade normal dos resíduos” (Figura 5.7).

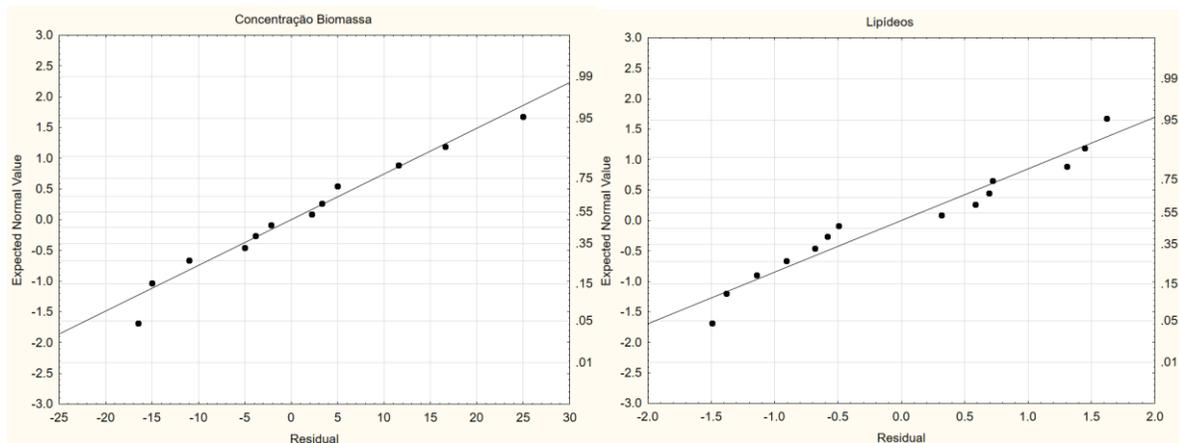


Figura 5.7: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos ($\alpha: 0,10$). Fonte: Santos (2019).

A relação obtida pelo teste F (9,51), que corresponde a relação entre F_{calc} (32,84) / F_{tab} (3,45) demonstram que o modelo de regressão obtido se apresenta significativo e útil para os fins preditivos. Além disso, os valores elevados de R^2 (0,95) e R^2_{ajust} (0,93) indicam que a regressão está com elevado grau de ajuste.

Tabela 5.6: Análise de variância do DCCR para conteúdo lipídico presente na biomassa do cultivo de microalga PPEQ – 02.

Fatores	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p-valor
Modelo	311.70	5	62.34	32.84	0.0001
Falta de Ajuste	9.24	3	3.08	2.59	0.1658
Erro Puro	5.95	5	1.19		
Resíduo	15.18	8	1.90		
Total SQ	326.89	13			

Fonte: Santos (2019).

Os gráficos de superfície de resposta dos ensaios são apresentados na Figura 5.8, representando o comportamento do desenvolvimento das microalgas *Chlorella sp.* tanto na produção de biomassa ao final do cultivo, quanto na bioacumulação de lipídeos na estrutura celular frente a variação da concentração de manipueira e bicarbonato de sódio.

A Figura 5.8 (a) demonstra que as maiores concentrações de biomassa produzida pelas microalgas ocorrem quando as variáveis CBS e manipueira estão seguindo os pontos axiais positivos, na região limite da superfície. Isto mostra a possibilidade caminhar mais na superfície a fim de encontrar valores maiores para a produtividade de biomassa ao aumentar os valores dos fatores.

