



LUISA FERNANDA RÍOS PINTO

Estudo do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. visando a
produção de biodiesel

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

LUIZA FERNANDA RÍOS PINTO

Estudo do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. visando a
produção de biodiesel

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
Química da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. MARIA REGINA WOLF MACIEL

Coorientador: Prof. Dr. LUIZ FERNANDO DA LIMA LUZ JUNIOR

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LUIZA
FERNANDA RIOS PINTO, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. MARIA REGINA WOLF MACIEL.

A handwritten signature in blue ink is positioned below the text. The signature is cursive and appears to be the name of the supervisor, Maria Regina Wolf Maciel. A horizontal line is drawn under the signature.

CAMPINAS

2014

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

R479e Ríos Pinto, Luisa Fernanda, 1981-
Estudo do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. visando a produção de biodiesel / Luisa Fernanda Ríos Pinto. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Regina Wolf Maciel.
Coorientador: Luiz Fernando de Lima Luz Junior.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microalga. 2. Biodiesel. 3. Lipídios. 4. Bioreatores. I. Maciel, Maria Regina Wolf, 1955-. II. Luz Junior, Luiz Fernando de Lima. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of microalga *Desmodesmus* sp. growth for biodiesel production

Palavras-chave em inglês:

Microalgae

Biodiesel

Lipids

Biorreactor

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Maria Regina Wolf Maciel [Orientador]

Elenise Bannwart de Moraes Torres

Roberta Ceriani

Gláucia Maria Ferreira Pinto

César Benedito Batistella

Data de defesa: 13-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

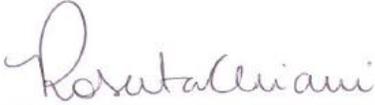
Tese de Doutorado defendida por Luisa Fernanda Ríos Pinto e aprovada em 13 de Fevereiro de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Maria Regina Wolf Maciel



Dra. Elenise Bannwart de Moraes Torres



Profa. Dra. Roberta Ceriani



Profa.Dra. Gláucia Maria Ferreira Pinto



Dr. César Benedito Batistella

RESUMO

Atualmente, a destruição ambiental devido à exploração inapropriada dos recursos naturais não renováveis, o aquecimento global, e a contaminação da biosfera causada, principalmente, pela globalização e um crescimento tecnológico acelerado, tem levado ao desenvolvimento de diversos combustíveis de fontes de energia renováveis, que sejam capazes de manter ou superar a eficiência dos hidrocarbonetos fósseis. Neste cenário, se deu o desenvolvimento do biodiesel, um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, o qual, na sua combustão, libera menos gases tóxicos, como são os óxidos de enxofre e nitrogênio. O biodiesel pode ser produzido a partir de gorduras animais, óleos vegetais ou biomassa. A fim de reduzir os custos da produção do biodiesel, matérias primas como os lipídios vêm sendo estudadas. Neste contexto, as microalgas oferecem uma série de vantagens como fonte de lipídios, como por exemplo, altas taxas fotossintetizantes, alta produção de biomassa e um rápido crescimento, se comparado, principalmente, com outras fontes de óleo vegetal. Neste trabalho, foi realizado o estudo do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. sob condição autotrófica, mixotrófica e heterotrófica com o objetivo de obter maior teor de lipídios na célula da microalga, visando a produção de biodiesel. Nas condições autotróficas, se obteve um crescimento de $53,1 \times 10^6$ células mL^{-1} . No cultivo mixotrófico, conseguiram-se 181×10^6 células mL^{-1} e no heterotrófico atingiu-se 298×10^6 células mL^{-1} , todos no sexto dia de cultivo. As porcentagens de lipídios foram de 23%, 25% e 17% (m/m) da biomassa para o cultivo autotrófico, mixotrófico e heterotrófico, respectivamente. O óleo extraído do cultivo autotrófico foi caracterizado via cromatografia gasosa e, a partir desta análise, produziu-se um óleo sintético (mistura de óleos vegetais e animais) com as características semelhantes da microalga para realizar a cinética da reação de transesterificação num reator em batelada. A produção de biodiesel foi feita por transesterificação ácida com excesso de etanol. O tempo de reação foi de 24 horas e obteve-se 90% de ésteres produzidos.

Palavras Chaves: microalga, biodiesel, fotobiorreator, lipídios, óleo sintético.

ABSTRACT

Currently, environmental destruction caused by inappropriate exploitation of non-renewable natural resources, global warming, and pollution of the biosphere caused mainly by globalization and accelerated technological growth has led to the development of various fuels from renewable source, which are able to maintain or exceed the effectiveness of fossil hydrocarbons. Biodiesel, a biodegradable fuel derived from renewable source, which releases less toxic gases such as sulfur and nitrogen oxides in its combustion. Biodiesel can be obtained from animal fats, vegetable oils or biomass. In order to reduce the cost of biodiesel production, raw materials such as lipids have been studied. In this context, microalgae offer a number of advantages as a source of fat, such as high photosynthetic rates, high biomass, and fast growth rate, compared to other sources of vegetable oil. The objective of this work was to study the autotrophic, mixotrophic and heterotrophic growths of microalgae *Desmodesmus sp* in order to optimize the levels of lipids in the microalgae cell to produce biodiesel. In autotrophic conditions, it was observed 5.31×10^7 cells ml^{-1} ; in mixotrophic were achieved 1.81×10^8 cells ml^{-1} ; and in heterotrophic reached 2.98×10^8 cells ml^{-1} were reached after sixth day of cultivation. The percentages of lipids of biomass for autotrophic, heterotrophic mixotrophic cultivation were 23%, 25% and 17% (m/m) respectively. Oil extracted from autotrophic cultivation was characterized via gas chromatography. A synthetic oil (mixture of vegetable and animal oils) with similar characteristics to the microalgae was used to perform the transesterification kinetics in a batch reactor. The production of such biodiesel was performed under acid conditions with excess of ethanol for 24 hours yielding 90% product.

Key Words: microalgae, biodiesel, photobioreactor, lipids, synthetic oil.

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVOS.....	4
1.2.1	Objetivo Geral	4
1.2.2	Objetivos Específicos	4
1.2	APRESENTAÇÃO DA TESE.....	6
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1	BIODIESEL	8
2.1.1.	História	9
2.1.2.	Matérias primas utilizadas na produção de biodiesel	10
2.1.3.	Produção de Biodiesel	15
2.1.3.1.	Pirólise.....	16
2.1.3.2.	Uso direto e misturas.....	17
2.1.3.3.	Microemulsões	17
2.1.3.4.	Transesterificação.....	18
2.1.1.	Normativas para a produção de biodiesel.....	19
2.2	MICROALGAS	23
2.2.1.	Espécies de microalgas.....	25
2.2.2.	Sistema para o cultivo	27
2.2.3.	Sistemas para produção de biomassa de microalgas	29
2.2.4.	Produção de biocombustíveis a partir de biomassa de microalgas.....	30
2.3	CONCLUSÕES PARCIAIS	36
3.	METODOLOGIA	37
3.1.	CULTIVO AUTOTRÓFICO	39

3.1.1.	Micro-organismo	39
3.1.2.	Meio de Cultivo	40
3.1.3.	Crescimento	42
3.1.4.	Estresse de nutrientes (Nitrogênio).....	43
3.1.5.	Métodos	44
3.1.5.1.	Massa celular	44
3.1.5.1.1.	Microscópio.....	44
3.1.5.1.2.	Espectroscopia UV/Visível	45
3.1.5.2.	Recuperação da biomassa	46
3.1.5.3.	Secagem da biomassa	46
3.1.5.3.1.	Estufa.....	46
3.1.5.3.2.	Liofilizador.....	47
3.1.5.4.	Quantificação de pigmentos: clorofila e carotenóides	47
3.1.5.5.	Extração de lipídios	48
3.1.5.6.	Identificação de lipídios	49
3.1.5.6.1.	Análise por fluorimetria.....	49
3.1.5.6.2.	Análise FT-IR.....	50
3.1.5.7.	<i>Scale up</i>	51
3.2.	CULTIVO HETEROTRÓFICO	52
3.2.1.	Micro-organismo	53
3.2.2.	Meio de Cultivo	53
3.2.3.	Crescimento	54
3.2.4.	Controle de bactérias	55
3.2.7.1.	Crescimento.....	59

3.2.7.1.1.	Microscópio.....	59
3.2.7.1.2.	Espectrofotômetro	60
3.3.	CULTIVO MIXOTRÓFICO.....	61
3.3.1.	Crescimento.....	61
3.3.2.	Meio de Cultivo.....	62
3.3.3.	Extração de lipídios.....	62
3.3.4.	Comparação do crescimento e metabólitos de interesse nos cultivos autotróficos, mixotróficos e heterotróficos	62
3.3.5.	Métodos.....	62
3.3.6.	Comparação do cultivo autotrófico, mixotrófico e heterotrófico.....	63
3.3.6.1.	Velocidade de crescimento.....	63
3.3.6.2.	Tempo de duplicação	64
3.4.	ÓLEO SINTÉTICO.....	64
3.4.1.	Óleos.....	69
3.4.2.	Estudo da reação de transesterificação	69
3.4.2.1.	Estudo da catálise da reação.....	69
3.4.2.1.1.	Catálise básica	69
3.4.2.1.1.	Catálise ácida.....	71
3.4.3.	Planejamento de experimentos	72
3.4.3.1.	Planejamento fracionado resolução IV	72
3.4.3.2.	Planejamento fatorial completo 2 ²	73
3.5.	MÉTODOS.....	75
3.5.1.	Determinação do teor de ácidos graxos livres	75
3.5.2.	Composição em ácidos graxos	75
3.5.3.	Quantificação dos TG, DG, MG, ésteres e GL.....	76

3.5.4.	Estabilidade do óleo sintético	77
3.6.	CONCLUSÕES PARCIAIS	78
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	79
4.1.	CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO DA MICROALGA <i>Desmodesmus</i> sp.	79
4.1.1.	Crescimento	80
4.1.2.	Extração de lipídios	83
4.1.3.	Teor de ácidos graxos livres	83
4.1.4.	Caracterização dos ácidos graxos	84
4.1.5.	Estresse de nutrientes (Nitrogênio).....	86
4.1.5.1.	Crescimento.....	86
4.1.5.2.	Teor de lipídios.....	90
4.1.5.2.1.	Fluorimetria	90
4.1.5.2.2.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	95
4.1.5.1.	Extração e quantificação de lipídios.....	96
4.1.6.	Quantificação da clorofila e carotenóides	99
4.1.7.	Crescimento em tanque de 30 L	99
4.2.	CRESCIMENTO HETEROTRÓFICO DA MICROALGA <i>Desmodesmus</i> sp.	99
4.2.1.	Crescimento em placas de Petri.....	99
4.2.1.1.	Controle de bactérias.....	100
4.2.1.2.	Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	100
4.2.1.3.	Isolamento da cepa com antibióticos	101
4.2.1.4.	Esgotamento por estrias	102
4.2.2.	Crescimento heterotrófico	102

4.2.2.1.	Consumo de Glicose.....	103
4.2.2.2.	Porcentagem de lipídios	103
4.2.3.	Estresse de nutrientes (nitrogênio) no cultivo heterotrófico.....	104
4.2.3.1.	Crescimento.....	104
4.2.3.2.	Consumo de glicose	105
4.2.3.3.	Porcentagem de lipídios	106
4.3.	CRESCIMENTO MIXOTRÓFICO DA MICROALGA <i>Desmodesmus</i> sp.	107
4.4.	ÓLEO SINTÉTICO.....	112
4.4.1.	Caracterização em ácidos graxos.....	115
4.4.2.	Quantificação dos ácidos graxos livres	118
4.4.3.	Estabilidade do óleo sintético	119
4.4.4.	Produção de biodiesel.....	122
4.4.4.1.	Análise da catálise da reação.....	122
4.4.4.1.1.	Catálise básica	122
4.4.4.1.2.	Catálise ácida.....	123
4.4.4.2.	Planejamento de experimentos.....	125
4.4.4.2.1.	Planejamento fracionado resolução IV	125
4.4.4.2.2.	Planejamento fatorial completo	128
4.5.	CONCLUSÕES PARCIAIS	132
5.	CONCLUSÕES.....	135
5.1.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	136
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

*A minha família: Rosalba Pinto, Jesus Rios,
Carlos Andrés, Sandra e Maria Clara pelo
apoio e por acreditar neste sonho.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família, minha mãe Rosalba Pinto, meu pai Jesus Maria Rios e sua esposa Janeth, que sempre ficaram do meu lado me apoiando em tudo o que precisei morando longe deles. Meu irmão Carlos Andrés, que sempre acreditou em mim e me apoiou desde o começo da minha vida profissional, apoiando-me incondicionalmente em todos os aspectos. Minha irmã Sandra, que sempre foi o ombro quando precisei e a minha sobrinha Maria Clara que sempre com um sorriso alegrou os meus dias de estresse. Muito obrigado!

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Regina Wolf Maciel, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo desde o meu mestrado, pelo apoio e orientação; ao Prof. Dr. Rubens Maciel Filho, pelas conversas e pelas oportunidades.

À Profa. Dra. Eneida de Paula e seu grupo do Laboratório de Biomembranas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela colaboração para as análises realizadas.

Ao Prof. Dr. Alfredo Martinez e seu grupo do Instituto de Biotecnologia da UNAM pela orientação, apoio, ensinamento, conversas, discussões e pela amizade que se criou em tão pouco tempo.

Aos meus fofinhos (Marcele e Anderson) que sem eles, com certeza tinha ido embora logo de terminar o mestrado, obrigada pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida, amo vocês de paixão!

A minha amiga Edinara Boss, que sempre esteve quando mais precisei, a Dona Angelina e sua família. Obrigada.

Aos colegas do LOPCA/LDPS especialmente a Nivea, Laurinha, Yurani, Jaiver, Cibelem, Viktor e Paulinha obrigada pelas convivências e pela confiança.

Aos amigos Oscar, Jose, Henderson, Sergioo, Nata, Debora, Caren, Fernando, Mari, Evandro e Bruno que fizeram a vivencia no Brasil mais gostosa, querendo ficar por mais e mais tempo.

Ao Felipe pela companhia na fase final e pelo apoio quando mais precisei, obrigada!

Às amigas feitas no México: Estefania, Vivi, Cessna e Lili, que fizeram a minha estadia mais agradável, obrigada pelas viagens e pelas risadas, espero poder encontrá-las novamente em algum lugar do mundo.

Aos amigos que estão por outros lugares, Lili, Maria Paula, Natas, Kevin, Oscar Mejia, Adriana, Tatiana. Obrigada pela amizade incondicional, que apesar dos anos e da distancia ainda continua.

À CAPES, pelo suporte financeiro e pela bolsa de estudo.

Ao Banco Santander pela apoio à pesquisa e bolsa sanduíche.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Produção mundial de óleo.....	11
Figura 2.2. Produção mundial de biodiesel	15
Figura 2. 3. Reação geral de transesterificação	18
Figura 2. 4. Diversos produtos energéticos a partir da biomassa da microalga	31
Figura 2. 5. Etapas de preparação da microalga para produção de biodiesel	35
Figura 3.1. Descrição da metodologia experimental	38
Figura 3.2. Microalga <i>Desmodesmus</i> sp. doada pelo Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA).....	39
Figura 3.3. Equipamento de crescimento da microalga <i>Desmodesmus</i> sp. (a) banco de luzes, (b) cultivo em crescimento.....	42
Figura 3.4. Crescimento em tanques abertos no GIA-UPFR.	43
Figura 3. 5. Microscópio óptico Olympus CX21	44
Figura 3. 6. (a) Câmara de Neubauer, (b) Contagem de células.....	45
Figura 3. 7. Espectrômetro Cintra 10e UV/visível.....	45
Figura 3.8. Centrífuga Eppendorf 5810R	46
Figura 3.9. Liofilizador LABCONCO.....	47
Figura 3.10. Método Bligh & Dyer	49
Figura 3. 11. Curva típica gerada por fluorimetria.....	50
Figura 3. 12. Curva análise FT-IR.....	51
Figura 3. 13. <i>Scale up</i> do crescimento (a) Erlemenmeyer de 1, 3 e 6 L, (b) Tanque de 30 L.....	52
Figura 3. 14. Microalga <i>Desmodesmus</i> sp. isolada.....	53
Figura 3. 15. Crescimento em placas Petri	55
Figura 3. 16. Crescimento em incubadora.....	55
Figura 3. 17. Técnica de Gram	56
Figura 3. 18. Diluição do inóculo para contagem de bactérias.....	57
Figura 3. 19. Técnica de esgotamento por estrias.....	58
Figura 3. 20. Microscópio Nikon	60
Figura 3. 21. Espectrômetro BECKMAN DU 650.....	60

Figura 3. 22. Analisador de Glicose YSI 2700 SELECT	61
Figura 3. 23. Curvas de densidade celular (a) escala aritmética (b) escala logarítmica	63
Figura 3. 24. Gráfico de composição em ácidos graxos de diferentes óleos.....	66
Figura 3. 25. Reação de neutralização	70
Figura 3. 26. Etapas de preparação da matéria prima.....	70
Figura 3. 27. Reator Batch de 50 mL	71
Figura 3. 28. Estudo do álcool na reação de transesterificação ácida	71
Figura 3. 29. Bateria de reatores.....	75
Figura 3.29. Cromatógrafo CPG Viscotek TDA 302	76
Figura 3.30. Cromatograma típico de uma amostra de biodiesel obtido no GPC Viscotek TODA 302	77
Figura 3.31. Equipamento modelo 2920 Modulated DSC da TA instruments.....	77
Figura 4. 1. Análise MO da microalga <i>Desmodesmus</i> sp. (a) ampliação 200x, (b) ampliação 500x	79
Figura 4. 2. Análise MEV da microalga <i>Desmodesmus</i> sp.	80
Figura 4. 3. Curva de crescimento em tanques abertos da microalga <i>Desmodesmus</i> sp.	81
Figura 4. 4. Curva de crescimento da microalga <i>Desmodesmus</i> sp.em meio BG-11	82
Figura 4. 5. Comparação do crescimento celular nos meios BG-11 e Guillard f/2.....	83
Figura 4. 6. Crescimento dos quatro cultivos com diferentes concentrações de Nitrogênio.....	87
Figura 4.7. Crescimento celular nos quatro níveis de nitrogênio no meio de cultivo	88
Figura 4. 8. Comparação do crescimento celular no meio 100 N e 50 N.....	88
Figura 4. 9. Comparação do crescimento celular do meio 50N e do meio 100/50 N.....	89
Figura 4. 10. Comparação dos espectros de emissão no início dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.....	91
Figura 4. 11. Comparação dos espectros de emissão no primeiro dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.	91
Figura 4. 12. Comparação dos espectros de emissão no segundo dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.	92
Figura 4. 13. Comparação dos espectros de emissão no terceiro dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.	92