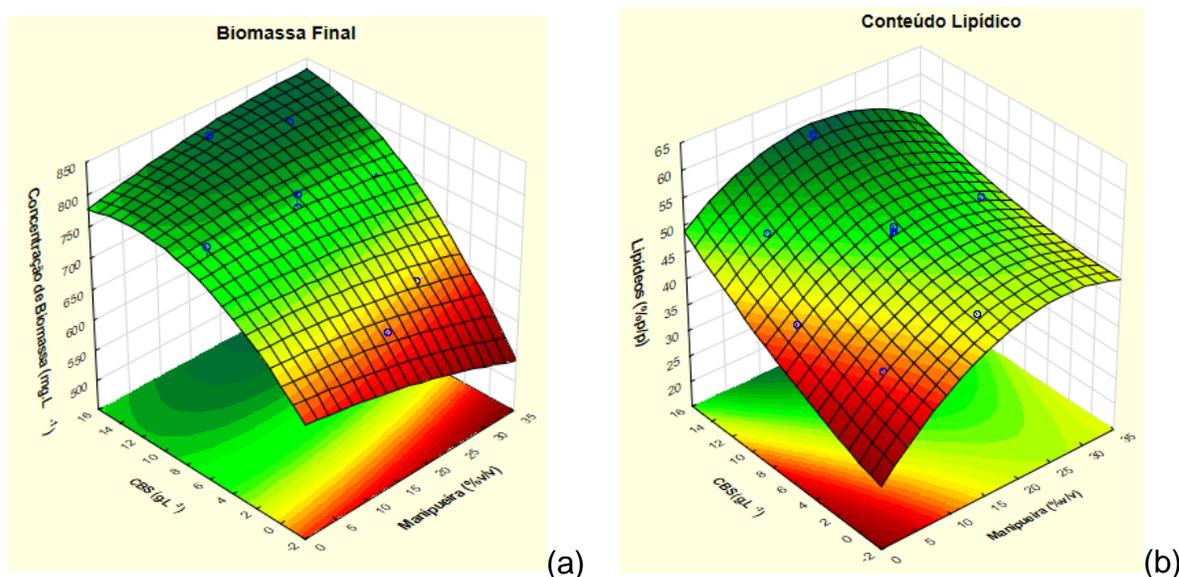


Figura 5.8: Superfície de Resposta da Concentração Final de Biomassa (a) e Teor de Lipídeos (b)
Fonte: Santos (2019).

O conteúdo lipídico mais elevado foi alcançado seguindo o ponto central da variável manipulada e no limite positivo da CBS, mostrando que ao variar a concentração de manipulada positivamente ou negativamente fora da linha do ponto central leva a diminuição da porcentagem de lipídeos presente nas células das microalgas, porém o aumento da CBS fora da região estudada ainda pode trazer resultados mais promissores.

Após a análise estatística dos resultados obtidos no estudo, da validação do modelo estatístico e do cálculo de superfície de resposta, torna-se interessante a realização do cálculo que permita a determinação do ponto ótimo de cultivo que atenda as duas respostas de forma conjunta dentro da região limite estudada, através da função desejabilidade (desirability). Como pode ser observado na Figura 5.9, o melhor resultado teórico obtido para a região estudada chega a 820 mg.L⁻¹ de biomassa e 57,73%(m/m) lipídeos ao final do cultivo, no ponto 19,65% (v/v) de manipulada e 15 g.L⁻¹ (p/v). Porém, valores diferentes (superiores) podem ser alcançados através do deslocamento na superfície até o melhor ponto, conhecido como ponto estacionário.

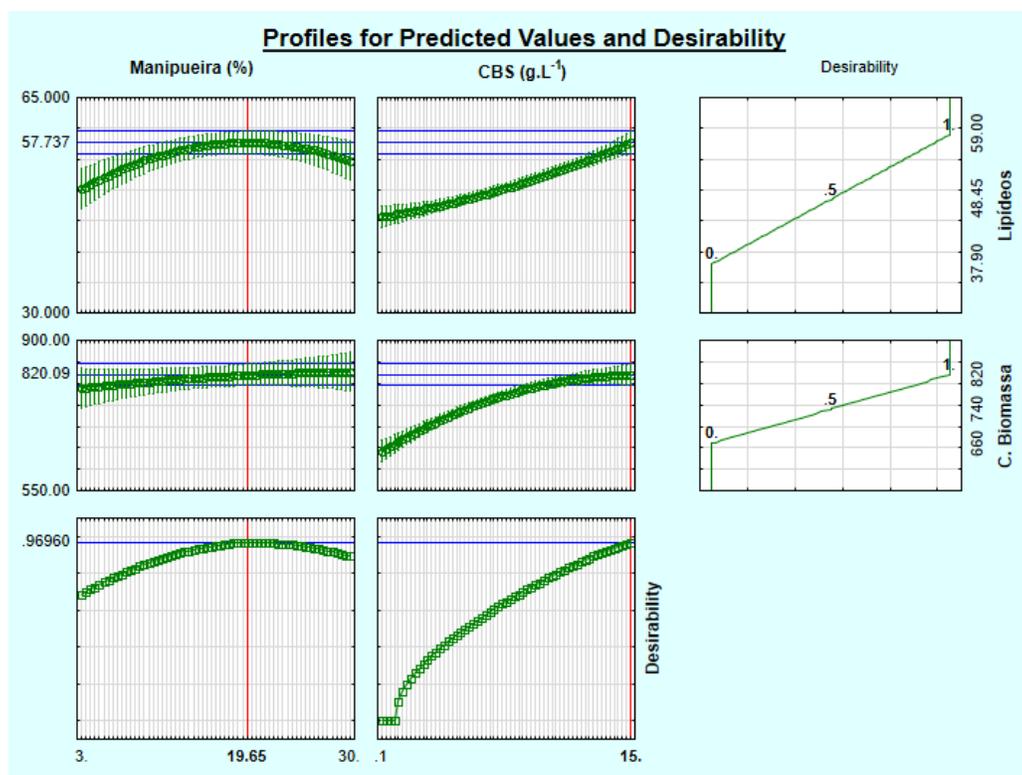


Figura 5.9: Perfil de valores preditos da Concentração de biomassa e Teor de Lipídeos e desejabilidade do experimento realizado no estudo utilizando PPEQ -02 (α : 0,10). Fonte: Santos (2019).