Figura 4. 14. Comparação dos espectros de emissão no quarto dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.	93
Figura 4. 15. Comparação dos espectros de emissão no quinto dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.	94
Figura 4. 16. Comparação dos espectros de emissão no sexto dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.	94
Figura 4. 17. Comparação dos espectros de emissão no sétimo dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.	95
Figura 4. 19. Biomassa seca do cultivo (a) 0%N, (b) 25%N, (c) %50N, (d) 100%N.	96
Figura 4. 18. Comparação do espectro do FT-IR da biomassa seca nos diferentes níveis de nitrogênio no segundo, quarto e sétimo dia de cultivo	97
Figura 4. 20. Extração de lipídios nos quatro cultivos.	98
Figura 4. 21. Lipídios nos quatro cultivos.	98
Figura 4. 22. Crescimento de bactérias em placas Petri	100
Figura 4. 23. Contagem de bactérias	101
Figura 4. 24. Cultivo em estrias para o isolamento da microalga	102
Figura 4. 25. Crescimento heterotrófico da microalga <i>Desmodesmus</i> sp.....	103
Figura 4. 26. Consumo de glicose cultivo heterotrófico.....	104
Figura 4. 27. Crescimento celular nas diferentes concentrações de nitrogênio.....	105
Figura 4. 28. Consumo de glicose nos cultivos com diferentes concentrações de nitrogênio	106
Figura 4. 29. Crescimento celular no cultivo mixotrófico da microalga <i>Desmodesmus</i> sp.	108
Figura 4. 30. Consumo de glicose no cultivo mixotrófico	108
Figura 4. 31. Comparação do crescimento celular da microalga <i>Desmodesmus</i> sp. nos três sistemas de cultivo.....	109
Figura 4. 32. Comparação da coloração dos cultivos cultivo mixotrófico a esquerda, na metade cultivo heterotrófico e a direita cultivo autotrófico	112
Figura 4. 33. Curva de DSC em triplicata do óleo de coco babaçu obtidas sob atmosfera de N ₂ (50 mL.min ⁻¹).....	119
Figura 4. 34. Curva de DSC em triplicata do óleo de palma obtidas sob atmosfera de N ₂ (50 mL.min ⁻¹).....	120

Figura 4. 35. Curva de DSC em triplicata do óleo de peixe obtidas sob atmosfera de N ₂ (50 mL.min ⁻¹).....	120
Figura 4. 36. Curva de DSC em triplicata do óleo sintético obtidas sob atmosfera de N ₂ (50 mL.min ⁻¹).....	121
Figura 4. 37. Curva de consumo de TG, DG e MG e produção de glicerina e ésteres metílicos	124
Figura 4. 38. Curva de consumo de TG, DG, MG e produção de glicerina e ésteres etílicos.....	125
Figura 4. 39. Diagrama de Pareto planejamento resolução IV	127
Figura 4. 40. Diagrama de Pareto planejamento fatorial completo 2 ²	130
Figura 4. 41. (a) Superfície de resposta, (b) curva de contorno para a resposta de ésteres etílicos em função da porcentagem de catalisador e o tempo de reação.	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Comparação entre o combustível fóssil e biocombustíveis de primeira, segunda e terceira gerações.	8
Tabela 2.2. Comparação de matérias primas para produção de biodiesel	13
Tabela 2.3. Propriedades físico-químicas das matérias primas para a produção de biodiesel.	14
Tabela 2. 4. Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de catálise usadas na produção de biodiesel.....	20
Tabela 2. 5. Especificações das normas ANP 07/2008, ASTM D6751 e EN14214	22
Tabela 2. 6. Conteúdo de lipídios e produtividades de diferentes espécies de microalgas,	25
Tabela 2. 7. Comparação dos sistemas abertos e fechados	31
Tabela 2. 8. Perfil de ácidos graxos de diferentes espécies de microalgas.....	33
Tabela 2. 9. Comparação das propriedades do biodiesel proveniente do óleo de microalga, diesel convencional e a norma ASTM para biodiesel.....	36
Tabela 3. 1. Composição meio de cultivo Guillard f/2.....	40
Tabela 3. 2. Composição meio de cultivo BG-11.....	41
Tabela 3. 3. Composição de nitrogênio no meio de cultivo	43
Tabela 3. 4. Composição dos meios de cultivo	54
Tabela 3.5. Concentrações de antibióticos	57
Tabela 3. 6. Composição de nitrogênio no meio de cultivo	59
Tabela 3. 7. Base de dados dos óleos e nomenclatura.....	65
Tabela 3.8. Composição em ácidos graxos.....	67
Tabela 3.9. Composição em ácidos graxos.....	68
Tabela 3.10. Condições de operação da reação de transesterificação	69
Tabela 3. 11. Níveis planejamento fracionado resolução IV.....	73
Tabela 3. 12. Níveis das variáveis	73
Tabela 3. 13. Níveis planejamento estrela.....	74
Tabela 3. 14. Níveis das variáveis	74
Tabela 4. 1. Perfil dos ácidos graxos da microalga <i>Desmodesmus</i> sp.....	84

Tabela 4. 2. Perfil dos ácidos graxos majoritários de várias linhagens do gênero <i>Desmodesmus</i> sp.	86
Tabela 4. 3. Porcentagem de lipídios nos quatro cultivos	98
Tabela 4. 4. Resultados dos antibióticos	101
Tabela 4. 5. Porcentagem de lipídios.....	106
Tabela 4. 6. Comparação do crescimento celular dos três cultivos	110
Tabela 4. 7. Valores de velocidade de crescimento e tempo de duplicação.....	110
Tabela 4. 8. Porcentagem de lipídios.....	111
Tabela 4. 9. Clorofila e carotenóides.....	112
Tabela 4. 10. Perfil de ácidos graxos de óleos.....	117
Tabela 4. 11. Perfil de acilgliceróis dos óleos	118
Tabela 4. 12. Ácidos graxos livres	118
Tabela 4. 13. Ponto de fulgor dos óleos a pressão atmosférica	121
Tabela 4. 14. Resultados da reação básica T=60°C.....	123
Tabela 4. 15. Resultados planejamento fracionado resolução IV.....	126
Tabela 4. 16. Coeficientes de regressão para a conversão de EE.....	127
Tabela 4. 17. Resultados planejamento fatorial completo 2 ²	129
Tabela 4. 18. Coeficientes de regressão para a conversão de EE.....	129
Tabela 4. 19. Coeficientes de regressão para a conversão de EE.....	130
Tabela 4. 20. Tabela ANOVA	131

NOMENCLATURA

ABREVIATURAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

AG - Ácidos Graxos

AGL - Ácidos Graxos Livres

AOCS - *American Oil Chemists' Society*

ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Bicompostíveis

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

ATR - Refletância Total Atenuada

Cb - Carbenicilina

CG - Cromatografia Gasosa

Cm - Cloranfenicol

CPG - Cromatografia de Permeação em Gel

DSC - *Differential Scanning Calorimetry*

DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional

DG - Diacilgliceróis

EE - Ésteres Etílicos

EM - Ésteres Metílicos

EN - *European Standards*

FAME - *Fatty Acid Methyl Ester*

FBRs - Fotobiorreatores

FT-IR - *Fourier transform infrared spectroscopy*

GIA - Grupo Integrado de Aquicultura e Meio Ambiente

GNC - Gás Natural Comprimido

GLP - Gás Liquefeito de Petróleo

IBT - Instituto de Biotecnologia

Km - Kanamicina

LDPS - Laboratório de Desenvolvimento de Processos de Separação

LRAC - Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

MG - Monoacilgliceróis

MO - Microscópio Óptico

TG - Triacilgliceróis

UNAM - Universidade Autônoma do México

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

UPFR - Universidade Federal do Paraná

VARIÁVEIS MATEMÁTICAS

A_{480} - absorbância lida a um comprimento de onda de 480 nm

A_{650} - absorbância lida a um comprimento de onda de 650 nm

A_{665} - absorbância lida a um comprimento de onda de 665 nm

C - porcentagem de catalisador

t_d - tempo de duplicação

t - tempo da reação

x_1 - fração mássica do óleo de palma

x_2 - fração mássica do óleo de coco

x_3 - fração mássica do óleo de soja

x_4 - fração mássica do óleo de peixe

x_5 - fração mássica do óleo de borragem

x_6 - fração mássica do óleo de girassol

x_7 - fração mássica do óleo de abacate

x_8 - fração mássica do óleo de algodão

x_9 - fração mássica do óleo de amêndoas

x_{10} - fração mássica do óleo de amendoim

x_{11} - fração mássica do óleo de arroz

- x₁₂ - fração mássica do óleo de canola
- x₁₃ - fração mássica do óleo de castanha do Pará
- x₁₄ - fração mássica do óleo de cenoura
- x₁₅ - fração mássica do óleo de coco babaçu
- x₁₆ - fração mássica do óleo de palmiste
- x₁₇ - fração mássica do óleo de gergelim
- x₁₈ - fração mássica do óleo de germe de trigo
- x₁₉ - fração mássica do óleo de linhaça
- x₂₀ - fração mássica do óleo de maracujá
- x₂₁ - fração mássica do óleo de milho
- X - densidade celular
- μ - velocidade específica de crescimento

1. INTRODUÇÃO

O aumento na demanda mundial por combustíveis, o frequente aumento do preço do petróleo, o aquecimento global e a possibilidade de esgotamento dos combustíveis fósseis tem colocado o biodiesel em posição de destaque como combustível alternativo e tem motivado muitos pesquisadores em função do seu grande potencial de uso e alto rendimento. O biodiesel é definido pela *American Society for Testing Materials* (ASTM) como um combustível líquido sintético, originário de matéria prima renovável e constituído por uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeias longas, derivados de óleos vegetais ou gorduras animais (WANG et al., 2007).

O biodiesel é obtido, geralmente, através da reação de transesterificação, que ocorre mediante a reação de óleos ou gorduras de origem animal ou vegetal com um álcool na presença de um catalisador. Vários óleos vegetais (comestíveis ou não comestíveis) e seus derivados vêm ganhando reconhecimento como matéria prima para obtenção de combustíveis com potencial para substituir os combustíveis convencionais (KARMEE et al., 2004). Alguns dos óleos já em uso para a produção do biodiesel são os óleos de soja (FREEDMAN, BUTTERFIELD E PRYDE, 1986), palma (DARNOKO E CHEYRAN, 2000), coco (JITPUTTI et al., 2006), milho (DANTAS et al., 2007) canola (KUSDIANA E SAKA, 2001), dentre outros. Apesar do bom desenvolvimento do processo de produção do biodiesel em larga escala a partir de oleaginosas, a produção não é satisfatória para suprir a demanda mundial.

A crescente preocupação com o meio ambiente tem incentivado as pesquisas com biocombustíveis. A legislação dos países, visando diminuir a emissão de gases estufa, tem levado a usar misturas com porcentagens de biocombustíveis nos combustíveis fósseis, o que contribui para o aumento da produção mundial de biocombustíveis.

Segundo a ANP (2013), 45% da energia e 19% dos combustíveis consumidos no País são renováveis. A matéria prima mais usada para a produção de biodiesel no Brasil é o óleo de soja, que representa 80% da produção do biodiesel. Em 2007, foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e em 2008 começou a obrigatoriedade da adição de 2% de biodiesel no diesel (B2). Em 2010, aprovou-se a mistura de 5% (B5) a qual é mantida atualmente. O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção

anual em 2010 de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada de 5,8 bilhões de litros (ANP, 2010).

Como uma alternativa para a produção do biodiesel, a sua obtenção a partir de óleo de microalgas surgiu como uma das melhores promessas devido a vários fatores, dentre eles, o cultivo não precisa de grandes áreas, nem de terras aráveis, tem um crescimento exponencial e alta produção de biomassa e não são utilizadas para fins alimentares.

As microalgas são micro-organismos unicelulares que podem crescer em ambientes de água doce e salgada. A produção de metabólitos de interesse na microalga tem sido estudada e é de grande interesse para várias áreas industriais. Como metabólitos de interesse podem-se citar os carboidratos, proteínas, esteróis, aminoácidos, ácidos graxos e carotenóides (KIRROILA, BISHNOI E SINGH, 2013). Vários biocombustíveis podem ser produzidos a partir desta matéria prima como: bioetanol, gás de síntese, hidrogênio e biodiesel.

A produção de microalgas, visando à extração de seus lipídios para a produção de biodiesel, também contribui como agente para a minimização das concentrações atmosféricas de dióxido de carbono e aproveitamento de efluentes industriais em cultivos heterotróficos (VALDERRAMA et al., 2002) (DE-BASHAN et al., 2004) (MORALES-SANCHEZ et al., 2013). Este, inclusive, é um dos aspectos inovadores do projeto temático BIOEN (“Um Processo Integrado para Produção Total de Bioetanol e Emissão Zero de CO₂” – Processo FAPESP nº 2008/57873-8), coordenado pelo Prof. Dr. Rubens Maciel Filho e do projeto Pro-engenharias Rede de Pesquisa em Engenharia de Biocombustíveis – ENGEBIOCOMB Processo CAPES 358/2007), coordenado pela Profa. Dra. Maria Regina Wolf Maciel da UNICAMP e pelo Prof. Dr. Luiz Fernando de Lima Luz Junior da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Este trabalho de tese também teve a parceria da Universidad Autónoma de México (UNAM), onde foi realizado o doutorado sanduíche.

No Laboratório de Desenvolvimento de Processos de Separação (LDPS) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), vários estudos experimentais na área do biodiesel foram concluídos, dentre eles, os projetos intitulados: Otimização das variáveis de processo da transesterificação (etanólise) do óleo de mamona: produção de biodiesel (DA SILVA, 2006); Determinação experimental dos dados cinéticos da reação de transesterificação de óleos vegetais (GONZALEZ, 2009); Sistemas de extração líquido-líquido para processos de purificação de

biodiesel (ARDILA, 2009); Desenvolvimento e avaliação de microreatores: aplicação para produção de biodiesel (ARIAS, 2010); Caracterização de sistemas envolvidos nos processos de purificação de biodiesel (MACHADO, 2010); Produção de biodiesel: processo e caracterizações (DA SILVA, 2010); Otimização das variáveis de processo da transesterificação do óleo de soja e milho: produção de biodiesel em uma coluna de pratos perfurados (DANTAS, 2011); Síntese de biodiesel a partir de óleo de mamona empregando etanol subcrítico (RODRIGUEZ, 2011); dentre outros.

E na parte de simulação, foram concluídos trabalhos intitulados: Simulação e análise de custos na produção de biodiesel a partir de óleos vegetais (SANTANA, 2008); Modelagem e simulação de uma planta de destilação reativa para a produção de biodiesel (SANTANDER, 2010); Criação do banco de dados, simulação e análise energética do processo de produção do biodiesel de soja, mamona e pinhão manso (MIRANDA, 2011).

Na área das microalgas têm-se trabalhos de mestrado concluídos, como é o caso do estudo da microalga *Chorella Vulgaris* para produção de bioetanol (KLEIN, 2013) e projetos de pós-doutorado que estão em andamento com o objetivo de produzir biodiesel em fotobiorreatores: Projeto e construção de um Fotobiorreator *airlift* agitado para a produção de biodiesel (SANTOS, 2010) e no processo de extração supercrítica, com o projeto: Desenvolvimento do processo de obtenção do biodiesel de microalga *botryococcus braunii* por transesterificação supercrítica (SANTANA, 2011).

Atualmente, o processo de obtenção do biodiesel a partir dos lipídios provenientes da biomassa das microalgas está sendo bastante pesquisado. Inúmeras são as vantagens de se usar esta matéria prima, sendo algumas delas: obtenção de maior quantidade de óleo por unidade de área cultivada, concentração elevada dos teores lipídicos naturalmente, crescimento exponencial, utilização de CO₂ para o seu crescimento, possibilidade de crescer em águas residuais e não serem usadas como alimento essencial humano. Um dos inconvenientes é que os processos ainda não são economicamente viáveis e sua produção não é suficiente para garantir o futuro do programa brasileiro de biodiesel, que pretende chegar até 50% de biodiesel na mistura com o óleo diesel. Dados reportados em 2011 mostram que o setor de transportes foi responsável por quase um terço do consumo de energia no Brasil (PORTAL BRASIL, 2012). Assim sendo, a microalga surge no cenário de biocombustíveis como uma matéria prima extremamente interessante,

principalmente pelo seu potencial de crescimento rápido, visando suprir a necessidade de aumento da produção de biodiesel para atender o mercado. Dessa forma, o objetivo deste trabalho, é aumentar a quantidade de lipídios da microalga *Desmodesmus* sp. bem como o seu crescimento em (número de células/mL) nos cultivos.

1.1 OBJETIVOS

Para o desenvolvimento dessa tese de doutorado é apresentado, a seguir, o objetivo geral e os objetivos específicos.

1.2.1 Objetivo Geral

Como objetivo geral, estudou-se o crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. visando a produção de biodiesel por meio da reação de transesterificação dos lipídios extraídos da microalga.

1.2.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos, têm-se:

- Investigar o crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. em diferentes meios de cultivo.
- Investigar o processo de extração de lipídios da microalga *Desmodesmus* sp.
- Caracterizar experimentalmente os lipídios extraídos da microalga *Desmodesmus* sp.: composição em ácidos graxos.
- Produzir um óleo sintético que se aproxime da composição dos ácidos graxos da microalga *Desmodesmus* sp.

- Investigar as condições de operação para a produção de biodiesel a partir da reação de transesterificação do óleo sintético em um reator em batelada.
- Estudar como a diminuição do nitrogênio no meio de cultivo afeta o crescimento e o teor de lipídios.
- Realizar o *scale-up* do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. em um tanque de 30L.
- Estudar o crescimento heterotrófico usando a glicose como fonte de carbono.
- Comparar o crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. em condições autotróficas, mixotróficas e heterotróficas.

1.2 APRESENTAÇÃO DA TESE

O presente trabalho é apresentado em cinco capítulos. O Capítulo 1 apresenta uma introdução, seguido dos objetivos geral e específicos propostos para o trabalho de doutorado.

O Capítulo 2 mostra a revisão da literatura dos conceitos relacionados a este trabalho, características, cultivos, produção, história e produtos das microalgas, definição, características, produção e normativas do biodiesel.

No Capítulo 3, descreve-se o desenvolvimento experimental, os materiais e métodos utilizados para o trabalho de doutorado, a descrição dos equipamentos e a metodologia que foi utilizada para o planejamento de experimentos.

O Capítulo 4 mostra os resultados obtidos: produção do óleo sintético, estudo da reação de transesterificação, planejamentos e análise estatística dos experimentos. Ainda, encontram-se o trabalho feito com a microalga *Desmodesmus* sp., estudo do crescimento, extração dos lipídios e análises.

No Capítulo 5, são apresentadas as conclusões do trabalho e as sugestões para trabalhos futuros na área.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica dos conceitos usados para o desenvolvimento do trabalho de doutorado. São detalhadas a definição, história, matérias primas, normativas e processos da produção de biodiesel e também é apresentada uma história do uso das microalgas, meios de cultivos, equipamentos para seu cultivo, diferentes usos das microalgas e a produção de biodiesel a partir dos lipídios extraídos da microalga.

Antigamente, as pesquisas estavam direcionadas na exploração, obtenção, aproveitamento e desenvolvimento de tecnologias que envolvessem o petróleo, carbono e gás natural e que tornassem viável a utilização destas matérias primas para as áreas de energia, química fina, farmacêutica, indústrias de detergentes, fibras sintéticas, plásticos, pesticidas, fertilizantes, lubrificantes, solventes, ceras, coque, asfalto, entre outras. Mas os recursos fósseis, além de não serem sustentáveis e proteger o meio ambiente, são um recurso finito. A queima de um combustível fóssil é o maior contribuinte da emissão de CO₂ na atmosfera, o que está diretamente associado com o aquecimento global. Por estas razões as pesquisas atualmente se voltam para a produção de biocombustíveis, que são derivados de produtos renováveis como óleos provenientes da biomassa de vegetais e micro-organismos (NINGAM E SINGH, 2011).

A Tabela 2.1 faz uma comparação dos combustíveis fósseis e os biocombustíveis de primeira, segunda e terceira gerações. São chamados biocombustíveis de primeira geração aqueles que são produzidos por óleos vegetais, açúcares, grãos ou sementes e que, atualmente, estão sendo usados em proporções de mistura segundo a lei de cada país. Já os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir de matérias primas lignocelulósicas que vem da biomassa das plantas, resíduos ou óleos não comestíveis; os processos são mais sofisticados e tem um investimento maior por unidade de produção. Os de terceira geração são produzidos a partir de matérias primas como micróbios e microalgas. Estes processos atualmente estão sendo pesquisados e tem um alto valor de investimento. (NINGAM E SINGH, 2011; PRAGYA, PANDEY E SAHOO, 2013).

Tabela 2.1. Comparação entre o combustível fóssil e biocombustíveis de primeira, segunda e terceira gerações.

Combustível	Matérias primas	Produtos	Vantagens	Desvantagens	
Fóssil	Petróleo	Gás Natural Comprimido (GNC), Gás liquefeito de petróleo (GLP) diesel, querosene, lubrificantes, combustíveis para Jet	Tecnologias desenvolvidas, maior potência no motor.	Diminuição de reservas, poluição ambiental.	
Biocombustíveis	1 geração	Óleos vegetais, cana de açúcar.	Biodiesel, bioetanol, biogás.	Amigável ambientalmente, econômico.	Matérias primas limitadas (alimento-combustível)
	2 geração	Óleos não comestíveis, biomassa, resíduos da agricultura, biomassa aquática, grama.	Biodiesel, bioetanol, bio-óleo, butanol.	Não comestíveis, ambientalmente amigável.	Tecnologias em andamento, alto custo de produção.
	3 geração	Microalgas, micróbios.	Biodiesel, bioetanol, hidrogênio	Não comestíveis, ambientalmente amigável, produtividade muito alta.	Alto custo de produção, tecnologias em andamento

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

Este trabalho se concentra na produção de biodiesel de terceira geração. A seguir, se encontra uma revisão da produção, matérias primas mais usadas e novas tecnologias de produção.

2.1 BIODIESEL

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, podendo ser produzido a partir de gorduras animais, óleos vegetais e óleos provenientes de microalgas e micróbios. Este combustível é utilizado em motores de ignição por compressão ou motores diesel. Pode-se definir como uma mistura de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, 12 a

20 átomos de carbono por molécula saturados e insaturados, com um intervalo do ponto de ebulição entre 300 a 360°C (GRABOSKY E MCCORMICK, 1998), é de queima limpa, biodegradável, não tóxico e essencialmente livre de compostos sulfurados e aromáticos.

2.1.1. História

A instabilidade do preço do petróleo, esgotamento dos recursos naturais, guerras mundiais e campanhas pela preservação do meio ambiente, são alguns dos fatores que despertaram o interesse no estudo do biodiesel, incentivando as pesquisas de novas tecnologias e matérias-primas (SANTORI et al., 2012).

Estudos do processo de transesterificação de óleos vegetais começaram em 1853 pelos cientistas E. Duffy e J. Patrick, muitos anos antes do motor de ciclo diesel entrar em funcionamento. Em 1893, foi desenvolvido pelo cientista Rudolf Diesel o primeiro modelo do motor diesel que funcionou de maneira eficiente. Em 1911 Rudolf Diesel, usou óleo de amendoim para a demonstração do motor com ignição por compressão. (BIODIESEL TIMES, 2005)

Em 1922, a França começou a estudar possíveis soluções para não depender de países produtores de petróleo. Durante o transcurso da primeira guerra mundial (1939-1945) se têm inúmeros registros do uso comercial de combustíveis obtidos a partir de óleos vegetais na frota de guerra. A primeira crise do preço do petróleo ocorreu em 1973 e marcou o fim da era do combustível abundante e barato, o preço do petróleo aumentou de US\$ 3 para US\$ 12 por barril. No período de 1981-1983 houve uma nova alta no preço do petróleo, chegando a valores de US\$36/barril, o que levou ao aumento das pesquisas para as fontes de energia alternativas e renováveis. Hoje em dia, o preço do barril de petróleo ainda aumenta significativamente, em agosto de 2013 o preço do barril estava em US\$108,06 (INDEXMUNDI, 2013).

No Brasil, as primeiras pesquisas começaram em 1980, que deu como resultado a primeira patente brasileira na área, intitulada: "Processo de Produção de Combustíveis a partir de Frutos ou Sementes Oleaginosas" (PI-8007957), pelo pesquisador Expedito Parente.

O início da produção de biodiesel começou na Áustria e na França em 1988 e, desde então, se registrou a palavra “biodiesel” na literatura. Em 1990, entrou em operação a primeira indústria em escala comercial na França.

Em 1997 foi assinado o Protocolo de Kyoto e ratificado em 1999. Tratado internacional com compromissos rígidos para a redução da emissão dos gases que agravam o "efeito estufa", principalmente CO₂, SO_x e NO_x, considerados, de acordo com a maioria das investigações científicas, como causadores do aquecimento global, fato que promoveu a implantação de leis para a adição de biocombustíveis ao combustível fóssil e incentivo à produção de biodiesel a partir de fontes alternativas.

A partir deste momento, vários avanços na área dos biocombustíveis têm sido gerados. A União Europeia tem sido a maior produtora mundial com o equivalente de 60% do total da produção. Leis para os países faz com que a produção do biodiesel aumente significativamente todo ano. Portanto, pesquisas e produção do biodiesel têm aumentado dia a dia. No Brasil, desde o primeiro de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel (ANP, 2012) e pretende-se que tenha um grande aumento até 2020.

2.1.2. Matérias primas utilizadas na produção de biodiesel

As matérias primas a partir das quais o biodiesel pode ser produzido classificam-se em: óleos vegetais, gorduras animais, óleos e gorduras residuais e óleos de outras fontes, como microrganismos (microalgas, micróbios, fungos). Considera-se “gordura” a matéria graxa de origem vegetal ou animal cujo estado físico é sólido, normalmente pastoso, em condições normais de temperatura e pressão. Designa-se “óleo” a matéria graxa, de origem vegetal ou animal, cujo estado físico natural em condições normais é líquido e viscoso.

Alguns óleos alimentícios são chamados de azeites, como é o caso do azeite de oliva e o azeite de dendê (Parente, 2003). Os óleos vegetais são formados por ácidos graxos (AG), em maior percentagem por uma mistura de triacilgliceróis (TG), uma porcentagem média de diacilgliceróis (DG) e pouca percentagem de monoacilgliceróis (MG). Cada óleo vegetal possui diferente composição de ácidos graxos e, dependendo da sua composição, cada óleo pode apresentar diferentes características tanto físicas como químicas.

Na produção de biodiesel, uma característica para ter um bom desempenho como matéria prima é a quantidade de lipídios que o óleo possa conter na sua estrutura, deste vai depender a produtividade do biodiesel. Várias matérias primas têm sido pesquisadas para a produção de biodiesel, entre as quais estão: óleos vegetais (soja, girassol, colza, palma, camelina, canola, algodão, cevada, coco, arroz, entre outros), os que poderiam se classificar como óleos não comestíveis (amêndoa, andiroba, babaçu, pinhão-manso, jojoba, etc), as gorduras de animais (banha de porco, sebo, gorduras de aves e óleo de peixe) e as outras fontes (bactérias, algas, fungos, microalgas, óleo de cozinha) (SINGH E SINGH, 2010). No Brasil 80% do biodiesel é produzido a partir do óleo de soja.

Segundo o boletim anual da British Petroleum (2012), a produção mundial de óleos que são usados para a produção de biodiesel foi de 3995,6 milhões de toneladas em 2011. Como mostrado na Figura 2.1, a partir do ano de 2004 a produção de óleos vegetais tem aumentado pouco com uma queda na produção em 2009, mas atualmente já mostra uma estabilidade na produção.

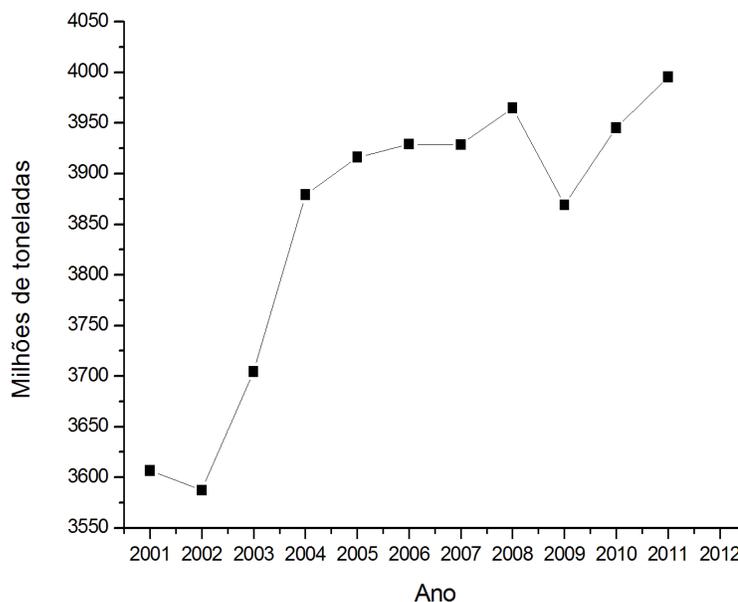


Figura 2.1. Produção mundial de óleo

Fonte: (BP, 2012)

Na Tabela 2.2 são listadas algumas das matérias primas mais utilizadas na produção de biodiesel e se detalha o conteúdo de óleo, o rendimento, a área que se precisa para produzir 1 kg de biodiesel e a produtividade de biodiesel que pode ser produzido a partir de cada matéria prima. Dentre os óleos vegetais ressalta-se o óleo de palma que tem a maior produtividade, mas as microalgas se destacam dentre as matérias primas convencionais alcançando um potencial de produção de óleo de 7 a 30 vezes superior ao das oleaginosas típicas como girassol, mamona, palma e soja; possibilidade de produção contínua, sem período de plantio e entressafra; e, por fim, taxa de sequestro de carbono muito superior a dos vegetais (PETROBRAS, 2013). Na atualidade, a microalga tem-se convertido na matéria prima mais promissora pelas suas vantagens comparadas com os óleos vegetais, mas o processo ainda não é economicamente viável.

Dependendo da matéria-prima utilizada, o biodiesel pode apresentar maior ou menor número de ácidos graxos insaturados (KNOTHE E STEIDLEY, 2005). Os óleos utilizados para tal finalidade são selecionados a partir de vários fatores, tendo em conta a viabilidade, competitividade técnico-econômica e socioambiental, citando alguns fatores, encontram-se:

- Preço da produção, colheita e extração do óleo.
- Desempenho como combustível.
- Propriedades de armazenamento.
- Produtividade por unidade de área.
- O teor de ácidos graxos livres (AGL), umidade, impurezas, cor, odor, viscosidade e número de iodo, dentre outros.
- Tecnologias.
- Quantidade de glicerina.
- Incentivos agrícolas.
- Coprodutos.
- Facilidade de manipulação.

Tabela 2.2. Comparação de matérias primas para produção de biodiesel

Matéria Prima	Conteúdo de óleo (%óleo por peso de biomassa)	Rendimento do óleo (L óleo/ha ano)	Área de terra (m ² ano/kg biodiesel)	Produtividade do Biodiesel (kg biodiesel/ha ano)
Milho	44	172	66	152
Cânhamo	33	363	31	321
Soja	18	636	18	562
Jatropha	28	741	15	656
Camelina	42	915	12	809
Canola	41	974	12	862
Girassol	40	1070	11	946
Castor	48	1307	9	1156
Palma	36	5366	2	4747
Microalga (baixo conteúdo de óleo)	30	58.700	0,2	51.927
Microalga (conteúdo médio de óleo)	50	97.800	0,1	86.515
Microalga (conteúdo alto de óleo)	70	136.900	0,1	121.104

Fonte: (MATA, MARTINS E CAETANO, 2010)

A Tabela 2.3 foi adaptada de (LEUNG, WU E LEUNG, 2010) e nela são listadas algumas propriedades físico-químicas que influenciam na produção de biodiesel, sendo elas: densidade, ponto de fulgor, viscosidade, acidez e calor de combustão para cada espécie.

Dentre as propriedades que mais afetam o desempenho do combustível estão as propriedades fluidodinâmicas, tais propriedades exercem grande influência na circulação e injeção do combustível. A viscosidade afeta a atomização do combustível no momento de sua injeção na câmara de combustão e, em última análise, a formação de depósitos no motor. A alta viscosidade ocasiona heterogeneidade na combustão do biodiesel devido à diminuição da eficiência de atomização na câmara de combustão, ocasionando a deposição de resíduos nas

partes internas do motor. Quanto maior a viscosidade, maior a tendência do biodiesel em causar tais problemas (DE ALMEIDA et al., 2011).

Outra propriedade importante é a densidade que está diretamente ligada com a estrutura das moléculas. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do alquiléster, maior será a densidade. O valor da densidade diminui quanto maior for o número de insaturações presentes na molécula.

Tabela 2.3. Propriedades físico-químicas das matérias primas para a produção de biodiesel.

Classificação do óleo	Espécie	Densidade	Ponto de fulgor	Viscosidade cinemática	Acidez	Calor de combustão
		g/cm ³	°C	Cst, 40 °C	mg KOH/g	MJ/kg
Óleo comestível	Soja	0,91	254	32,9	0,2	39,6
	Colza	0,91	246	35,1	2,92	39,7
	Girassol	0,92	274	32,6	-	39,6
	Palma	0,92	267	39,6 ¹	0,1	-
	Amendoim	0,90	271	22,72	3	39,8
	Milho	0,91	277	34,9 ²	-	39,5
	Camelina	0,91	-	-	0,76	42,2
	Canola	-	-	38,2	0,4	-
	Algodão	0,91	234	18,2	-	39,5
	Abobora	0,92	>230	35,6	0,55	39
Não comestível	Pinhão manso	0,92	225	29,4	28	38,5
	Fava Indiana	0,91	205	27,8	5,06	34
	Óleo de cozinha	0,90	-	44,7	2,5	-

¹ Viscosidade cinemática a 38 °C, mm²/s.

² Viscosidade cinemática a 37 °C, mm²/s.

Fonte: (LEUNG, WU E LEUNG, 2010)

A estabilidade à oxidação afeta a qualidade do biodiesel, principalmente quando se tem armazenamentos em longos períodos. Estudos mostram que a viscosidade, índice de acidez e densidade aumentam em amostras estocadas por 2 anos enquanto que o calor de combustão

diminui. A experiência prática demonstra que a corrosividade do biodiesel neutro é zero, e que, com acidez elevada o biodiesel apresenta-se como corrosivo, existindo uma correlação entre o número de acidez e a corrosividade. Por tanto, a acidez também é outra propriedade que deve-se manter num número mínimo, para evitar estes problemas.

O ponto de fulgor também é uma propriedade importante. Quanto mais alto o ponto, menor é a possibilidade de produzir vapores de ar/combustível, o que é bom para sua manipulação.

2.1.3. Produção de Biodiesel

Em alguns países, as diferentes leis e incentivos para o consumo de biodiesel têm provocado um crescimento acelerado na sua produção nos últimos anos (REN21, 2013). Segundo a FAPRI (2010), a produção mundial de biodiesel no ano de 2009 foi de 4390 milhões de galões, já em 2010 a produção aumentou em 873 milhões de galões. Este aumento pode ser observado na Figura 2.2. O preço do biodiesel vem aumentando por causa do preço elevado do petróleo e dos óleos vegetais. Em 2010, o preço do biodiesel aumentou chegando até US\$4,14 por galão.

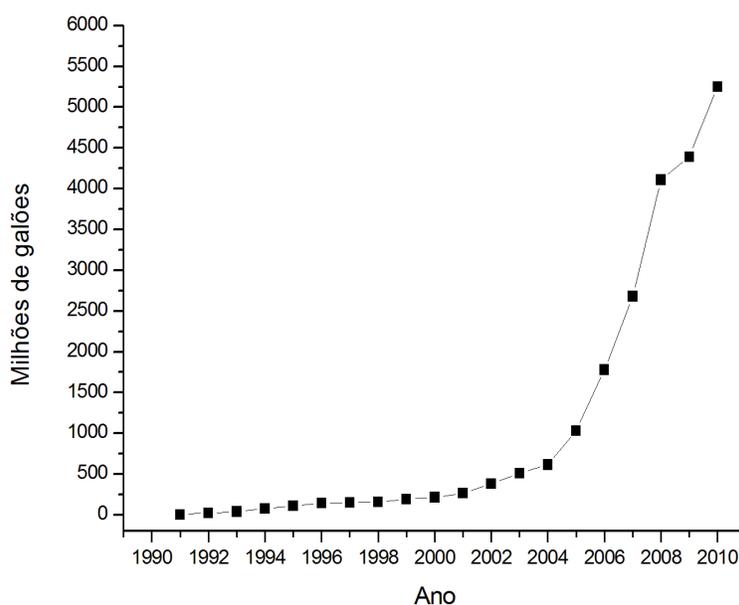


Figura 2.2. Produção mundial de biodiesel

Fonte: (FAPRI, 2010)

No Brasil, segundo a ANP (2013), 45% da energia e 19% dos combustíveis consumidos no País são renováveis, reportado no boletim mensal de Fevereiro. A produção de biodiesel no ano de 2009 foi de 406 milhões de galões e o consumo foi de 396 milhões restando quase nada para o estoque no País. Já em 2010, teve-se uma produção anual de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada, no mesmo ano, de cerca de 5,8 bilhões de litros. Segundo o boletim de setembro de 2013 da ANP, atualmente existem 70 plantas produtoras de biodiesel autorizadas para operação no País, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 23.046,06 m³/dia. Destas 70 plantas, 66 possuem Autorização para Comercialização do biodiesel produzido, correspondendo a 21.542,04 m³/dia de capacidade autorizada para comercialização.

A experiência de utilização do biodiesel no mercado de combustíveis vem sendo realizada em quatro níveis de concentração:

- Puro (B100)
- Misturas (B20 – B30)
- Aditivo (B5)
- Aditivo de lubricidade (B2)

Para diminuir os problemas que os TG trazem em comparação com os combustíveis fósseis como alta viscosidade, baixa estabilidade, oxidação e baixa volatilidade, propriedades que influenciam para uma combustão incompleta, existem quatro vias principais que são detalhadas a seguir (YUSUF, KAMARUDIN E YAAKUB, 2011; ABBASZAADEH et al., 2012).

2.1.3.1. Pirólise

O craqueamento térmico ou pirólise é a conversão de uma substância em outra por meio do uso de calor, isto é, pelo aquecimento da substância, na ausência de ar ou oxigênio, a temperaturas superiores a 450°C. Em algumas situações, esse processo é auxiliado por um catalisador para a quebra das ligações químicas, de modo a gerar moléculas menores. A remoção do oxigênio do processo reduz os benefícios de ser um

combustível oxigenado, diminuindo suas vantagens ambientais e geralmente produzindo um combustível mais próximo da gasolina que do diesel.

2.1.3.2. Uso direto e misturas

O uso direto de óleos vegetais e misturas de óleo/combustíveis fósseis é reportado em vários ensaios na literatura, que mostram que misturas deste tipo podem ser empregadas nos motores proporcionando bom desempenho a curto prazo. No entanto, esta via pode não ser satisfatória e pouco prática, já que a alta viscosidade da mistura, a composição dos ácidos graxos livres (alta acidez), a formação de goma devido à oxidação, polimerização durante o armazenamento e/ou combustão, depósitos de carbono e o espessamento do óleo de lubrificação, são vários dos problemas que podem acontecer por causa do seu uso. Por causa destes inconvenientes, o uso direto de óleos vegetais e/ou o emprego de misturas de óleos vegetais/combustíveis fósseis geralmente são considerados não satisfatórias para o uso em motores.

2.1.3.3. Microemulsões

As microemulsões são dispersões termodinamicamente estáveis formadas por duas fases líquidas, nas quais, uma geralmente consiste de uma solução aquosa contendo uma mistura de surfactantes e eletrólitos, e a outra, uma fase orgânica. Macroscopicamente, uma microemulsão se apresenta com aspecto homogêneo, transparente e isotrópico. São formadas pela combinação de três componentes: fase aquosa, fase oleosa, surfactante (tensoativo) e, quando é necessário, um co-surfactante (co-tensoativo) (FERREIRA, 2006).