5.3 Caracterização dos ésteres metílicos

A partir do resultado obtido no DCCR, foram selecionados os melhores resultados para realização da análise do perfil de ésteres metílicos obtidos. Estes resultados podem ser observados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: Caracterização do perfil de ésteres obtidos (%).

Ésteres Metílicos	Ensaio 02	Ensaio 04	Ensaio 12	Ensaio 14	Ponto Central
C:08	5,69	6,67	7,65	5,26	6,73
C10:0	0,15	0,28	0,24	0,32	0,34
C:11:0	0,22	0,20	0,23	0,15	0,24
C12:0	-	0,05	-	-	-
C:13:0	4,09	-	-	-	-
C14:1	10,47	16,26	16,32	18,73	13,98
C15:0	0,92	1,70	1,48	1,54	1,51
C16:0	2,31	3,47	3,76	3,47	3,05
C16:1	3,59	8,03	8,07	8,73	6,12
C17:0	7,70	12,94	12,68	13,96	12,03
C18:0	4,60	6,59	7,76	7,34	5,81
C18:1n-9c	0,11	0,17	0,18	0,37	0,31
C18:3n-3	0,17	-	-	-	-
C20:0	0,78	0,24	0,22	0,44	0,32
C21:0	0,60	0,95	1,17	0,20	0,44
C20:4n-6	0,29	0,40	-	0,85	0,84
C20:5n-3	0,13	-	-	-	-
C22:0	24,44	0,28	0,26	0,47	0,43
C22:1n-9	0,50	-	-	-	-
C22:2	24,96	37,62	35,70	33,09	43,22
C23:0	0,15	-	-	-	-
C24:0	0,52	-	0,26	0,50	0,37
C22:6n-3	5,12	1,36	1,32	1,83	1,43
Outros (não identificados)	2,48	2,74	2,70	2,74	2,83

Fonte: Santos (2019).

A partir da análise cromatográfica realizada após a esterificação ácida, foi possível verificar a presença de pelo menos 21 ésteres metílicos nas amostras, onde a maior quantidade de éster metílico produzido foi C22:2 (ácido docosadienóico) para todas as amostras.

O composto ácido docosadienóico não é comumente encontrado em óleos vegetais, como por exemplo outros ácidos graxos como o palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico, entre outros. Estudos mostram a existência de ácidos docosadienóico em classes de pescado e o classificam como ácido graxo da classe ômega 6, que são amplamente utilizados para complementação alimentar por trazerem benefícios a saúde (BASTOS et al., 2006).

Ligado ao viés bioenergético, os ácidos docosadienóicos foram relatados no estudo realizado por Moser (2011), em produto obtido a partir de *Limnanthes alba L.* que relatou que esta composição inusitada pode conferir aos ésteres metílicos uma alta resistência a oxidação, devido ao presente composto não apresentar metilenos bis-alílicos, característica que está mais relacionada a alta estabilidade do que a quantidade de insaturações existentes do composto. Desta forma, o número de insaturações que é comumente utilizado para descrever a estabilidade dos ésteres metílicos tem menor influência neste caso.

As características dos ésteres obtidos nos ensaios oferecem ganhos para a propriedade de fluxo a frio, devido ao seu grau de insaturação. Porém, como o combustível apresenta ésteres metílicos de cadeia longa, sua densidade e viscosidade é elevada, o que ocasiona maior heterogeneidade e menor eficiência na queima do biodiesel (OLIVEIRA, 2012; BAUMGARTNER, 2011; FERREIRA E CRUZ, 2009).

Outros compostos como o C14:1 (ácido tetradecenóico) e C17:0 (ácido heptadecanóico) também possuem fração relevante na composição final encontrada no estudo. Estes compostos apresentam-se, de forma geral, como compostos mais susceptíveis a oxidação e com densidade elevada, assim como o composto C22:0 (ácido docosanóico) encontrado em maior quantidade no ensaio 02 (FERREIRA E CRUZ, 2009). Porém, como citado anteriormente, alta densidade confere melhores resultados de combustão em fluxo frio.

Algumas alternativas são descritas na literatura como alternativas para o melhoramento das características físico-químicas do biodiesel, onde a mistura de ésteres metílicos obtidos por diferentes fontes pode otimizar as características do biodiesel final e gerar um produto com a qualidade necessária para uma combustão mais completa (MOSER, 2011).

6. CONCLUSÃO

O gênero *Chlorella sp.* se desenvolve em meio enriquecido por manipueira, visto que os inóculo de BMAK07 e PPEQ-02 cresceram sob condições mixotrófica e heterotrófica neste meio de cultivo alternativo. Porém, em termos de produtividade lipídica, a estirpe PPEQ – 02 sob condição mixotrófica ($86,24 \pm 2,92 \text{ mg.L}^{-1}$) teve o resultado mais promissor dentre as condições estudadas.

A microalga *Chlorella sp.* desenvolveu-se em meio enriquecido por diferentes concentrações de manipueira enriquecida com bicarbonato de sódio. Verificou-se que todos os resultados alcançados no DCCR ao final do cultivo foram superiores ao cultivo com meio BBM, utilizado como controle. Nos resultados obtidos no cultivo subsequente destacou-se o ensaio 12, com concentração de manipueira de 17% (v/v) enriquecido com 15 g.L^{-1} de bicarbonato de sódio, que gerou o melhor resultado de produtividade lipídica.

Este estudo possibilitou encontrar uma alternativa de produção de microalgas com foco na produção de biocombustíveis, pois a utilização do meio de cultura alternativo pode reduzir custos através de meios de cultivo padrão e também a reciclagem de um resíduo líquido da cadeia produtiva da fécula, inserindo-o como coproduto de outra cadeia produtiva.

Os resultados visualizados na superfície de resposta indicam que melhores resultados podem ser alcançados em outros estudos, visto que o melhor resultado foi alcançado no limite da superfície. Desta forma, há possibilidade de novos estudos visando a otimização estatística deste sistema de cultivo. Além disto, há necessidade de verificação da viabilidade financeira da aplicação do bicarbonato de sódio como enriquecido meio de cultura, para estabelecer uma relação custo-benefício.

Os resultados obtidos a partir da análise cromatográfica possibilitou verificar que o composto em maior quantidade no biodiesel apresenta características favoráveis por apresentar-se como um composto pouco oxidativo e com bom desempenho em fluxo a frio, porém sua viscosidade alta diminui a eficiência da combustão. Desta forma, a utilização de misturas com baixa viscosidade pode

apresentar-se como uma característica viável para produção de um biodiesel de qualidade, com potencial de estudos futuros.

Conclui-se que a produção de microalgas do gênero *Chlorella sp.* no meio de cultivo estudado é possível e sua viabilização em larga escala pode ser uma alternativa interessante para o setor produtivo, principalmente pela elevada quantidade de pontos positivos encontrados no cultivo de microalgas e também para a produção de biodiesel.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos nesta pesquisa, em conjunto com os outros estudos disponíveis, tornam possível a busca pelo aperfeiçoamento dos conhecimentos relacionados ao tema de produção de microalgas utilizando meios alternativos contidos por manipueira enriquecida com bicarbonato de sódio.

A partir disto, podemos buscar outras aplicações para o produto obtido ao final do estudo, visto que, o potencial da biomassa microalgal é vasta e sua caracterização pode ser realizada de forma mais expressiva visando as outras aplicações.

A busca pela otimização do cultivo também pode ser realizada. Isto pode ser alcançado através da utilização de novos biorreatores, da fonte luminosa e outras variáveis. Através disto é possível realizar uma modelagem matemática do processo produtivo e gerar resultados ainda mais promissores.

Utilizar o meio alternativo para o cultivo de outros gêneros de microalgas para avaliar o potencial real de aplicação do mesmo neste modelo de produção. Além de buscar outras fontes de enriquecimento para meios contidos de manipueira, com o intuito de encontrar outros resultados ligados a produção bioenergética.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESANYA, V. O. et al. **Life cycle assessment on microalgal biodiesel production using a hybrid cultivation system.** *Bioresource Technology*, v. 163, p. 343–355, 2014.
- AHAMAD, S. et al. **Optimization of nutrient stress using *C. pyrenoidosa* for lipid and biodiesel production in integration with remediation in dairy industry wastewater using response response surface methodology.** *3Biotech*, v. 8, p. 1 – 13, 2018.
- AMORIM, S. L.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F. **Intoxicação por plantas cianogênicas no Brasil.** *Ciência Animal*, v. 16, n. 1, p. 17-26, 2006.
- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques.** 1 Ed., Londres. Elsevier, 2005. 589 p.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo.** 1. Ed., Londrina. IAPAR, 2014a. 343 p.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Produção de biomassa e coprodutos.** 1 Ed., Londrina. IAPAR, 2014b. 2 v. 487 p.
- AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas estimativa de custos e perspectivas para o Brasil.** Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012. 188 p. Dissertação (Mestrado).
- BASTOS, A. L. et al. **Perfil de ácidos graxos da pele e músculo de *Balistes capriscus* e *Menticirrhus litoralis*, pescados na região sul do Brasil.** *Revista do Instituto Augusto Lutz*, v. 62, p. 94 – 99, 2006.
- BAUMGARTNER, T. R. da S. et al. **Biomass Production and Ester Synthesis by In Situ Transesterification/Esterification Using the Microalga *Spirulina platensis*.** *International Journal of Chemical Engineering*, v. 2013, p. 1–7, 2013.
- BAUMGARTNER, T. R. DA S. **Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus sp.* e *Spirulina sp.* para a síntese de ésteres visando à**