A microemulsão pode ser feita a partir de óleos vegetais com um éster e um dispersante (co-solvente), ou de um óleo vegetal, um álcool e um surfactante, com ou sem combustível diesel. Devido a seu conteúdo de álcool, as microemulsões têm valores de calor volumétrico mais baixos, comparados com o combustíveis fósseis, mas esses alcoóis tem altos valores de calor latente de vaporização que tendem a resfriar a câmara de combustão, diminuindo o coque no bico do injetor.

2.1.3.4. Transesterificação

A transesterificação é o método mais usado para se reduzir à alta viscosidade dos óleos vegetais, gorduras animais e óleos provenientes de outras fontes. Por meio desta via, se tem muitas vantagens em comparação com as anteriormente mencionadas.

Na reação de transesterificação, os triacilgliceróis provenientes dos óleos vegetais, gorduras animais e/ou outras fontes, reagem com um álcool para formar uma mistura de ésteres de ácidos graxos e o glicerol. A reação de transesterificação ocorre por etapas, com formação intermediária de DG e MG, tendo como resultado a produção de 3 moles de ésteres (E) e 1 mol de glicerol (GL); as etapas são mostradas na Equação 2.1 a Equação 2.3. A reação geral é mostrada na Figura 2.3. Para que a reação ocorra, emprega-se um excesso de álcool por dois motivos: a reação não é eficiente e, também, para deslocar o equilíbrio da reação (RIOS, 2010).

A reação de transesterificação acontece, normalmente, a uma temperatura próxima ao ponto de ebulição do álcool e sob uma pressão ligeiramente maior que a atmosférica, para garantir que a reação ocorrerá em estado líquido, geralmente em presença de um catalisador que pode ser ácido, básico, ou uma enzima.

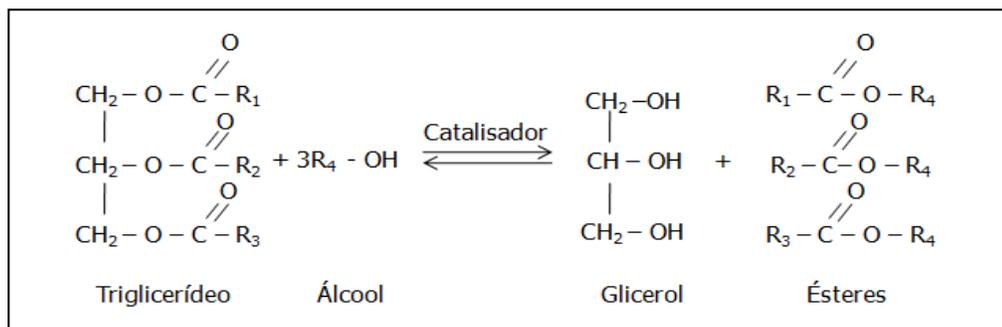


Figura 2. 3. Reação geral de transesterificação



Na Tabela 2.4, são descritos os diferentes tipos de catalisadores, suas vantagens e desvantagens na produção de biodiesel. Quanto ao álcool, os mais usados para a reação de transesterificação são o etanol e o metanol. O etanol, atualmente, é mais viável e menos contaminante, mas o metanol é muito mais econômico, no entanto, dependendo da catálise e da matéria prima usada, podem ser usados diferentes alcoóis, dentre eles, álcool isoamílico (BRANDÃO, 2011), propanol, butanol (MA e HANNA, 1999), entre outros. Existem processos como a transesterificação supercrítica que não precisa de catalisador, pois este processo é feito em presença de álcool (geralmente metanol) e sob altas temperaturas e altas pressões, sendo estas as condições do ponto crítico.

Além das vantagens e desvantagens mencionadas anteriormente, também podem ser citadas diferenças nos tempos de reação; por exemplo, ao se usar uma catálise ácida para conseguir 99% de produção de biodiesel, são requeridas 4 horas de reação, já, usando uma catálise básica para obter o mesmo rendimento, são necessárias 2 horas de reação e, fazendo a transesterificação por meio de uma enzima, o máximo rendimento que pode se conseguir é de 95% e seriam necessárias 105 horas de reação (GUI, LEE E BHATIA, 2008).

Para completar o processo de produção de biodiesel, várias etapas consecutivas precisam ser feitas para obter um biodiesel de alta qualidade. Depois da reação de transesterificação, etapas como lavagem, secagem e controle de acidez são necessárias para obter um biodiesel que cumpra as normativas nacionais e internacionais. Em nível internacional, as propriedades físico-químicas do biodiesel estão regidas pelas normas (ASTM D6751-11, 2010) e (EN 12214, 2003). A seguir, se especificam as normativas que são regidas mundialmente e no Brasil. No Brasil as normativas, são regidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

2.1.1. Normativas para a produção de biodiesel

O marco legal que regula as atividades do setor de produção de biocombustíveis vem se adequando nas últimas décadas. Brasil foi o primeiro país que iniciou as atividades neste enfoque e precisou criar as condições para promover a produção, primeiramente do uso do etanol e, posteriormente, do biodiesel. A LEI Nº 11.097 de 13.01.2005 outorgou competência à ANP para regular e fiscalizar a indústria do biodiesel no País.

Tabela 2. 4. Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de catálise usadas na produção de biodiesel.

Tipo	Catalisadores	Vantagens	Desvantagens
Básico			
Homogêneo	NaOH, KOH	Alta atividade catalítica, baixo custo, cinética favorável, condições brandas de operação.	Requerimento de acidez baixa, condições anidras, possível saponificação, formação de emulsões, maior quantidade de lavagens para purificação, descartável.
Heterogêneo	CaO, CaTiO ₃ , CaZrO ₃ , CaO-CeO ₂ , CaMnO ₃ , Ca ₂ Fe ₂ O ₅ , KOH/Al ₂ O ₃ /KI, ETS ¹⁰ zeolite, alumina/sílica suportado em K ₂ CO ₃	Não corrosivo, ambientalmente amigável, reciclável, menos problemas de descarte, fácil separação, alta seletividade, longa vida.	Requerimento de acidez baixa, altas relações molares de óleo: álcool, altas temperaturas e pressões de reação, limitações de difusão, alto custo.
Ácido			
Homogêneo	Ácido sulfúrico concentrado	Catálise simultânea de esterificação e transesterificação, evita formação de sabão.	Necessidade de equipamentos com material anticorrosivo, dificuldade de reciclo, altas temperaturas de reação, longos tempos de reação, baixa atividade catalítica.
Heterogêneo	ZnO/I ₂ , ZrO ₂ /SO ²⁻ ₄ , TiO ₂ /SO ²⁻ ₄ , catalisador ácido de carbono com base solida, catalisador derivados de carbo-hidratos, fosfato de vanádio, ácido níobico, sulfato de zircônio, Amberlyst-15, Nafion-NR50	Catálise simultânea de esterificação e transesterificação, reciclável, ambientalmente amigável.	Baixa concentração local de acidez, baixa micro porosidade, limitações de difusão, alto custo.
Enzimas	Cándida antártica fração B lipase, Rhizomucor mieher lipase.	Evita formação de sabão, não poluente, fácil purificação.	Alto custo, desnaturação

Fonte: (LEUNG, WU E LEUNG, 2010)

As especificações do B100, a ser misturado com o diesel mineral, são estabelecidas no Brasil pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), através da

Resolução nº 07 de 2008 (RANP 07/08) que substituiu a Resolução nº 42 de 2004, tornando os critérios de avaliação da qualidade do biodiesel brasileiro mais restritivos.

Os padrões de qualidades presentes nesta resolução foram constituídos com base nas normas ASTM D6751 e EN 14214. Para que o biodiesel seja comercializado, tem que estar dentro dos padrões internacionais. A Tabela 2.5 mostra uma lista dos limites dos valores das propriedades para ter um biodiesel de qualidade.

As características do biodiesel comercial dependem das práticas empregadas no refino e da natureza dos lipídios, óleos ou gorduras. Várias propriedades são importantes para definir a qualidade do biodiesel; citaremos algumas das mais importantes e a sua definição, dentre elas se encontram:

- Ponto de fulgor: limita o nível do álcool em excesso, que fica no biodiesel.
- Viscosidade: um valor baixo desta pode ser vantajoso para conseguir uma maior potência da bomba de injeção. Esta propriedade é afetada pela presença de acilgliceróis parciais e glicerol no biodiesel (glicerina livre e glicerina total).
- Cinzas sulfatadas: uma quantidade alta pode afetar os injetores, filtros e bomba de injeção, também gerar desgaste nos pistões e anéis do motor. Decorrente do resíduo de catalisador no biodiesel.
- Enxofre: O efeito de altas concentrações de enxofre pode contribuir no desgaste do motor e é um dos maiores poluentes ambientais.
- Índice de cetano: é uma medida da qualidade de ignição do combustível e do processo de combustão.
- Ponto de névoa: define a temperatura à qual aparece a névoa no combustível.

Estas propriedades precisam ser medidas e não podem superar os limites para ter um bom desempenho do biocombustível. Outra característica que se deve ter em conta é o armazenamento do biodiesel. Alguns estudos mostram que o biodiesel pode degradar muito mais rápido do que o diesel, além de poder aumentar muito rápido os valores de acidez, viscosidade e pode formar sedimentos (BÜCKER et al., 2011); esta característica pode ser melhorada com uso de aditivos para melhorar a estabilidade do produto final.

Tabela 2. 5. Especificações das normas ANP 07/2008, ASTM D6751 e EN14214

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	Brasil ANP 07/2008	UE EN 14214	EUA ASTM D6751
Aspecto	---	Límpido e isento de impurezas	---	---
Massa específica *	kg/m ³	850-900 a 20 °C	860-900 a 15 °C	---
Viscosidade cinemática a 40 °C *	mm ² /s	3,0-6,0	3,5-5,0	1,9-6,0
Água e sedimentos, máx. *	% volume	---	---	0,05
Ponto de fulgor, mín. *	°C	100	120	130
Destilação; 90% vol. recuperados, máx. *	°C	---	---	360
Resíduo de carbono dos, máx. *	% massa	Em 100% da amostra 0,050	10% residual da destilação 0,3	Em 100% da amostra 0,05
Cinzas sulfatadas, máx. *	% massa	0,020	0,02	---
Enxofre total, máx. *	mg/kg	50	10	15
Corrosividade ao cobre, 3 h a 50 °C, máx. *	-	1	1	3
Número de cetanos *	-	Anotar	51 (mín.)	47 (mín.)
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx. *	°C	19	Por região	---
Ponto de fluidez *	°C	---	Por região	---
Ponto de nuvem *	°C	---	---	Registrar
Sódio + Potássio, máx	mg/kg	5	5	---
Cálcio + Magnésio, máx	mg/kg	5	5	---
Fósforo, máx	mg/kg	10	10	10
Contaminação total, máx	mg/kg	24	24	---
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,5	0,5	0,5
Glicerina livre, máx.	% massa	0,02	0,02	0,02
Glicerina total, máx.	% massa	0,25	0,25	0,24
Monoglicerídeos	% massa	Anotar	0,8 (máx)	---

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	Brasil	UE	EUA
		ANP 07/2008	EN 14214	ASTM D6751
Diglicerídeos	% massa	Anotar	0,2 (máx)	---
Triglicerídeos	% massa	Anotar	0,2 (máx)	---
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	0,20	---
Índice de iodo	g I ₂ /100 g	Anotar	120 (máx)	---
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín	h	6	6	---
Água, máx	mg/kg	500	500	500
Ácido linolênico	% massa	---	12 max	---
Metil ésteres com mais que 4 insaturações	%mass	---	1 max	---

*Parâmetros típicos da normatização do diesel mineral

Fonte: (LÔBO E FERREIRA, 2009).

2.2 MICROALGAS

Segundo Li et al. (2008), as microalgas são micro-organismos fotossintéticos procariontes ou eucariontes, que têm alto crescimento e altas taxas fotossintéticas devido a sua estrutura simples. O site da *algaebase* (GUIRY E GUIRY, 2013) tem 131.898 espécies e nomes de algas na base de dados.

Cinco grupos são os que mais se destacam nas microalgas, estes são:

1. *Cyanophyta*, ou *Cianobactérias*;
2. *Chlorophyta*;
3. *Euglenophyta*;
4. *Chromophyta*;
5. *Rhodophyta*.

As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas existentes na terra. São encontradas no ambiente marinho, em água doce e no solo, sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção de matéria orgânica da biosfera. O número de espécies destes

organismos não é conhecido exatamente, no entanto, são encontradas citações que relatam a existência de 50.000 espécies (UTEX, 2013), mas perto de 30.000 espécies têm sido estudadas e analisadas (RICHMOND, 2004). Atualmente, encontram-se mais de 200 mil espécies, no entanto, nem todas foram nomeadas (GUIRY, 2012). A diversidade das espécies de microalgas reflete-se também em sua composição bioquímica, sendo então uma fonte ilimitada de bioprodutos: alimento humano, alimento para peixes, fertilizantes, betacarotenos, tocoferóis e antioxidantes, dentre outros (NORTON, MELKONIAN E ANDERSEN, 1996; PULZ E GROSS, 2004).

Segundo Tomaselli (2004), as microalgas são classificadas a partir de alguns critérios, como a natureza química dos produtos de reserva, diferentes tipos de pigmentos e segundo os constituintes da parede celular, bem como aspectos como critérios citológicos e morfológicos.

Apesar das microalgas serem frequentemente consideradas fotoautotróficas, requerendo luz para seu crescimento, um número considerável de microalgas é capaz de crescer heterotróficamente com um ou mais substratos orgânicos como fonte de energia. Para este tipo de microalga, tecnologias de fermentação podem ser adotadas e modificadas para uma produção em grande escala de bioprodutos (WEN E CHEN, 2003).

A absorção da radiação eletromagnética pelos organismos fotossintetizantes só é feita no comprimento de onda entre 400 e 720 nm, isto é, no espectro visível, e é realizada pelos pigmentos fotossintéticos. No caso das microalgas, os pigmentos são classificados em grupos, como as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas, diferenciando-se quanto à capacidade de absorção luminosa e composição química (FRANCISCO, 2010).

O estudo de microrganismos, microalgas, fungos e bactérias vem intensificando sua importância para utilização em diversas áreas (SPOLAOREA et al., 2006). As microalgas são os únicos microrganismos que são capazes de converter luz solar, água e CO₂ em biomassa contendo alto conteúdo de lipídios, os quais são usados para a produção de biodiesel (LI et al., 2011). Além do seu potencial para o uso em produção de biocombustíveis e fixação de CO₂, também há a possibilidade de obtenção de produtos químicos, alimentos e aplicação no tratamento de águas residuais (BENEMANN et al., 2003).

As microalgas possuem características físico-químicas similares aos óleos vegetais, e poderiam se converter na matéria prima mais eficiente para a produção de biodiesel (GOUVEIA

E OLIVEIRA, 2009), já que tem várias vantagens em relação aos óleos vegetais com maior quantidade de lipídios, como é o caso do óleo de palma. Caso a produção de microalgas possa ser escalonada industrialmente, menos de 6 milhões de hectares no mundo seriam necessários para responder à atual demanda de combustíveis, um montante inferior a 0,4% das terras aráveis, o que seria uma meta representativa para a agricultura global (SHEEHAN et al., 1998).

2.2.1. Espécies de microalgas

Muitas espécies de microalgas podem ser induzidas para acumular quantidades substanciais de lipídios. A média da percentagem de lipídeos varia entre 1 e 70%, mas têm-se encontrado espécies de microalgas com conteúdos de até 75% em massa, como é o caso da *Botryococcus braunii* (VELICHKOVA E GEORGIEV, 2012). A Tabela 2.6 mostra a quantidade e produtividade de lipídios e a produtividade de biomassa por área de diferentes espécies de microalgas.

Tabela 2. 6. Conteúdo de lipídios e produtividades de diferentes espécies de microalgas,

Espécies de algas	Conteúdo lipídios (% massa biomassa seca)	Produtividade de lipídios (mg/L/dia)	Produtividade volumétrica de biomassa (g/L/dia)	Produtividade de biomassa por área (g/m ² /dia)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	24,0-31,0	-	-	11,5-17,4
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0-75,0	-	0,02	3,0
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8	0,07	-
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6-16,4/39,8	17,6	0,04	-
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0-63,0	10,3-50,0	0,036-0,041	0,91-0,97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6-57,8	1214	2,00-7,70	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0-22,0	44,7	0,23-1,47	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0-58,0	11,2-40,0	0,02-0,20	0,57-0,95
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,0	-	2,90-3,64	72,5/130
<i>Chlorella</i>	18,0-57,0	18,7	-	3,50-13,90
<i>Chlorococcum</i> sp	19,3	53,7	0,28	-
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20,0-51,1	-	10,0	-
<i>Desmodemus</i> sp.	19,6-21,1	40,8-53,9	0,03-0,26	2,43-13,52
<i>Dunaliella salina</i>	6,0-25,0	116,0	0,22-0,34	1,6-3,5/20-38
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	-	0,09	14,0
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7-71,0	-	0,12	-

Espécies de algas	Conteúdo lipídios (% massa biomassa seca)	Produtividade de lipídios (mg/L/dia)	Produtividade volumétrica de biomassa (g/L/dia)	Produtividade de biomassa por área (g/m ² /dia)
<i>Dunaliella</i> sp	17,5-67,0	33,5	-	-
<i>Ellipsoidion</i> sp	27,4	47,3	0,17	-
<i>Euglena gracilis</i>	14,0-20,0	-	7,70	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25,0	-	0,05-0,06	10,2-36,4
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0-40,0	-	0,32-1,60	-
<i>Isochrysis</i> sp	7,1-33,0	37,8	0,08-0,17	-
<i>Monodus subterraneus</i>	16,0	30,4	0,19	-
<i>Monallanthus salina</i>	20,0-22,0	-	0,08	12,0
<i>Nannochloris</i> sp	20,0-56,0	60,9-76,5	0,17-0,51	-
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7-29,7	84,0-142,0	0,37-0,48	-
<i>Nannochloropsis</i> sp	12,0-53,0	37,6-90,0	0,17-1,43	1,9-5,3
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0-65,0	90,0-134,0	-	-
<i>Nitzschia</i> sp	16,0-47,0	-	-	8,8-21,6
<i>Oocystis pusilla</i>	10,5	-	-	40,6-45,8
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	40,2	0,14	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0-57,0	44,8	0,003-1,9	2,4-21
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0-18,8/60,7	34,8	0,36-1,50	25,0
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0-55,0	-	0,004-0,74	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9-18,4	35,1	0,19	-
<i>Scenedesmus</i> sp	19,6-21,1	40,8-53,9	0,03-0,26	2,43-13,52
<i>Skelotenema</i> sp	13,3-31,8	27,3	0,09	-
<i>Skelotenema costatum</i>	13,5-51,3	17,4	0,08	-
<i>Spirulina platensis</i>	4,0-16,6	-	0,06-4,3	1,5-14,5/24-51
<i>Spirulina maxima</i>	4,0-9,0	-	0,21-0,25	25,0
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20,6	17,4	0,08	-
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,5-23,0	27,0-36,4	0,12-0,32	19,0
<i>Tetraselmis</i> sp	12,6-14,7	43,4	0,30	-

Fonte: Adaptado de (MATA, MARTINS E CAETANO, 2010)

As microalgas mais comuns (*Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) conseguem níveis de óleo entre 20 e 50% e podem alcançar altas produtividades.

A seleção da microalga mais adequada para se trabalhar depende de vários fatores, como por exemplo, a habilidade da microalga em assimilar os principais nutrientes usados, as

especificações para seu crescimento, a composição de ácidos graxos, carboidratos, proteínas, entre outros. Também vai depender do uso da biomassa, já que vários biocombustíveis podem ser gerados a partir desta.