- produção de biodiesel.** Maringá: Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, 2011. 143 p. Tese (Doutorado).
- BELTRÃO, N. E. de M.; OLIVEIRA, M. I. P. **Oleaginosas e seus óleos: Vantagens e Desvantagens para Produção de Biodiesel.** 1 Ed., Campina Grande. Embrapa, 2008. 28 p.
- BLANCO, G. C. **Teste da viabilidade da utilização do efluente da Escola de Engenharia de Lorena para cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em reator batelada visando o acúmulo de lipídeos e o tratamento da água.** Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2017. 49 p. Monografia (Graduação).
- BORGHETTI, I. A. **Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009. 103 p. Dissertação (Mestrado).
- BRASIL. Lei nº 13.264, de 23 de março de 2016. Altera a lei nº 13.033. **Diário Oficial da União:** seção 1, Brasília, DF, ano 156, n.7, p. 1, 23 mar. 2016.
- CULTURE COLLECTION OF ALGAE AND PROTOZOA. **Media Recipes:** Bold's Basal Medium (BBM). Disponível em: <<https://www.ccap.ac.uk/pdfrecipes.htm>>. Acesso em: 17 maio. 2018.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **Expansão industrial e maior oferta de raiz sustentam produção recorde de fécula em 2015.** 1 Ed., Piracicaba. Esalq/Usp, 2016. 8 p.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **Boletim da mandioca.** 1 Ed. Piracicaba. Esalq/Usp, 2018. 6 p.
- CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento da industrialização da mandioca.** 1 Ed. São Paulo. Fundação Cargill, 2001. 320 p.
- CHEN, L. et al. **Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion.** Bioresource Technology, v. 111, p. 208–214. 2012.

- CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae**. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 1, p. 294–306, 2007.
- CONCEIÇÃO, A. J. **A mandioca**. 3 Ed. São Paulo. Nobel, 1987. 382 p.
- DAMASCENO, S. et al. **Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cavassa wastewater as substrate**. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 411 – 414. 2003.
- DELATORRE, A. B. et al. **Produção de biodiesel: considerações sobre as diferentes matérias-primas e rotas tecnológicas de processos**. *Perspectivas Online*, v. 1, n. 1, p. 21–47. 2011.
- DEMIRBAS, A. **Progress and recent trends in biodiesel fuels**. *Energy Conversion and Management*, v. 50, p. 14 – 34, 2009.
- DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e composição bioquímica da microalga *Chaetoceros muelleri* E *Thalassiosira fluviatilis* , COM ÊNFASE NO TEOR DE ÁCIDOS Graxos poliinsaturados**. Florianópolis: Universidade Estadual de Santa Catarina, 2006.158 p. Tese (Doutorado).
- EBRAHIMIAN, A.; KARIMINIA, H.; VOSOUGHI, M. **Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater**. *Renewable Energy*, v. 71, p. 502–508. 2014.
- EL-NAAS, M. H. et al. **A new process for the capture of CO₂ and reduction of water salinity**. *Desalination*, v. 411, p. 69–75. 2017.
- EL-NAAS, M. H.; AL-MARZOUQI, A. H.; CHAALAL, O. **A combined approach for the management of desalination reject brine and capture of CO₂**. *Desalination*, v. 251, n. 1–3, p. 70–74, 2010.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Mandioca: o produtor pergunta, Embrapa responde**. 1 Ed., Brasília. Embrapa, 2006. 183 p.
- FERREIRA, I. P. L. S. L. C; CRUZ, R. S. **Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos**. *Química Nova*, v. 32, p. 1596 – 1608. 2009.

- FREITAS, B. C. B. DE et al. **Cultivation of different microalgae with pentose as carbon source and the effects on the carbohydrate content.** Environmental Technology, v. 40, p. 1062-1070. 2017.
- GONG, Y.; JIANG, M. **Biodiesel production with microalgae as feedstock: From strains to biodiesel.** Biotechnology Letters, v. 33, n. 7, p. 1269–1284. 2011.
- HARUN, R. et al. **Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, n. 3, p. 1037–1047, 2010.
- HSUEH, H. T.; CHU, H.; YU, S. T. **A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot spring and marine algae.** Chemosphere, v. 66, p. 878–886. 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. 2018. Acesso em: 14 maio. 2018.
- KALITA, N. et al. **Ankistrodesmus falcatus: A promising candidate for lipid production, its biochemical analysis and strategies to enhance lipid productivity.** Journal of Microbiology and Biotechnology Research, v. 1, n. 4, p. 148–157. 2011.
- KAN, G. et al. **Acclimatory responses to high-salt stress in *Chlamydomonas* (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*) from Antarctica.** Acta Oceanologica Sinica, v. 31, n. 1, p. 116–124. 2012.
- KAPDAN, I. K.; KARGI, F. **Bio-hydrogen production from waste materials.** Enzyme and Microbial Technology, v. 38, n. 5, p. 569–582. 2006.
- KOBAYASHI, N. et al. **Bioresource Technology Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure.** *Bioresource Technology*, v. 150, p. 377–386. 2013.
- LEONARDI, P. I.; POPOVIICH, C. A.; DAMIANI, M. C. **Feedstocks for Second-Generation Biodiesel: Microalgae's Biology and Oil Composition.** Economic Effects of Biofuel Production., v.1, p. 317 - 346. 2011.

- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. **Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger***. Scientia Agricola, v. 52, n. 2, p. 299–304. 1995.
- LEONEL, M.; OLIVEIRA, M. Á. DE; FILHO, J. D. **Espécies tuberosas tropicais como matérias-primas amiláceas**. Raízes e amidos tropicais, n. v.1, p. 49–68, 2005.
- LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. **Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs**. Journal of Microbiological Methods, v. 43, p. 107–116, 2000.
- LI, C. et al. **Bioresource Technology High efficient treatment of citric acid effluent by *Chlorella vulgaris* and potential biomass utilization**. Bioresource Technology, v. 127, p. 248–255, 2013.
- LI, J. et al. **Effects of sodium bicarbonate on cell growth, lipid accumulation, and morphology of *Chlorella vulgaris***. Microbial Cell Factories, v. 17, n. 1, p. 111. 2018.
- LI, Y. et al. **Biomass production of commercial algae**. Life Science, v. 24, n. 1, p. 815–820. 2008.
- LOCARE, L. C. E. R. **Evaluation of extration methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs**. Jornal of Microbiological Methods, v. 43, p. 107 - 116. 2000.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Pricípios e Aplicações**. 1 Ed. São Carlos. RiMa, 2006. 606 p.
- MARÓSTICA JR., M. R.; PASTORE, G. M. **Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as a medium**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 3, p. 690–696. 2006.
- 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.
- MATOS, A. T. DE. **Poluição Ambiental: Impactos no meio físico**. 1. Ed., Viçosa. UFV, 2011. 260 p.

- MATSUURA, F. C. A. U.; FOLEGATTI, M. I. S.; SARMENTO, S. B. S. **Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: Processamento da mandioca**. 1. Ed., Brasília. Embrapa, 2003.115 p.
- MOKASHI, K. et al. **Achievements in the Life Sciences Sodium Bicarbonate as Inorganic Carbon Source for Higher Biomass and Lipid Production Integrated Carbon Capture in *Chlorella vulgaris***. *Achievements in the Life Sciences*, v. 10, n. 1, p. 111–117. 2016.
- MONDAL, M. et al. **Biochemical Responses to Bicarbonate Supplementation on Biomass and Lipid Productivity of *Chlorella sp.* BTA9031 Isolated from Coalmine Area**. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2017.
- MONDAL, M. et al. **Mixotrophic cultivation of *Chlorella sp.* BTA 9031 and *Chlamydomonas sp.* BTA 9032 isolated from coal field using various carbon source for biodiesel production**. *Energy Conversion and Management*, v. 124, p. 297 – 304. 2016.
- MOREIRA, E. G. **Crescimento e propriedades nutricionais de *Chaetoceros muelleri* lemmerman para aquicultura: comparação entre diferentes meios de cultivo**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2007. Dissertação (mestrado).
- MORWEISER, M. et al. **Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, n. 4, p. 1291–1301. 2010.
- MOSER, B. R. **Complementary blending of meadowfoam seed oil methyl esters with biodiesel prepared from soybean and waste cooking oils to enhance fuel properties**. *Energy & Environmental Science*, v. 4, p. 2160 – 2167. 2011.
- NAYAK, M. et al. **Enhanced carbon utilization efficiency and FAME production of *Chlorella sp.* HS2 through combined supplementation of bicarbonate and carbon dioxide**. *Energy Conversion and Management*, v. 156, p. 45–52, 2018.