A microalga *Desmodesmus* sp. pertence ao grupo Chlorophyta. É uma alga eucariótica, verde, de forma elipsoidal a ovóides, se distribui em unicelular ou em cenóbio de 2-4-8-16 células. A *Desmodesmus* sp. pode acumular até 21% de lipídios na sua célula, mas estudos recentes com algas do mesmo gênero *Desmodesmus* têm conseguido maiores porcentagens de lipídios, com deficiência de nutrientes no meio de cultivo (PAN et al., 2011) (SAMORI et al., 2013). Esta deficiência de nutrientes tem sido estudada em várias espécies de microalgas, aumentando a porcentagem de lipídios (ADAMS et al., 2013) e com diferentes tipos de nutrientes, entre eles nitrogênio e fósforo (RUIZ-MARIN, MENDOZA-ESPINOSA E STEPHENSON, 2010). Uma das vantagens deste gênero é sua alta produtividade, já que alcançam o seu maior crescimento em até 14 dias. Comparando com as microalgas oleaginosas como, por exemplo, a *Botryococcus braunii*, que demoram até 38 dias para atingir seu maior crescimento, o tempo chega a ser 2,5 vezes menor.

A escolha do meio de cultivo, sistema (aberto ou fechado), crescimento (autotrófico, mixotrófico ou heterotrófico) ou processo (contínuo, semicontínuo, batelada) depende exclusivamente da espécie de microalga.

2.2.2. Sistema para o cultivo

As microalgas podem viver e crescer em uma ampla faixa de condições do meio do cultivo, incluindo escassez de nutrientes e outras condições adversas, como contaminação. O cultivo de microalgas pode ser realizado em diversos sistemas, variando-se o seu volume. O sistema de cultivo por empresas não possui muita sofisticação, sendo em alguns casos em tanques abertos sem total controle de parâmetros ambientais, ocasionando problemas de produção. Esses aspectos levaram a um aumento nos estudos de biotecnologia das microalgas, resultando no recente uso de fotobiorreatores, que são sistemas onde se controlam os parâmetros ambientais, viabilizando a produção industrial de produtos de alto valor comercial (RODOLFI et al., 2009).

Várias vantagens do cultivo de microalgas podem ser aproveitadas, para levar a produção em larga escala. Os cultivos podem ter água marinha, de estuários, provenientes de diversos processos de produção, como agropecuária, industrial e dejetos domésticos. A indução da síntese e acúmulo de altas concentrações de compostos que apresentam um elevado valor comercial, como carboidratos, proteínas, lipídios, entre outras substâncias, pode ser visualizada através da manipulação das condições ambientais de cultivo, como por exemplo, a temperatura, luz, pH e nutrientes. Tais cultivos são considerados sistemas biológicos eficientes na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica, obtendo maior produtividade de biomassa comparando-se com espécies terrestres.

A maioria das microalgas possui ciclo de vida completo em poucas horas, fator que favorece a seleção de cepas e o melhoramento genético. O fato de serem unicelulares assegura à biomassa uma homogeneidade na composição bioquímica, ao contrário de plantas terrestres, onde compostos de interesse se localizam em partes específicas como folhas, sementes, raízes e frutos (COHEN, 1986).

As microalgas têm necessidade de uma série de nutrientes, os quais são divididos em macronutrientes e micronutrientes. Como macronutrientes têm-se carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e fósforo, que são considerados como essenciais e, também cálcio, magnésio, enxofre e potássio. No caso dos micronutrientes, têm-se ferro, manganês, cobre, molibdênio e cobalto; algumas espécies também necessitam de baixas concentrações de vitaminas (GUILLARD, 1975).

O carbono constitui em torno de 50% da biomassa da microalga e, em cultivos, pode ser considerado como o macronutriente mais importante, podendo ser o componente limitante no cultivo (ABALDE, FIDALGO E TORRES, 1995). A fonte de carbono mais utilizada para o crescimento de microalgas é o dióxido de carbono (CO₂), provavelmente por ter uma difusão rápida para o interior das células, sendo usado diretamente em processos de fixação (RAVEN, 1988).

As microalgas podem ter vários tipos de metabolismos, autotróficas, heterotróficas ou mixotróficas. O metabolismo é um fator importante para determinar o sistema de cultivo:

- Autotróficamente: usa a luz como a única fonte de energia para a fixação de CO₂ pela oxidação de substratos; a energia é convertida em energia química por meio de reações de fotossíntese.
- Heterotróficamente: usam só componentes orgânicos como fonte de energia, como o carbono que é usado como fonte de energia e para a construção de biomassa.
- Mixotróficamente: Utiliza tanto de uma fonte de energia quanto a fonte de carbono.

Dentre esses, o cultivo mixotrófico pode se apresentar como o processo mais eficiente para a produção de biomassa, já que o uso simultâneo do dióxido de carbono e do carbono orgânico implica em uma economia na energia gasta para a síntese de todo o aparato fotossintético e para a fixação de carbono (LEE, 2004) (WANG et al., 2012). Para uma escolha correta do meio de cultivo a ser utilizado, é necessário levar em consideração o tipo de cepa utilizada e o produto desejado, como biomassa, lipídios, carboidratos, proteína e/ou pigmentos, entre outros (JIANG, 1999; ARAVANTINO, THEODORAKOPOULOS E MANARIOTIS, 2013).

2.2.3. Sistemas para produção de biomassa de microalgas

Vários sistemas podem ser usados para a produção de biomassa de microalgas, Mas no geral, podem ser usados para o crescimento, sistemas abertos ou sistemas fechados, podendo ser dos mais variados desenhos e operados de diferentes maneiras.

2.2.3.1. Sistemas abertos

Estes sistemas são os mais utilizados em escala industrial, pois são mais baratos, sua construção é simples e são de fácil operação. Existem desde corpos de água naturais, como lagos e lagoas e lagos artificiais como os circulares, os inclinados, os de sem mistura e os tipo *raceway*. Os mais usados são os de tipo *raceway*, os quais são canais de recirculação de ciclo fechado, normalmente ovais ou sinuosas. Nestes sistemas, a agitação é feita por uma roda de pás ou por aeração, formando um sistema homogêneo. O inóculo e meio de cultivo fresco são agregados continuamente. Vários inconvenientes são encontrados neste sistema de cultivo, como

evaporação da água, contaminação e baixas produtividades de biomassa. Mas dentre as vantagens, estão o uso da luz solar e um consumo de energia relativamente baixo.

2.2.3.2. Sistemas fechados

Estes sistemas são, geralmente, chamados de fotobiorreatores (FBRs) e foram desenvolvidos depois de experimentar os problemas dos sistemas abertos. Um fotobiorreator é um reator para o crescimento foto autotrófico de micro-organismos, são sistemas isolados do meio externo e recipientes transparentes. Vários *designs* de FBRs se encontram na literatura, mas os mais comuns são os tubulares, de placas paralelas e de coluna. Estes podem ser construídos, geralmente, em vidro ou plástico, com o qual se permite passar a luz solar e são orientados de maneira a aproveitar a luz o máximo possível. Têm-se várias vantagens no uso destes sistemas para a produção de biomassa: baixa contaminação, uma alta produtividade por unidade de área e facilidade de controle de vários parâmetros, como pH, injeção de CO₂, temperatura e intensidade de luz. Geralmente, os FBRs usam luz artificial para seu crescimento, isto gera altos custos na produção. A construção também é bem mais cara quando comparada com os sistemas abertos, sendo esta uma de suas desvantagens, apresentam elevados custos de construção e operação.

Na Tabela 2.7, é mostrada uma comparação das vantagens e desvantagens dos sistemas abertos e fechados. Geralmente os sistemas abertos são mais econômicos em sua construção, mas os FBRs têm muito mais vantagens, já que conseguem controlar as variáveis e manter o sistema estável.

2.2.4. Produção de biocombustíveis a partir de biomassa de microalgas

Diversos produtos podem ser obtidos a partir da biomassa de microalgas, e vários destes podem ser usados para produção de biocombustíveis. Na Figura 2.4, podem ser observados os diversos biocombustíveis e produtos que podem ser produzidos a partir da biomassa da microalga, isto que faz com que as microalgas sejam tão pesquisadas atualmente. Se houver integração de alguns processos, é possível tornar a produção de biocombustíveis um processo economicamente viável.

Tabela 2. 7. Comparação dos sistemas abertos e fechados

Sistema de cultivo	Sistemas abertos	Sistemas fechados (FBRs)
Controle das condições de cultivo (pH, T, CO ₂ dissolvido)	Médio	Fácil
Risco de contaminação	Alto	Baixo
Evaporação da água	Alto	Baixo
Produtividade por m ²	Media	Alta
Injeção de energia	Baixa	Alta
Custos de construção	Baixo	Alto

Fonte: (LEITE, ABDELAZIZ E HALLENBECK, 2013)

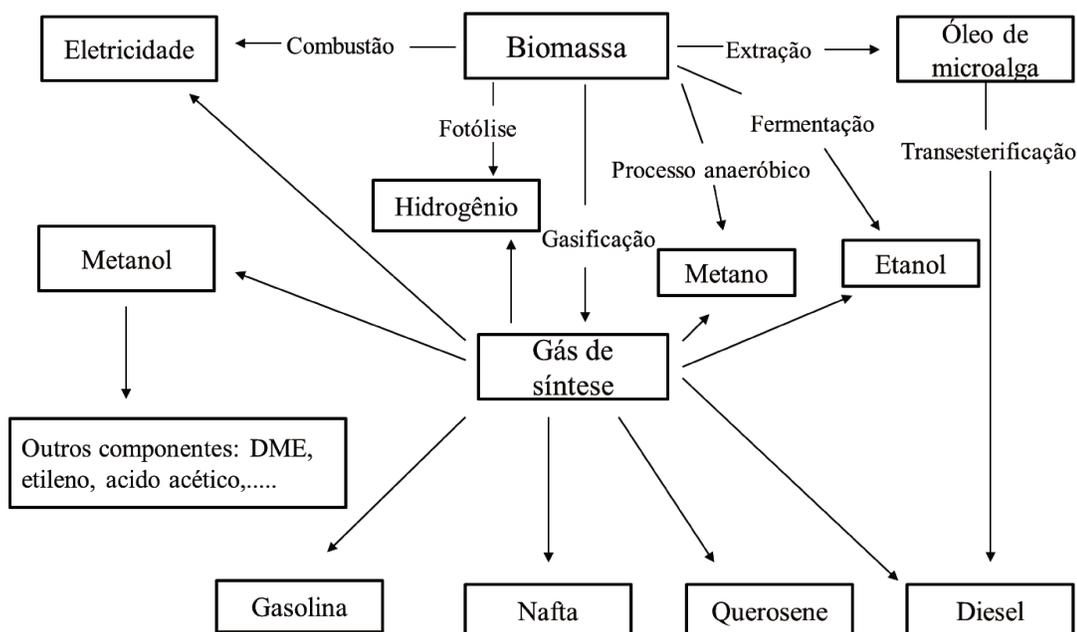


Figura 2. 4. Diversos produtos energéticos a partir da biomassa da microalga

Fonte: Adaptado (TABERNERO, MARTÍN DEL VALLE E GALÁN, 2012)

O foco deste trabalho é a utilização dos lipídios da biomassa para a produção de biodiesel.

2.2.4.1. Produção de biodiesel a partir do óleo extraído da biomassa das microalgas

Uns dos primeiros trabalhos de cultivo de algas e aproveitamento da biomassa para a produção de biodiesel data de 1955 (MEIER, 1955). Inúmeros trabalhos foram realizados no sentido de explorar o potencial e a viabilidade econômica do uso da biomassa de algas para a geração de biocombustíveis, sendo a maioria desses trabalhos focados na possibilidade de utilização de CO₂ derivado da utilização de combustíveis fósseis para potencializar o crescimento das algas (PACKER, 2009).

Nem todas as espécies de microalgas podem acumular lipídios na sua célula e serem consideradas como satisfatórias para a produção de biodiesel. As microalgas diferem da maioria dos óleos vegetais por serem ricos em ácidos graxos mais pesados e com quatro ou mais duplas ligações (BELARBI, MOLINA E CHISTI, 2000), isto faz com que o combustível produzido a partir deste óleo seja quimicamente mais parecido com o combustível fóssil. Este óleo, comumente, acumula lipídios e dentro deles podem ser encontrados, ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerofosfolipídeos, fosfolipídios, esfingolipídios, prostaglandinas, terpenóides e esteróides. Nas microalgas oleaginosas, os TGs podem representar mais de 80% da fração total de lipídios. O uso das microalgas ainda oferece a vantagem de não comprometer a produção de alimentos, comparando-se com os óleos vegetais.

As propriedades físico-químicas do biodiesel são bastante influenciadas pelas cadeias dos ácidos graxos livres. Por exemplo, se contém mais ácidos graxos insaturados do que saturados, o biodiesel pode torna-se mais instável. Na Tabela 2.8 pode-se observar o perfil de ácidos graxos de nove espécies diferentes de microalgas. Cada espécie tem um perfil característico, o qual vai definir as propriedades do biodiesel feito a partir do óleo proveniente da microalga. Pode-se observar que as nove espécies mostrar uma alta percentagem do ácido palmítico, mas o perfil é bem diferente uma da outra.

Tabela 2. 8. Perfil de ácidos graxos de diferentes espécies de microalgas

Ácido Graxo	<i>Amphidinium</i> sp.	<i>Bidulphia</i> sp.	<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	<i>Picochlorum</i> sp.	<i>Nannochloopsis</i> <i>oculata</i> .	<i>Extubocellulus</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> <i>dimorphos</i>	<i>Franceia</i> sp.	<i>Mesotaenium</i> . sp.
C8:0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
C10:0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C12:0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
C13:0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0	0,8	21,4	3,3	0,5	5,8	6,6	0,5	0,6	0,5
C15:0	0,0	2,2	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,6	0,5
C15:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	2,2	2,3
C16:0	35,7	23,6	23,6	16,8	32,2	25,6	15,8	12,9	13,4
C16:1 (9)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	5,9	4,8
C16:2 (7,10)	0,0	1,7	1,4	5,1	0,0	2,7	2,1	1,5	2,2
C16:2 (9,12)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,8	0,7
C17:0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,4	0,5	0,5
C16:3 (cis 6, 9,13)	0,0	4,4	4,3	3,5	0,0	0,0	0,5	0,7	0,6
C16:3 (7, 10, 13)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	1,3	1,8
C16:4 (4, 7, 10, 13)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,6	17,0	16,4
C18:0	4,1	0,8	0,8	3,4	1,0	0,9	0,6	0,5	0,6
C18:1 (9)	19,4	1,5	3,6	15,5	20,1	3,2	7,1	4,4	5,7
C18:1 (x)	0,0	0,6	2,3	0,0	0,0	0,0	1,8	2,3	1,9
C18:2 (cis -9, 12)	0,0	0,0	0,0	35,8	1,3	0,0	12,8	8,5	11,8
C18:3 (cis - 9, 12, 15)	0,0	0,0	0,0	14,9	0,0	0,0	1,0	1,2	1,0
C18:3 all cis 6, 9, 12, 15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	32,3	30,4
C18:4 (6, 9 ,12, 15)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	3,7	3,1
C20:0	5,7	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Ácido Graxo	<i>Amphidinium</i> sp.	<i>Bidulphia</i> sp.	<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	<i>Picochlorum</i> sp.	<i>Nannochloopsis</i> <i>oculata</i> .	<i>Extubocellulus</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> <i>dimorphos</i>	<i>Franceia</i> sp.	<i>Mesotaenium</i> . sp.
C20:2 (cis – 11, 14)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0
C20:5 (allcis)5,8,11,14,17)	11,9	9,6	12,1	0,0	8,3	0,0	0,0	0,9	0,8
C22:6	20,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,8	0,0
C24:1 (cis - 15)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0

*() Parênteses significa o carbono onde a instauração está presente

Fonte: (ISLAM et al., 2013)

Todos os processos existentes para a produção de biodiesel a partir de microalgas incluem uma unidade para a produção da biomassa, onde as células crescem, estes sistemas podem ser abertos ou fechados como foi explicado anteriormente no item 2.2.3. A seguir, há necessidade de se ter uma unidade de separação das células do meio de cultivo, a qual pode ser feita via centrifugação, floculação, decantação, dentre outros. Na sequência, um processo de extração, onde são separados os lipídios e a matéria prima para o processo de produção do biodiesel. Esta extração pode ser feita por solventes, extração supercrítica (HALIM et al., 2011), prensagem, dentre outras (HALIM, DANQUAH E WEBLEY, 2012; LEE et al., 2010).

O biodiesel a partir do óleo extraído das microalgas é produzido, geralmente, por meio da reação de transesterificação (HOSSAIN et al., 2008) e podem ser aproveitadas as tecnologias usadas para as outras matérias primas, ou seja, processos em reatores em batelada via catálise homogênea, heterogênea ou enzimática, ou processos supercríticos, entre outros. A Figura 2.5 mostra a representação esquemática dos passos a serem seguidos para a produção de biodiesel de microalgas.

Atualmente, novos procedimentos são estudados para a produção de biodiesel para tentar evitar alguns dos passos anteriores. A transesterificação in situ, por exemplo, elimina a etapa de extração do óleo (EHIMEN, SUN E CARRINGTON, 2010; HAAS E WAGNER, 2011).

O biodiesel produzido por óleo de microalga tem propriedades que estão dentro das normas ASTM, isto se pode observar na Tabela 2.9 onde se listam os valores das propriedades de um biodiesel proveniente de óleo de microalga, diesel e o valor limite da norma. Pode-se observar que a viscosidade do óleo de microalga encontra-se no valor limite desta propriedade, isto é uma medida importante para o funcionamento do biocombustível no motor, pois uma viscosidade alta do combustível, e portanto, pode criar uma heterogeneidade na combustão do biodiesel, devido à diminuição da eficiência de automatização na câmara de combustão, ocasionando a deposição de resíduos nas partes internas do motor. (LÔBO E FERREIRA, 2009).

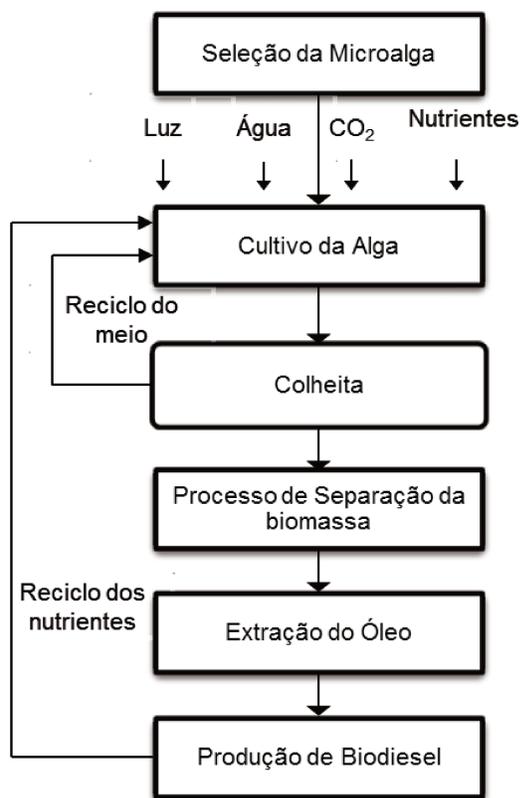


Figura 2. 5. Etapas de preparação da microalga para produção de biodiesel

Fonte: Adaptado de (MATA, MARTINS E CAETANO, 2010)

Tabela 2. 9. Comparação das propriedades do biodiesel proveniente do óleo de microalga, diesel convencional e a norma ASTM para biodiesel

Propriedade	Biodiesel microalga	Diesel	ASTM biodiesel standard
Massa específica (Kg L ⁻¹)	0,864	0,838	0,84-0,90
Viscosidade (mm ² s ⁻¹ , cSt a 40°C)	5,2	1,9-4,1	3,5-5,2
Ponto de fulgor (°C)	115	75	Min 100
Ponto de solidificação (°C)	-12	-50	-
Temperatura limite de filtrabilidade (°C)	-11	-3 (max -6,7)	Verão max 0
Acidez (mg KOH g ⁻¹)	0,374	Max 0,5	Max 0,5
Calor específico (MJ Kg ⁻¹)	1,81	1,81	-

Fonte: (HUANG et al., 2010)

2.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo foram descritos a terminologia e os processos a serem estudados no trabalho de tese. Estudaram-se o histórico e os diferentes processos de produção de biodiesel, as espécies de microalgas, seu crescimento e sua alta potencialidade para produção de biodiesel. As microalgas, apesar de ser uma matéria nova de estudo para os biocombustíveis, é uma matéria prima promissora. Assim, este trabalho visa estudar as condições de crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. para contribuir nesta área de desenvolvimento, que é a produção de biodiesel a partir do óleo extraído das microalgas.