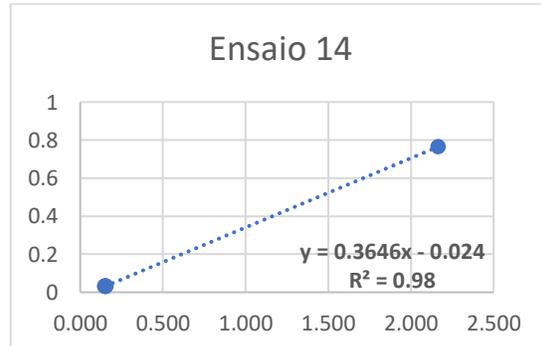
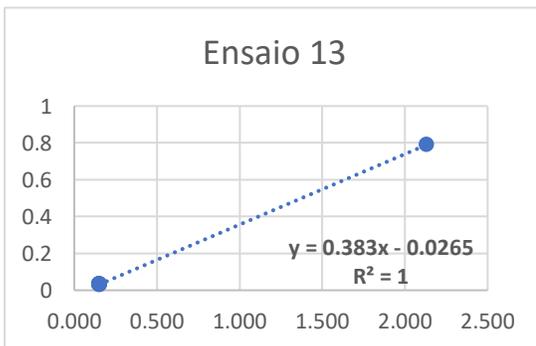
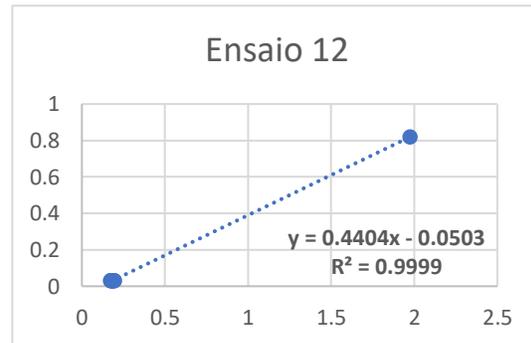
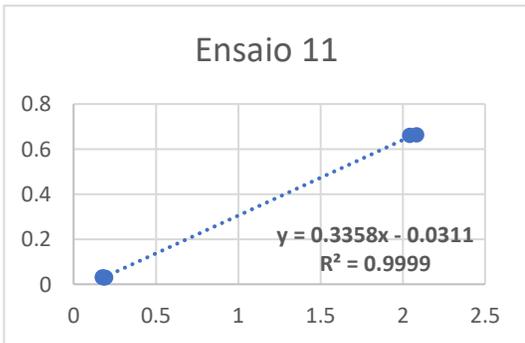
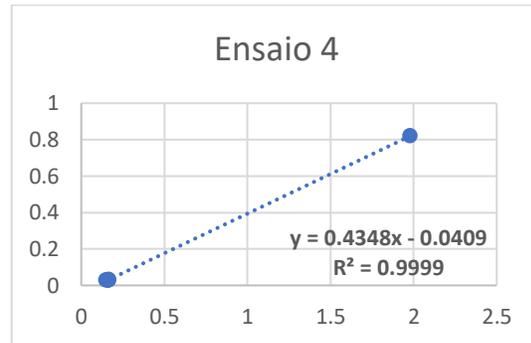
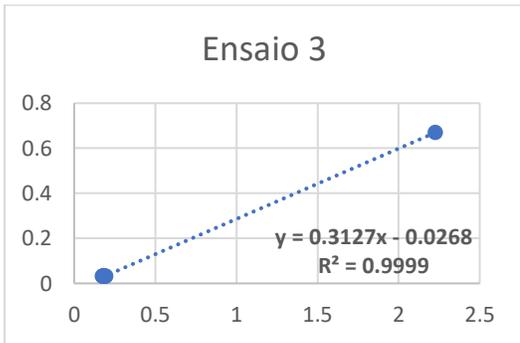
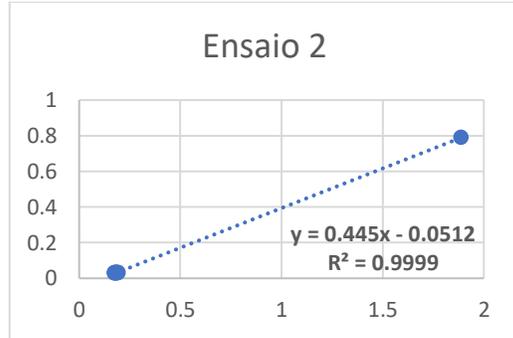
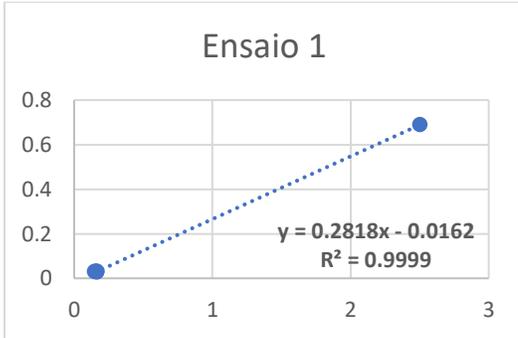
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. **Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production.** Applied biochemistry and biotechnology, v. 105–108, n. 7, p. 295–301. 2003.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. **Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater.** Bioresource Technology, v. 97, n. 2, p. 336–341. 2005.
- OLIVEIRA, R. M. **Estudo térmico e oxidativo em diferentes matrizes de biodiesel com adição de antioxidantes.** Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2012. 79 p. Dissertação (Mestrado).
- OSORIO, J. H. M. et al. **Nutrient removal from high strength nitrate containing industrial wastewater using *Chlorella sp.* strain ACUF _ 802.** Annals of Microbiology, v. 68, n. 8, p. 899-913. 2018.
- PENG, L. et al. **Control of protozoa contamination and lipid accumulation in *Neochloris oleoabundans* culture: Effects of pH and dissolved inorganic carbon.** Bioresource Technology, v. 197, p. 143–151. 2015.
- PINTO, P. H. M. **Tratamento de manipueira de feccularia em biodigestor anaeróbio para disposição em corpo receptor, rede pública ou uso em fertirrigação.** Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. 2008. 87 p. Dissertação (mestrado).
- RAO, A. R. et al. **Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents.** Bioresource Technology, v. 98, n. 3, p. 560–564. 2007.
- RAVEN, J. A. **Sensing pH ?** Plant Cell and Environment, v. 13, n. 7, p. 721–729. 1990.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 5 Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1996. 728 p.
- RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. **Microcalorimetria: Uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*.** Quimica Nova, v. 23, n. 2, p. 257–261. 2000.

- RIBAS, M. M. F. **Comparação da estabilização da maniveira com calcário e hidróxido de sódio na fase acidogênica da biodigestão anaeróbica e uso do biofertilizante.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2003. Dissertação (mestrado)
- RIBEIRO, S. DA C. A. et al. **Otimização da desidratação osmótica de filés de mapará (*Hypophthalmus edentatus*) através da metodologia de superfície de resposta.** Ciência e tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 2, p. 485–492. 2008.
- RICHMOND, A. **Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.** 1 Ed., Oxford. Blackwell Science, 2004. 577p.
- RIZWAN, M. et al. **Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 92, p. 394–404. 2018.
- RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. **Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae.** Journal of the American Oil Chemical Society, v. 89, n. 2, p. 189–198. 2012.
- SAKAI, N. et al. ***Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂.** Energy Conversion and Management, v. 36, n. 6–9, p. 693–696. 1995.
- SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ. **Prognóstico da mandioca 2017/18.** Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/>>. 2017. Acesso em: 20 de maio de 2019.
- SHAH, S. H. et al. **Improvement in lipids extraction processes for biodiesel production from wet microalgal pellets grown on diammonium phosphate and sodium bicarbonate combinations.** Bioresource Technology, v. 214, p. 199–209. 2016.
- SHARIATI, M.; HADI, M. R. **Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella*.** Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications, v.1, p. 484–506, 2011.

- SHI, X. et al. **Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures.** Process Biochemistry, v. 34, p. 341–347. 1999.
- SIEGLER, H. J. de la H. **Optimization of biomass and lipid production in heterotrophic microalgal cultures.** Edmonton: University of Alberta, 2012. 332 p. Tese (Doutorado).
- SILVA, A. C. et al. **Degradação de meios filtrantes na filtragem a vácuo.** Holos, v. 3, p. 309 – 318. 2014.
- SILVA, H. R. DA. **Produção de microalga *Neochloris oleoabundans* em diferentes sistemas de cultivo.** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2016. 114 p. Tese (Doutorado).
- SILVEIRA, J. B. et al. **Otimização de condições de cultivo heterotrófico de microalgas.** XI Congresso brasileiro de engenharia química em iniciação científica, 2015.
- SOUZA, A. D. V. **Cultivo heterotrófico axênico de *Chlorella vulgaris* : inibição por substrato.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012. 95 p. Dissertação (Mestrado).
- SPERLING, M. VON et al. **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção.** 1. Ed., Rio de Janeiro. ABES, 2009. 428 p.
- SPOLAORE, P. et al. **Commercial Applications of Microalgae.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 101, n. 2, p. 87–96. 2006.
- SUGANYA, T. et al. **Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 55, p. 909–941, 2016.
- TOMAS, C. **Cultivo de *Scenedesmus acuminatus* em água de maceração do milho e extração e quantificação de lipídeos.** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2016. 141 p. Dissertação (Mestrado).

- TU, Z. et al. **Potential of using sodium bicarbonate as external carbon source to cultivate microalga in non-sterile condition.** *Bioresource Technology*, v. 266, p. 109–115. 2018.
- VENKATA MOHAN, S.; DEVI, M. P. **Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae.** *Bioresource Technology*, v. 165, p. 288–294. 2014.
- WANG, L.; WANG, X.; LI, X. **Isotonic sodium bicarbonate-triggered emodin release from borate stabilized emodin nanoparticles-loaded polymeric microgel films.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 469, n. 1, p. 80–87. 2014.

ANEXO



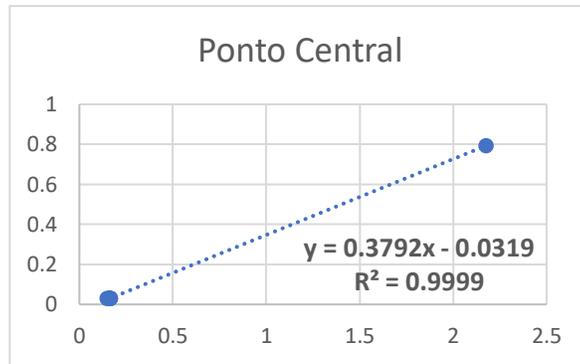


Figura 1: Curvas de regressão para determinação da biomassa durante o cultivo.