3. METODOLOGIA

A metodologia, de uma forma geral, que foi realizada para o desenvolvimento do trabalho é mostrada na Figura 3.1. Duas etapas de pesquisa podem ser observadas; a primeira, que envolve o trabalho feito com a microalga *Desmodesmus* sp. e, dentro desta, trabalharam-se os três sistemas de cultivo para o crescimento: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. Os sistemas usados para o crescimento foram abertos e fechados e em volumes desde Erlenmeyer de 250 mL até tanques de 500L. A segunda etapa foi o trabalho com o óleo sintético, onde foi possível estudar a reação de transesterificação. Foram realizados estudos de catálise da reação e álcool empregado. Foi realizado um planejamento de experimentos para observar o comportamento das variáveis que influenciam na reação de transesterificação.

Este capítulo foi dividido em quatro subcapítulos. No primeiro, são mostrados os materiais e métodos empregados para o cultivo autotrófico da microalga *Desmodesmus* sp. No segundo é mostrado o desenvolvimento do cultivo heterotrófico, no terceiro é descrita a metodologia para o cultivo mixotrófico e a comparação com os dois anteriores e, por último, estudou-se o óleo sintético e se detalharam as metodologias em equipamentos de análise.

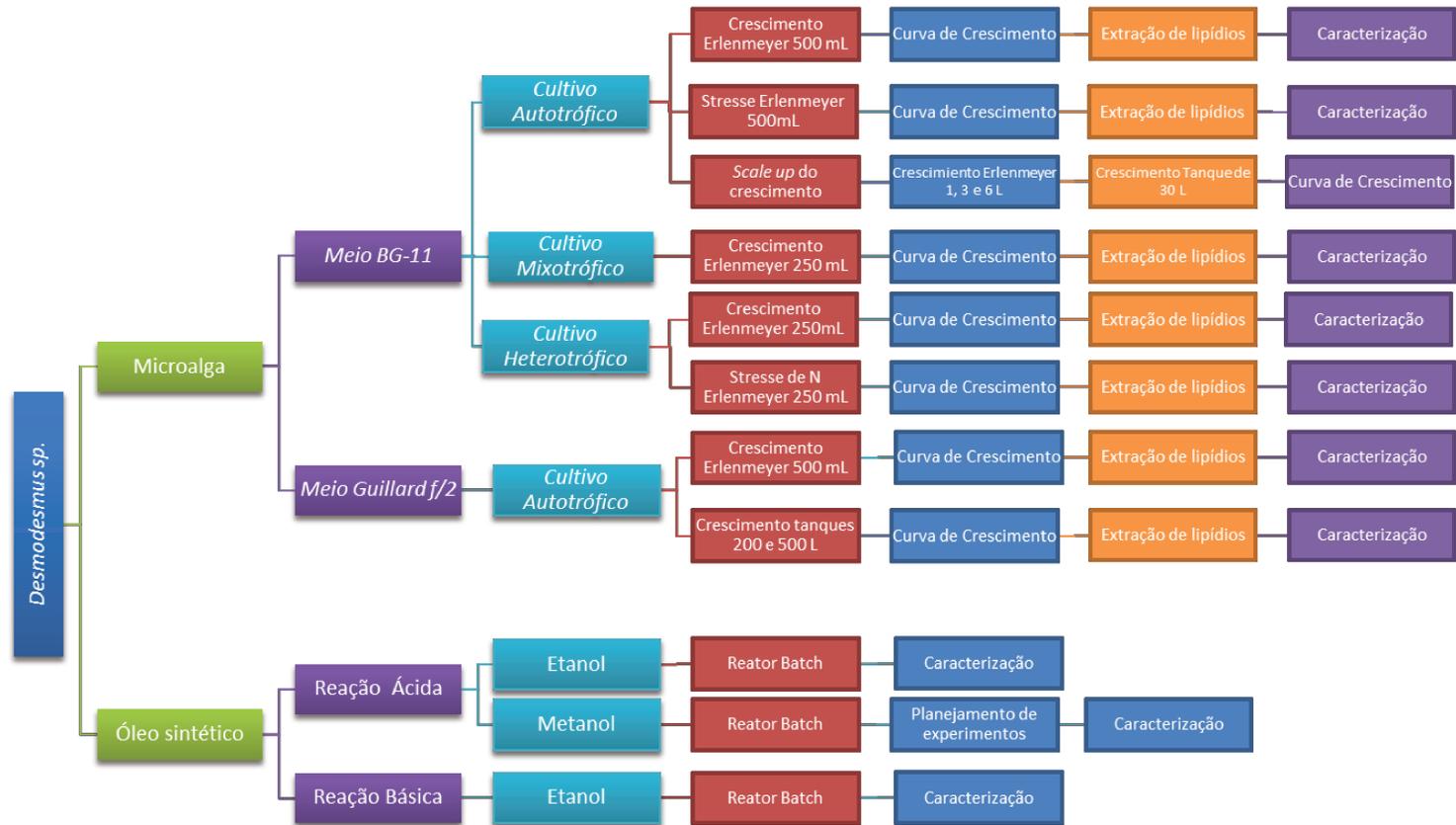


Figura 3.1. Descrição da metodologia experimental

3.1.CULTIVO AUTOTRÓFICO

Este cultivo autotrófico foi realizado na Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Nele, trabalhou-se com sistemas fechados, agitação por meio de ar, luz sintética e fotoperíodo de 12 horas. Já na Universidade Federal do Paraná, UFPR, o crescimento foi em tanques abertos, aproveitando-se a luz solar.

3.1.1. Micro-organismo

A microalga identificada como *Desmodesmus* sp. foi doada pelo Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA) do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/Paraná. A cepa doada é mostrada na Figura 3.2. Esta cepa foi obtida junto ao CEPPA/UFPR, onde era usada para alimentar dáfneas usadas em ensaios de toxicologia. A cepa foi mantida em meio sintético sobre condições controladas de temperatura média de 27°C e fotoperíodo de 12 horas.



Figura 3.2. Microalga *Desmodesmus* sp. doada pelo Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA)

3.1.2. Meio de Cultivo

Dois meios de cultivo foram testados: o meio Guillard f/2 (GUILLARD E RYTHER, 1962) e o BG-11 (RIPPKA et al., 1979). Na preparação dos meios de cultivo se misturaram todos os sais, metais e vitaminas que contém o meio e o pH foi ajustado a um valor de 7,5, para o BG-11 e para o Guillard f/2 em 8,0. O meio de cultivo, Erlenmeyer, bomba de ar, mangueiras, e elementos usados foram esterilizados em uma autoclave vertical, marca Phoenix Lufenco, modelo AV-50 Plus, a uma temperatura de 121°C durante um tempo de 15 minutos, para evitar contaminação.

A composição dos meios de cultivo e as concentrações de todos os componentes são mostrados na Tabela 3.1 e Tabela 3.2 para o Guillard f/2 e para o BG-11, respectivamente.

Tabela 3. 1. Composição meio de cultivo Guillard f/2

Componente	Composição (mg L⁻¹)
NaNO ₃	750
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	300
f/2 Solução de metais	
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4,36
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22
CoCl ₂ 6H ₂ O	10
MnCl ₂ .4H ₂ O	180

Componente	Composição (mg L ⁻¹)
Solução de vitaminas	
tiamina HCl (vit. B ₁)	200
biotina (vit. H)	0,1
cianocobalamina (vit. B ₁₂)	1

Tabela 3. 2. Composição meio de cultivo BG-11

Componente	Composição (mg L ⁻¹)
NaNO ₃	1500
K ₂ HPO ₄	40
CaCl ₂ .2H ₂ O	30
Na ₂ CO ₃	19
MgSO ₄ .7H ₂ O	8
C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	7
Citrato de amônio e ferro (III)	6
H ₃ BO ₃	3
MnCl ₂ .4H ₂ O	2
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,7
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,05

3.1.3. Crescimento

O crescimento no laboratório da UNICAMP foi feito em vários tamanhos de recipiente e em sistemas fechados. Inicialmente, a cepa da microalga foi recebida em um tubo de ensaio de 75 mL de volume. Essa cepa foi reproduzida em Erlenmeyer de 200, 500 e 1000 mL e 6000 mL e tanque de 30L. Este aumento de escala foi realizado introduzindo 10% do inóculo da escala anterior para a escala seguinte. Para o crescimento em pequena escala foi usada uma câmara com um banco de luzes, projetada no laboratório BIOEN da Faculdade de Engenharia Química, usada no desenvolvimento da dissertação de mestrado que foi desenvolvida na produção de etanol a partir da microalga *Chlorella vulgaris* (KLEIN, 2013); o equipamento pode ser visto na Figura 3.3 (a) e na Figura 3.3 (b), pode observar-se o crescimento de um cultivo de *Desmodesmus* sp.



(a)



(b)

Figura 3.3. Equipamento de crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. (a) banco de luzes, (b) cultivo em crescimento.

Com o objetivo de obter uma grande quantidade de biomassa para conseguir produzir o biodiesel, o crescimento foi aumentado a tanques. Estes tanques são abertos, de material plástico e contém volumes de 200 e 500 L. Este crescimento foi feito no GIA-UPFR e são mostrados na Figura 3.4.



Figura 3.4. Crescimento em tanques abertos no GIA-UPFR.

3.1.4. Estresse de nutrientes (Nitrogênio)

Este estudo de deficiência de nutrientes (nitrogênio) foi realizado com o objetivo de aumentar o acúmulo de lipídios na célula da microalga pelo estresse que gera na célula esta deficiência. Neste procedimento, retirou-se parte do nitrogênio contido no meio de cultivo; porcentagens de 100%, 50%, 25% e 0% de nitrogênio do meio BG-11 foram estudados, com o objetivo de aumentar a porcentagem de lipídios. As concentrações do nitrogênio no meio são mostradas na Tabela 3.3. Inicialmente, o crescimento começou no meio BG-11, sem modificações. No sexto dia de crescimento, quando o cultivo tinha atingido a fase exponencial, a biomassa foi retirada do meio e quatro meios de cultivo foram iniciados. Foi monitorado o crescimento e a quantidade de lipídios durante sete dias.

Tabela 3. 3. Composição de nitrogênio no meio de cultivo

Nomenclatura	Concentração inicial de NaNO₃ (mg.L⁻¹)
0N	0
25N	375
50N	750
100N (sem modificações)	1500

3.1.5. Métodos

3.1.5.1. Massa celular

O crescimento celular foi medido por duas vias. Dependendo da etapa, a contagem foi feita de forma direta ou por meio de espectrofotometria UV/visível.

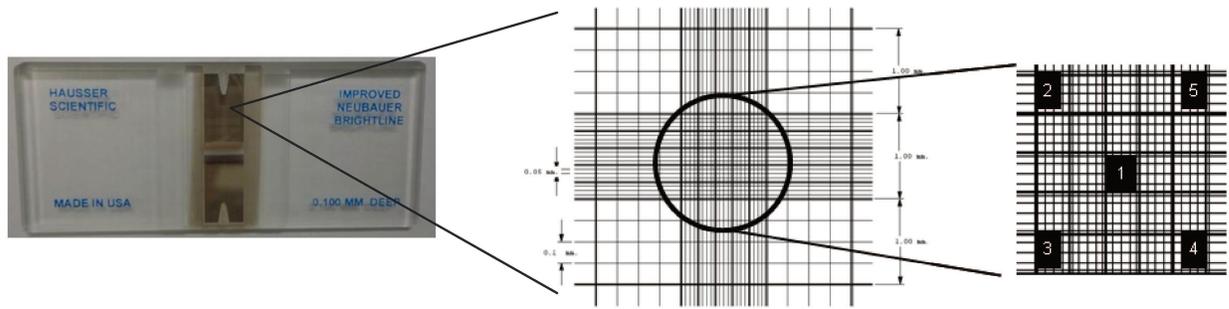
3.1.5.1.1. Microscópio

A densidade celular foi medida por contagem direta das células por meio do microscópio Olympus CX21 (Figura 3.5) usando uma câmara de Neubauer, mostrada na Figura 3.6 (a). O procedimento de contagem é mostrado na Figura 3.6 (b); é contado o número de células contidas nos quadros pretos, nas duas seções da câmara. Somam-se os valores e o número de células/mL de meio, é:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \# \text{células contadas} * 1000/0,02 \quad \text{Equação 3. 1}$$



Figura 3. 5. Microscópio óptico Olympus CX21



(a)

(b)

Figura 3. 6. (a) Câmara de Neubauer, (b) Contagem de células

3.1.5.1.2. Espectroscopia UV/Visível

Foi usado um espectrômetro Cintra 10e, mostrado na Figura 3.7. As leituras foram feitas em um comprimento de onda de 684 nm. Foi feita uma curva de calibração para, a partir da leitura da absorbância fornecida pelo equipamento, conseguir obter as g/mL da microalga.

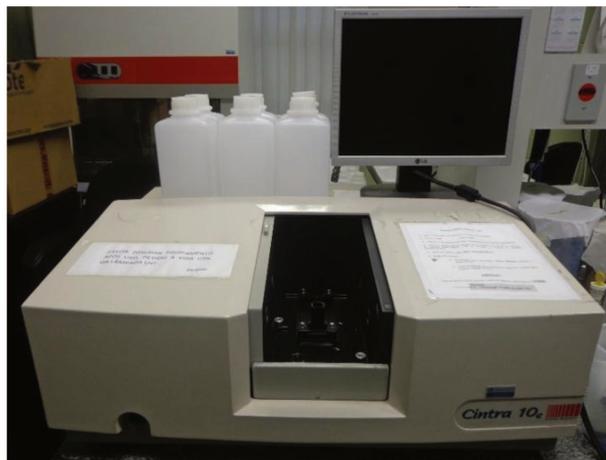


Figura 3. 7. Espectrômetro Cintra 10e UV/visível

3.1.5.2. Recuperação da biomassa

Assim que a microalga atinge a quantidade máxima de células, ela precisa ser retirada do meio de cultivo. Isto foi feito por meio da operação de centrifugação. Foi usada uma centrífuga Eppendorf 5810R, mostrada na Figura 3.8. A operação de centrifugação foi feita a uma velocidade de 10000 rpm, uma temperatura de 4°C e durante 20 minutos. A biomassa precipita e o meio de cultivo é retirado.

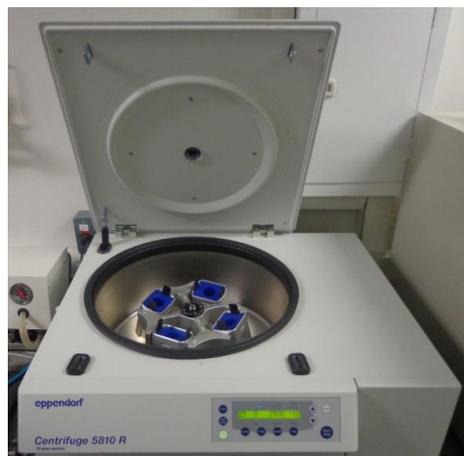


Figura 3.8. Centrífuga Eppendorf 5810R

3.1.5.3. Secagem da biomassa

O processo de secagem da biomassa é importante para o processo de extração dos lipídios e o objetivo desta etapa é retirar a maior quantidade de resíduo de água. O processo foi feito por duas vias:

3.1.5.3.1. Estufa

O processo de secagem foi feito em estufa, a uma temperatura média de 104°C, durante 24 horas até obter peso constante.

3.1.5.3.2. Liofilizador

O processo foi feito em um liofilizador da LABCONCO, mostrado na Figura 3.9. Primeiramente, a biomassa é passada por um fluxo de nitrogênio para congelar a amostra, a seguir, ela é introduzida na câmara de vácuo, onde a água congelada passa ao estado gasoso e, então, é retirada completamente da biomassa. Geralmente, este processo demora 24 horas, mas dependendo da quantidade de biomassa, pode demorar um pouco mais.



Figura 3.9. Liofilizador LABCONCO

3.1.5.4. Quantificação de pigmentos: clorofila e carotenóides

A concentração da clorofila e carotenóides foi determinada usando o método espectrofotométrico. Volume de 1 - 2 mL de suspensão algal foi centrifugado a 12.000 rpm durante 6 minutos; separadas as duas fases, o sobrenadante foi descartado. A biomassa foi lavada com água deionizada e a solução foi centrifugada novamente. Foi retirada a água e adicionado 1 mL de metanol (99,9%) e deixou-se incubando a 4°C durante 12 horas. Estes extratos foram protegidos da luz a fim de evitar a decomposição dos pigmentos.

O conteúdo dos pigmentos no sobrenadante foi calculado medindo a absorbância (A) num espectrofotômetro e as concentrações em µg/mL foram calculadas pelas seguintes equações (Becker, 1994) (Ritchie, 2006):

$$\text{Clorofila } a \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = -8,3 A_{650} + 16,5 A_{665} \quad \text{Equação 3.2}$$

$$\text{Clorofila } b \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 33,8 A_{650} - 12,5 A_{665} \quad \text{Equação 3.3}$$

$$\text{Clorofila total} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b \quad \text{Equação 3.4}$$

$$\text{Carotenoides} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 4A_{480} \quad \text{Equação 3.5}$$

Onde A_{480} , A_{650} , A_{665} é o valor da absorbância a 480, 650 e 665 nm, respectivamente.

3.1.5.5. Extração de lipídios

A extração de lipídios foi feita pelo método de Bligh & Dyer (1959), mostrado na Figura 3.10. Neste método, uma mistura de metanol/clorofórmio (2:1) e água foi utilizada. O procedimento é manter a biomassa em contato com a mistura de solventes durante um período de 30 minutos com forte agitação em um vortex. São adicionados na mistura água e clorofórmio e misturados por 2 min. A seguir, a mistura é centrifugada a uma velocidade de 5000 rpm durante 10 minutos. Depois da centrifugação, a mistura é dividida em três fases: a fase superior é a metanólica; a fase do meio é a proteína; e a fase inferior, contendo o clorofórmio, é a fase orgânica, concentrada em lipídios. O clorofórmio foi separado dos lipídios passando uma corrente de nitrogênio gasoso que arrasta o clorofórmio ou por meio de secagem numa estufa a 104°C durante 12 horas. Por fim, são obtidos os lipídios, os quais foram quantificados por gravimetria em balança analítica até conseguir peso constante em dessecador. A porcentagem foi calculada mediante a Equação 3.6:

$$\% \text{Lipídios} = \frac{\text{massa depois da extração}}{\text{massa inicial da amostra}} \quad \text{Equação 3. 6}$$

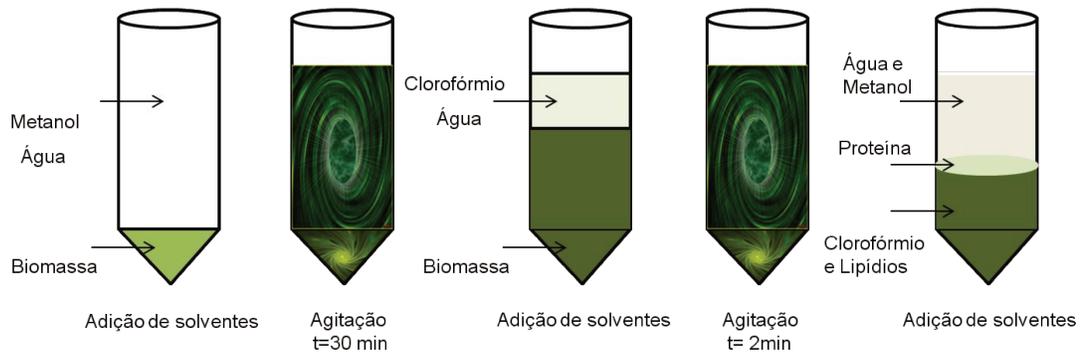


Figura 3.10. Método Bligh & Dyer

3.1.5.6. Identificação de lipídios

Esta etapa foi realizada só para os experimentos de estresse de nitrogênio. Os lipídios foram identificados qualitativamente por meio de fluorimetria e por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier em inglês *Fourier transform infrared spectroscopy* (FT-IR). A seguir, são detalhados os métodos usados.

3.1.5.6.1. Análise por fluorimetria

Esta análise foi realizada com o objetivo de identificar o aumento de lipídios por dia no estudo de deficiência de nutrientes. O método usado foi adaptado dos métodos descritos no (ELSEY et al., 2007) e (CHEN et al., 2009). Foi usado um fluorímetro HITACHI F4500. Alíquotas por dia no processo de estresse de nutrientes foram retiradas e incubadas durante 12 horas com dimetil sulfóxido (DMSO). Após a incubação, fez-se a contagem de células, mantendo em todas as amostras a mesma quantidade de 2 Mcélulas/mL. Foi adicionada, então, 3 μ L de uma solução de vermelho de Nilo, *Nile Red* (9-dietilamino-5H-benzo[α]fenoxazina-5-ona), diluído em acetona (0,1 mg/mL) e incubado por 10 minutos. A leitura foi feita em condições de comprimento de onda de excitação de 515 nm e em uma faixa de emissão de 515-800 nm. Estas análises foram feitas no Laboratório de Biomembranas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP. Uma curva típica gerada pela análise é mostrada na Figura 3.11, onde é fácil identificar os lipídios e a clorofila de maneira qualitativa.

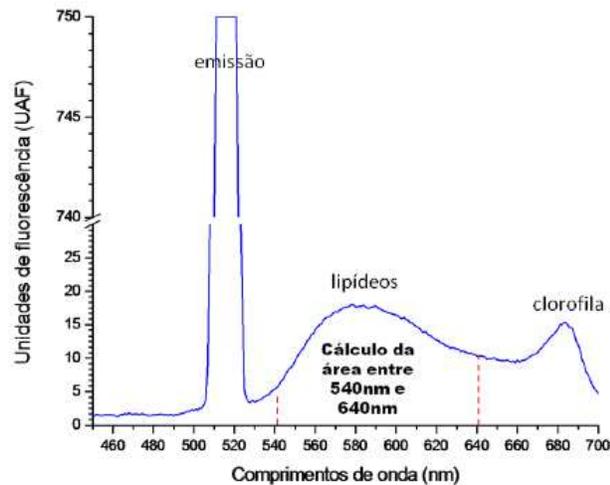


Figura 3. 11. Curva típica gerada por fluorimetria

Fonte: (CURADO, 2011)

3.1.5.6.2. Análise FT-IR

Esta análise foi realizada diretamente da biomassa seca com o objetivo de verificar qualitativamente a composição da biomassa. Geralmente, estes resultados são mostrados em valores de transmitância. Neste trabalho, os resultados são mostrados em absorbância posterior comparação com o trabalho de (PISTORIUS, DEGRIP E EGOROVA-ZACHERNYUK, 2009), neste trabalho foi estudada a quantidade de proteína, carboidratos e lipídios em biomassa de diferentes espécies de microalgas. As principais classes de biomoléculas (proteínas, lipídios, carboidratos) da biomassa podem ser identificadas devido a sua absorção em regiões de frequência diferentes na região de infravermelho médio do espectro: 1.500-1.700 cm^{-1} para grupos peptídeos amida (BANDEKAR, 1992), 1.700-1.750 cm^{-1} para C=O grupos de ésteres lipídicos, 2.800-3.000 cm^{-1} para lipídios de cadeias acil (CHAPMAN et al., 1967), 1.000 - 1.200 cm^{-1} para as ligações C-OH e C-O-C, grupos de carboidratos (HINENO, 1977; TEWARI E IRUDAYARAJ, 2004).

A análise foi feita em um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier, modelo Nicolet 6700 (Madison,USA), marca ThermoScientific, por Refletância Total Atenuada (ATR) com o acessório SMART OMNI-SAMPLER na faixa de 4000-675 cm^{-1} , resolução de 4

cm^{-1} e SCAN 32. Esta análise foi feita no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

As bandas de interesse foram identificadas como proteína na banda de amida II, ao redor de 1545 cm^{-1} , os lipídios, por possuírem composição heterogênea, se identificaram nas ligações C-H, em duas bandas entre 2984 e 2780 cm^{-1} , como mostrado na Figura 3.12. A banda do CO_2 foi identificada em 2360 cm^{-1} . Não foi possível identificar os carboidratos nas amostras, mas eles aparecem nas bandas entre 1180 e 1133 cm^{-1} . Nessa banda, o pico emitido foi muito largo e portanto, não se pode afirmar que sejam os carboidratos. Por último, se encontra a banda de C-N ao redor de 1360 cm^{-1} .

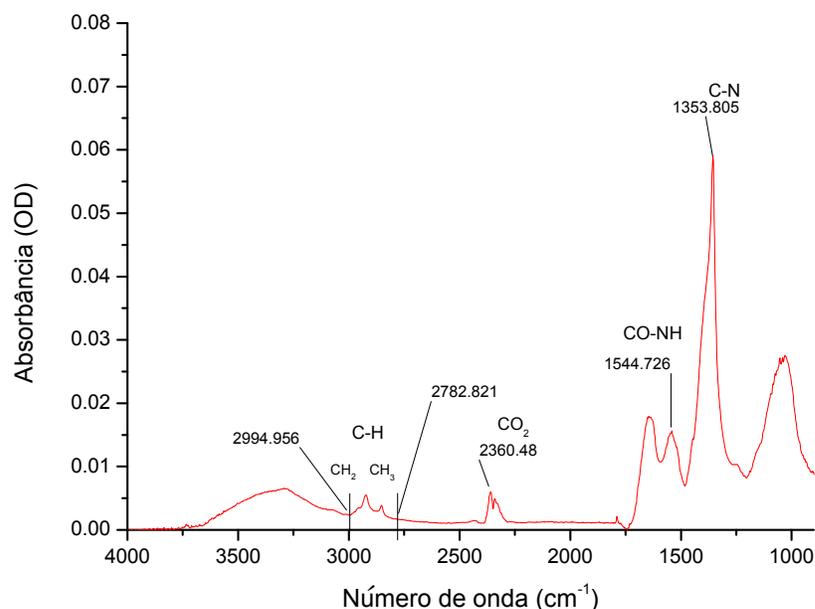


Figura 3. 12. Curva análise FT-IR

3.1.5.7. *Scale up*

O aumento de escala para o crescimento foi progressivo até chegar num tanque de 30 L. O cultivo foi iniciado em Erlenmeyer de 1 L. Foram colocados 400 mL de cultivo BG-11 autoclavado previamente e foi inoculado com 10% em volume da cepa. Assim que o cultivo

atingiu o sexto dia de crescimento, 440 mL foi transferido para um recipiente de 3 L, que foi completado com meio de cultivo novo até um volume de 2,4 L. A seguir, o cultivo foi aumentado a 6 L e, por fim, foi inoculado o tanque de 30 L. Os Erlenmeyers de 1, 3 e 6 L são mostrados na Figura 3.13 (a) e o tanque na Figura 3.13 (b). Todos foram misturados por meio de ar com auxílio de uma bomba de aquário e para o tanque de 30 L usou-se um compressor.

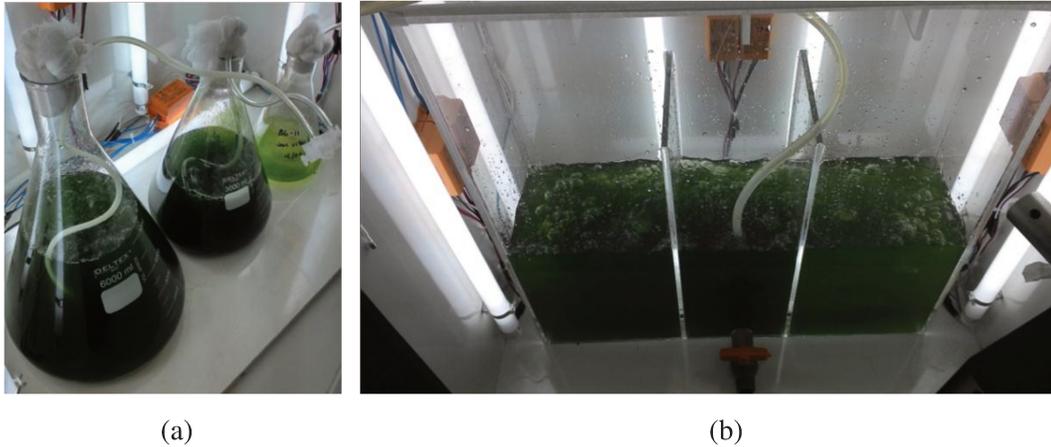


Figura 3. 13. *Scale up* do crescimento (a) Erlemenmeyer de 1, 3 e 6 L, (b) Tanque de 30 L

3.2.CULTIVO HETEROTRÓFICO

Este cultivo foi realizado no Instituto de Biotecnologia (IBT) da Universidade Autônoma do México, UNAM. Nesta etapa, foi usada a mesma cepa *Desmodesmus* sp. doada pelo GIA. Inicialmente, foi realizado um isolamento de bactérias da cepa, isto foi necessário já que o cultivo sempre foi autotrófico e não precisou de controle de bactérias, mas quando se adiciona a fonte de carbono (glicose) as bactérias começam a se reproduzir muito rápido, acabando com as células da microalga. Após o isolamento de bactérias, foi realizado o estudo do crescimento heterotrófico usando como fonte de carbono a glicose.

3.2.1. Micro-organismo

A cepa isolada de bactérias e com a qual se trabalhou neste cultivo heterotrófico é mostrada na Figura 3.14. Pode-se observar que o cultivo é bem mais limpo comparado com a foto do cultivo autotrófico, que foi mostrada na Figura 3.2. Também pode-se observar a célula bem mais definida.

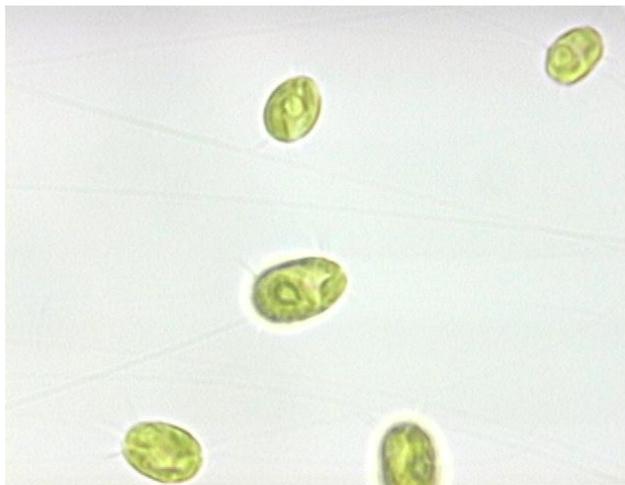


Figura 3. 14. Microalga *Desmodesmus* sp. isolada

3.2.2. Meio de Cultivo

Nesta etapa foram usados meios líquidos e meios em ágar. Para o crescimento em placas de ágar foram usados 3 meios de cultivos, os quais são listados na Tabela 3.4. A concentração de ágar nos cultivos foi de 20 g/L. Para a preparação dos meios, foram adicionados todos os componentes; a seguir o ágar foi misturado, ajustado o pH e por fim foi autoclavado a 121°C durante 20 min. O meio Luria Bertani (LB) é um meio rico em triptona e levedura. Este meio foi estudado com o objetivo de ver o crescimento e a população de bactérias, já que por ser um meio rico, as bactérias crescem muito rápido.

O meio BG-11 foi preparado da mesma maneira que o cultivo autotrófico, como detalhado na Tabela 3.2. O meio BG-11 foi modificado (denominado BG-11 rico), no qual foram

adicionadas levedura e peptona, e outro, adicionando a fonte de carbono, glicose, nas composições mostradas na Tabela 3.4.

Tabela 3. 4. Composição dos meios de cultivo

Meio de Cultivo	Componentes	pH
LB	10 g/L de triptona 5 g/L de levedura 10 g NaCl	7,0
BG-11 rico	5 mg/L de levedura 5 g/L de peptona	7,5
BG-11 + Glicose	10 g g/L de glicose	7,5

Para o crescimento em Erlenmeyer, foi usado meio líquido do BG-11, para a preparação do meio, foram adicionados todas as soluções estoque do meio BG-11 e, por último, foram adicionados 10 g/L de glicose como fonte de carbono, e, adicionada uma concentração de antibiótico, para garantir o meio livre de bactérias.

3.2.3. Crescimento

O crescimento para o controle de bactérias foi realizado em placas de Petri plásticas, num banco de luzes com 24 h de luz, como mostrado na Figura 3.15. O cultivo heterotrófico foi realizado em Erlenmeyer de 250 mL sem luz. Para isto, os frascos Erlenmeyers foram isolados da luz, por meio de papel alumínio e papel pardo. O crescimento foi realizado em incubadora, com agitação em *shaker* a 250 rpm e controlando a temperatura em 30°C, como mostrado na Figura 3.16.

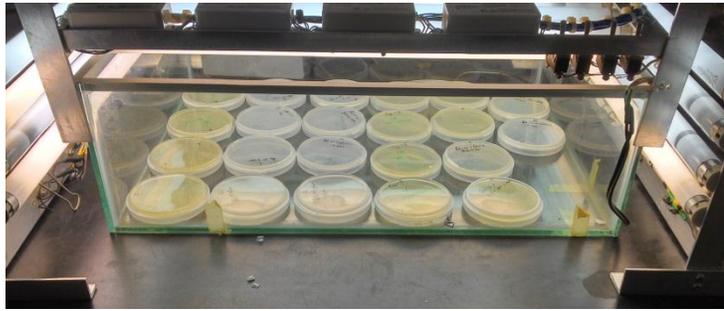


Figura 3. 15. Crescimento em placas Petri



Figura 3. 16. Crescimento em incubadora

3.2.4. Controle de bactérias

Foi realizado o controle de bactérias para tentar isolar o máximo possível a cepa da microalga *Desmodesmus* sp. Neste controle, foram feitos crescimentos em placas de Petri com meios ricos para contar a população das bactérias. Também foram realizados crescimentos com antibióticos para tentar eliminar e controlar o crescimento das bactérias.

3.2.4.1. Identificação de bactérias

A identificação foi realizada pela técnica de Gram que consiste em tratar a amostra com sucessão de reagentes como mostrado na Figura 3.17. Este método consiste em fixar a amostra do

meio de cultivo contaminado ao vidro por meio de calor. A seguir, são colocados os reagentes sucessivamente, começando por cristal violeta e deixando fixar por um tempo de 60 segundos. Para fixar este corante é adicionado o lugol e deixado em contato durante mais 60 segundos. Depois a amostra é lavada com um jato de água destilada rapidamente, e por último, é adicionada a safranina. Deixa-se secar e, a seguir, a amostra é observada no microscópio. Consegue-se observar na cor violeta as bactérias Gram positivas e na cor rosa as bactérias Gram negativas.

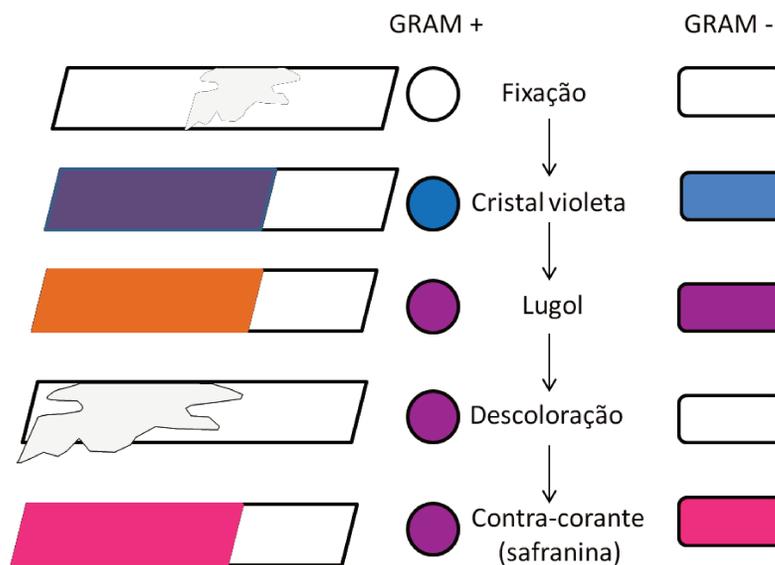


Figura 3. 17. Técnica de Gram

3.2.4.2. População de bactérias

Este procedimento foi realizado em placas de Petri em cultivo Luria Bertani em ágar. A cepa inoculada foi a doada inicialmente pela UFPR. Foi diluído 1 mL da cepa em 9 mL de solução salina à 0,85%. Foram feitas seis diluições consecutivas para tentar diminuir o número de colônias de bactérias e conseguir conta-las, como mostrado na Figura 3.18. Toda vez em que se colocou a quantidade do inóculo, o tubo foi agitado com o vortex durante 1 min para conseguir mistura homogênea. Um volume de 100 µL das soluções - 4 e - 5 foram cultivadas em placas de Petri durante quatro dias. Depois de atingir o crescimento, foram contadas as bactérias nas diluições e calculadas as unidades formadoras de colônias (UFC).

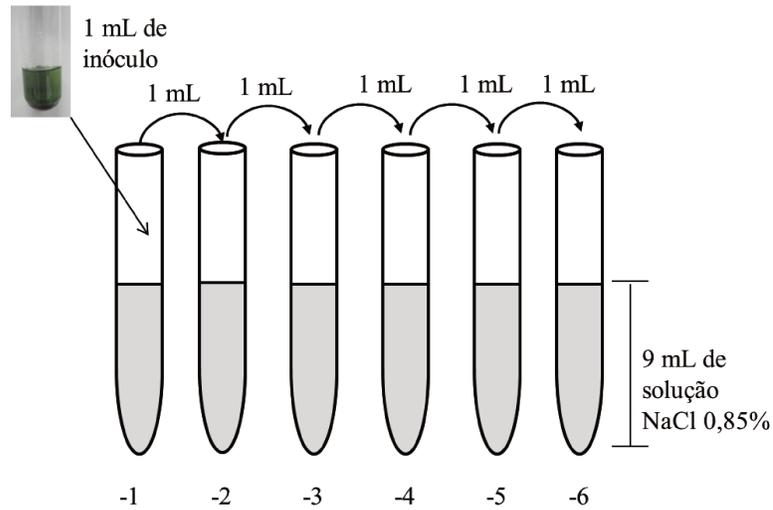


Figura 3. 18. Diluição do inóculo para contagem de bactérias

3.2.4.3. Isolamento das bactérias com antibiótico

O inóculo doado encontrava-se com muitas contaminações de bactérias e, embora isso não influencia no cultivo autotrófico, é um problema para o cultivo heterotrófico. Portanto, procedeu-se com a etapa de eliminação das bactérias por meio de antibióticos. Foram testados três antibióticos nas concentrações mostradas na Tabela 3.5. O crescimento foi feito em placas de Petri e em Erlenmeyer de 250 mL. O crescimento em placas de Petri foi cultivado por dois dias e os cultivos em Erlenmeyer foram cultivados até observar contaminação do cultivo. As bactérias começam se reproduzir logo nas primeiras 24 horas de cultivo.

Tabela 3.5. Concentrações de antibióticos

Antibiótico	Concentração no meio
Cloranfenicol (Cm)	10 mg/mL
Kanamicina (Km)	10 mg/mL
Carbenicilina (Cb)	5 mg/mL
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	500mg/125mg

3.2.4.4. Esgotamento por estrias

O esgotamento por estrias foi realizado com o objetivo de isolar a microalga depois do crescimento com antibióticos e, assim, tentar coletar da colônia mais pura da microalga. O procedimento foi inocular o meio mais asséptico que se conseguiu com os antibióticos em placas de Petri. A partir deste crescimento, tomou-se uma amostra da colônia de microalga através de uma alça ou agulha de sementeira e esgotou-se o material por meio de estrias na superfície do meio com a ágar como é mostrado na Figura 3.19.

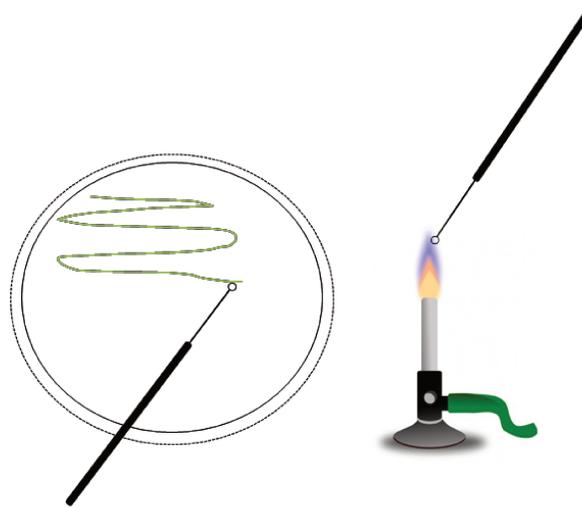


Figura 3. 19. Técnica de esgotamento por estrias

3.2.5. Estudo do crescimento e consumo de glicose

Nesta etapa, estudou-se o crescimento, monitorando por contagem direta o número de células no cultivo. Esta contagem foi realizada igualmente que para o cultivo autotrófico e a metodologia foi detalhada no item 3.1.5.1.1. O consumo de glicose foi monitorado a cada dois dias de crescimento.

3.2.6. Estresse de nutrientes (Nitrogênio)

Nesta etapa, foi realizado um estudo da deficiência de nitrogênio no meio de cultivo. Foram estudados os mesmos níveis que foram estudados no crescimento autotrófico e estão mostrados na Tabela 3.6. Nesta tabela, também é mostrada a relação carbono/nitrogênio (C/N) no meio de cultivo, a quantidade de carbono é de 10 g/L em todas as concentrações de nitrogênio do meio.

Tabela 3. 6. Composição de nitrogênio no meio de cultivo

Nomenclatura	Concentração inicial de NaNO ₃ (mg L ⁻¹)	Relação C/N
0N	0	-
25N	375	74,8
50N	750	37,4
100N (sem modificações)	1500	18,5

3.2.7. Métodos

3.2.7.1. Crescimento

O crescimento celular foi medido por duas vias. A contagem foi feita de forma direta, em microscópio e por meio de espectrofotometria.

3.2.7.1.1. Microscópio

A densidade celular foi medida por contagem direta das células utilizando um microscópio Nikon (Figura 3.20), com ajuda de uma câmara de Neubauer. O procedimento foi o mesmo daquele descrito no item 3.1.5.1.1.



Figura 3. 20. Microscópio Nikon

3.2.7.1.2. Espectrofotômetro

Foi usado um espectrômetro BECKMAN DU 650, mostrado na Figura 3.21, o qual se encontra na planta piloto do IBT da UNAM. As leituras foram feitas em um comprimento de onda de 600 nm. Foi feita uma curva de calibração para, a partir da leitura da absorbância que da o equipamento, conseguir obter as concentrações em g/mL da microalga.



Figura 3. 21. Espectrômetro BECKMAN DU 650

3.2.8. Medição de glicose

Para as medições de glicose foi usado um equipamento analisador de glicose YSI 2700 SELECT *Biochemistry Analyzer*, mostrado na Figura 3.22. Esta tecnologia de sensores

enzimáticos YSI's que empregam uma ou mais enzimas, realizam reações catalíticas que no final produz peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é eletroquimicamente oxidado no anodo de platina da sonda eletroquímica e, por fim, a sonda produz um sinal elétrico. Pelo anterior, a determinação da glicose é uma leitura direta da dextrose na solução pela enzima do sensor. A enzima da glicose oxidase é imobilizada na membrana da dextrose do YSI.



Figura 3. 22. Analisador de Glicose YSI 2700 SELECT

3.3.CULTIVO MIXOTRÓFICO

Este crescimento foi realizado no Instituto de biotecnologia (IBT) da Universidad Autónoma de México, UNAM. Foi realizado já que inicialmente os cultivos heterotróficos se contaminavam rapidamente e, como o cultivo heterotrófico cresce em escuro, não dava para ver que dia do cultivo se contaminava. Foi estudado, então, pela necessidade de saber se a microalga *Desmodesmus* sp. consumia ou não glicose.

3.3.1. Crescimento

O crescimento foi realizado em condições de luminosidade de $79 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, por um período de 24 horas de luz, agitação por *shaker* a 250 rpm e temperatura de 30°C, durante 6 dias.

3.3.2. Meio de Cultivo

O meio de cultivo usado foi o BG-11, adicionando uma concentração de glicose de 10g/L como fonte de carbono. Depois de misturados os componentes, a mistura foi colocada em autoclave a uma temperatura de 121°C durante 20 minutos. A seguir, foi resfriado até temperatura ambiente e, por último, adicionado o antibiótico para garantir a diminuição de bactérias.

3.3.3. Extração de lipídios

A extração dos lipídios foi realizada pelo método Bligh Dyer (1959), detalhado no item 3.1.5.5.

3.3.4. Comparação do crescimento e metabólitos de interesse nos cultivos autotróficos, mixotróficos e heterotróficos

Como método comparativo, foi realizado o cultivo autotrófico no IBT da UNAM nas mesmas condições dos cultivos heterotróficos e mixotrófico, já que na UNICAMP as condições de crescimento eram outras e a microalga *Desmodesmus* sp. encontrava-se contaminada. Nesta etapa, foram comparados os crescimentos e porcentagens de lipídios nos três cultivos. O cultivo autotrófico foi realizado em condições de 24 horas de luminosidade de 79 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, agitação por *shaker* a 250 rpm e uma temperatura de 30°C.

3.3.5. Métodos

Os métodos e equipamentos usados nesta etapa foram os mesmos que foram usados para o cultivo heterotrófico, detalhados no item 3.2.7.

3.3.6. Comparação do cultivo autotrófico, mixotrófico e heterotrófico

Nesta etapa foi realizada uma comparação do crescimento e do teor de lipídios nos três sistemas de cultivo.

3.3.6.1. Velocidade de crescimento

Para realizar o cálculo da velocidade de crescimento foi necessário fazer o gráfico do crescimento, em escala logarítmica, com o objetivo de transformar em linha reta a curva de crescimento e conseguir fazer os cálculos. Na Figura 3.23 é mostrado um gráfico comum da densidade celular (a) e do lado o da escala logarítmica (b). A partir da Figura 3.23 (b), calculou-se a velocidade de crescimento a partir da Equação 3.8.

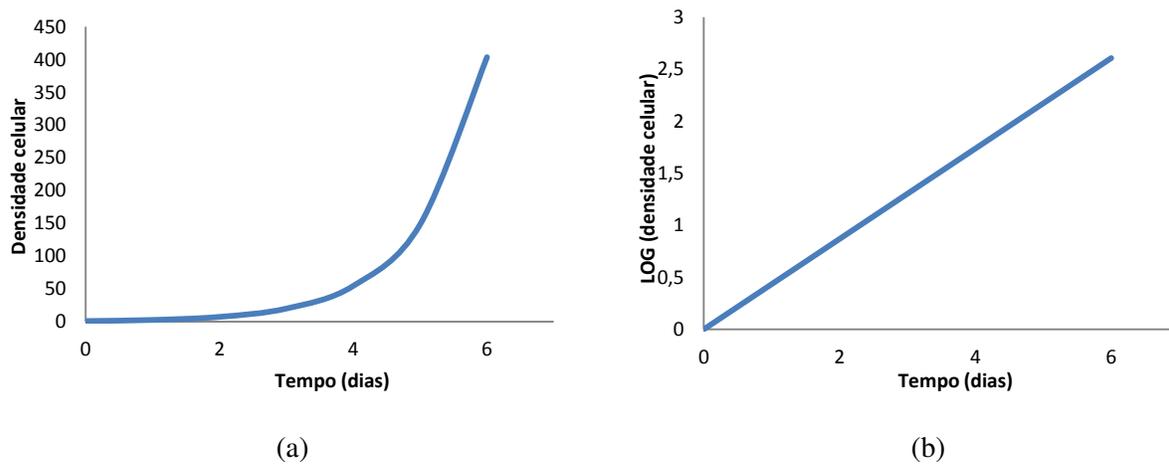


Figura 3. 23. Curvas de densidade celular (a) escala aritmética (b) escala logarítmica

$$\frac{dX}{dt} = \mu \quad \text{Equação 3.7}$$

Onde X, é a densidade celular, t o tempo e μ a velocidade específica de crescimento.

$$\mu = \frac{\ln \frac{X_t}{X_{t_0}}}{t - t_0} \quad \text{Equação 3.8}$$

Se o gráfico é traçado em escala logarítmica, a velocidade de crescimento é a inclinação da reta.

$$X = X_0 + \mu t \quad \text{Equação 3.9}$$

3.3.6.2. Tempo de duplicação

O tempo de duplicação (t_d) é o tempo que uma célula da microalga demora para duplicar-se e pode ser calculado pela equação:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Equação 3.10}$$

3.4. ÓLEO SINTÉTICO

O óleo sintético foi produzido pela necessidade de estudar as variáveis da reação de transesterificação, pois a obtenção do óleo de microalga em escala laboratorial foi reduzida, sendo difícil obter a quantidade necessária para estudar a reação. Para isto, realizou-se uma revisão bibliográfica da composição de vinte e dois óleos/gorduras vegetais e animais, mostrada na Tabela 3.7. Nesta tabela, é mostrada a nomenclatura da fração mássica de cada óleo que vai ter a mistura sintética e a referência de onde foram tomados os dados. A Figura 3.24, mostra a composição em ácidos graxos dos diferentes óleos da base de dados. Para cada óleo, tem-se a composição em ácidos graxos (fração mássica) desde C6:0 até C24:1. Pode-se observar no gráfico que muitos dos óleos tem um perfil bem parecido, por exemplo, muitos óleos possuem em maior quantidade o C16:0, C18:1 e C18:2, mas nem todos tem no seu perfil o C12:0 que nem o óleo de coco possui. Pode-se notar também que o óleo de peixe possui mais quantidade de ácidos graxos mais pesados dentro do seu perfil.

Realizou-se uma listagem das composições em ácidos graxos de cada um destes óleos, os quais são mostrados nas Tabela 3.8 e Tabela 3.9. A partir da informação coletada, foi feita uma matriz da composição destes 21 óleos, a qual foi usada para, numericamente, obter um “óleo sintético com as características da microalga *Desmodesmus* sp. O procedimento foi obter uma série de equações que relacionassem as frações de cada óleo na mistura com as frações do óleo da

microalga; este conjunto de equações foi resolvido pelo método iterativo Runge-Kutta. Esta etapa foi realizada com ajuda do MSc. Edgar Leonardo Martinez Arias.

Tabela 3. 7. Base de dados dos óleos e nomenclatura

Óleo	Fração mássica de óleo	Referência
Palma	x_1	(RIOS, 2010)
Coco	x_2	(GONZALEZ, 2009)
Soja	x_3	(DA SILVA, 2010)
Peixe	x_4	*
Borragem	x_5	*
Girassol	x_6	*
Abacate	x_7	(DOS SANTOS et al., 2007)
Algodão	x_8	(DA SILVA et al., 2008)
Amêndoas	x_9	(CAMPESTRE, 2010)
Amendoim	x_{10}	(CAMPESTRE, 2010)
Arroz	x_{11}	(FRANCK et al., 2011)
Canola	x_{12}	*
Castanha do Pará	x_{13}	(CAMPESTRE, 2010)
Cenoura	x_{14}	(PARKER et al., 2003)
Coco babaçu	x_{15}	(COSTA, PAES E ANTONIASSI 2006)
Palmiste	x_{16}	(NOOR LIDA et al., 2002)
Gergelim	x_{17}	(YEN, 1990)
Germe de trigo	x_{18}	(BARNES, 1982)
Linhaça	x_{19}	(NUERNBERG et al., 2005)
Maracujá	x_{20}	(TRAJANO et al., 2009)
Milho	x_{21}	*

*Dados das análises feitas no Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA, da UNICAMP.

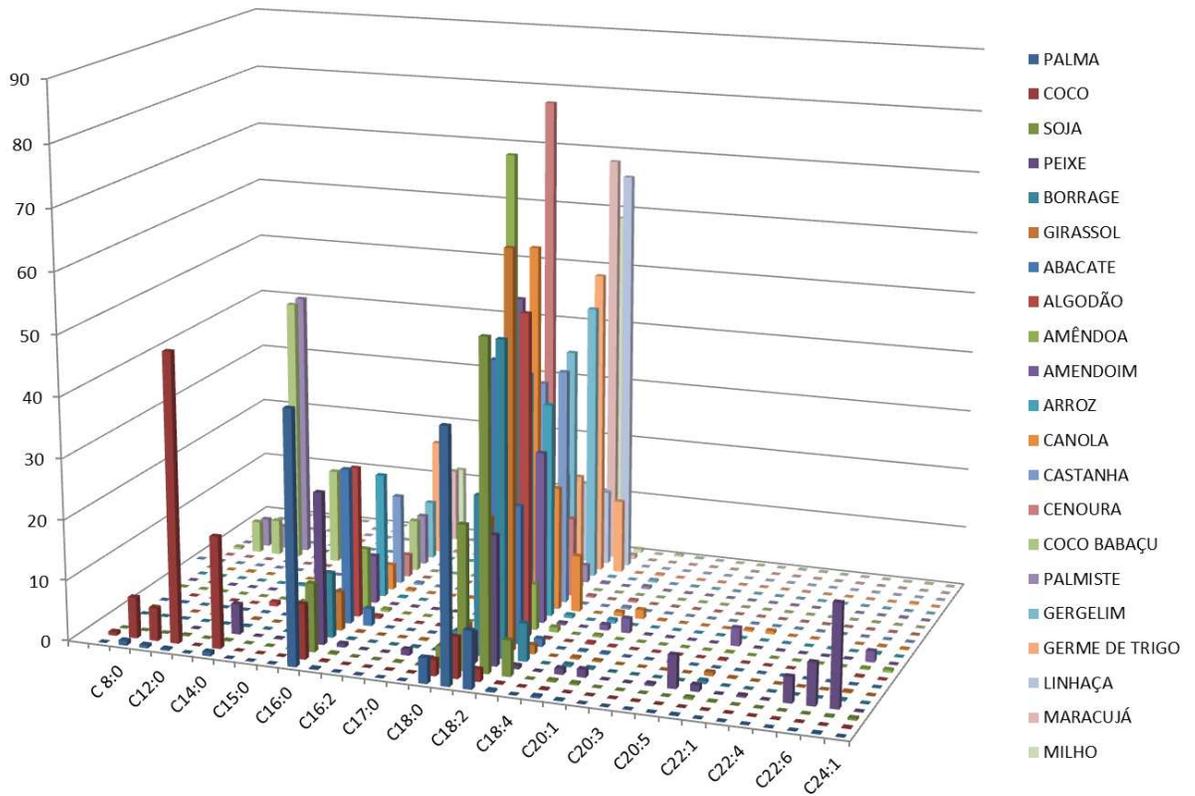


Figura 3. 24. Gráfico de composição em ácidos graxos de diferentes óleos.

Tabela 3.8. Composição em ácidos graxos

AG	PALMA	COCO	SOJA	PEIXE	BORRAGEM	GIRASSOL	ABACATE	ALGODÃO	AMÊNDOAS	AMENDOIM	ARROZ
C 6:0	0	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C 8:0	0,8	6,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C10:0	0,5	5,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C12:0	0,3	47,7	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0	0
C13:0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C14:0	0,7	18,5	0,1	5,01	0,08	0,1	0	0,7	0	0,1	0,21
C15:0	0	0	0	0,09	0,03	0	0	0	0	0	0
C16:0	41,6	9,1	11,3	25,09	10,76	6,4	25,79	25	10,3	8	20,69
C16:1	0,2	0,1	0,2	0,59	0,09	0,1	2,85	0,43	0,4	0	0,13
C16:2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C17:0	0	0	0,1	0,97	0,1	0,1	0	0,08	0	0	0
C17:1	0	0	0	0	0,05	0,1	0	0	0	0	0
C18:0	4,2	2,7	3,6	3,47	3,7	3,6	0,77	3	2,9	1,8	2,18
C18:1	41,3	6,8	23,7	5,16	26,25	21,7	46,11	17	77	53,3	40,16
C18:2	9,5	2	53,6	21,32	51,43	64,9	22,8	53	7,6	28,4	35,36
C18:3	0,3	0,1	5,9	0,57	6,24	1,5	1,3	0,12	0,8	0,3	0,5
C20:0	0,3	0,1	0,3	1,01	0,38	0,3	0,16	0,32	0,3	0,9	0,56
C20:1	0,1	0	0,3	1,3	0,23	0,2	0,22	0,1	0	2,4	0
C20:2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C20:4	0	0	0	0,34	0	0	0	0	0	0	0
C20:5	0	0	0	5,46	0	0	0	0	0	0	0
C22:0	0,1	0	0,3	1,06	0,49	0,6	0	0,15	0,1	3	0
C22:1	0	0	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0	0
C22:2	0	0	0	0,29	0	0	0	0	0	0	0
C22:5	0	0	0	4,24	0	0	0	0	0	0	0
C22:6	0	0	0	6,95	0	0	0	0	0	0	0
C24:0	0,1	0	0,1	16,79	0,17	0,2	0	0,1	0,2	1,8	0,21
C24:1	0	0,1	0,3	0	0	0	0	0	0,4	0	0

Tabela 3.9. Composição em ácidos graxos

AG	CANOLA	CASTANHA DO PARÁ	CENOURA	COCO BABAÇU	PALMISTE	GERGELIM	GERME DE TRIGO	LINHAÇA	MARACUJÀ	MILHO
C 6:0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0
C 8:0	0	0	0	5,3	4,7	0	0	0	0	0
C10:0	0,1	0	0	5,9	3,8	0	0	0	0	0
C12:0	0	0	0	44,3	44,5	0	0	0	0	0
C13:0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C14:0	0	0,6	0	15,8	14,1	0	0,1	0	0,08	0
C15:0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C16:0	4,2	15	3,7	8,6	8,4	9,7	19,3	3,9	12,25	11,5
C16:1	0,3	0,3	0	0	0	0	0,2	0	0	0,2
C16:2	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0
C17:0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C17:1	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1
C18:0	2	8	0,42	2,9	2,8	5,4	0,7	2,8	0,13	1,9
C18:1	60	36,8	82,08	15,1	18,1	38,37	15,9	13,7	18,06	26,5
C18:2	20,5	39	13,19	1,7	2,9	46,1	50,9	12,5	68,79	58,5
C18:3	9,4	0	0,28	0	0,2	0,07	12,3	67,1	0,69	0,6
C20:0	0,7	0,3	0,33	0	0,4	0,36	0,2	0	0	0,3
C20:1	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1
C20:2	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C20:4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C20:5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C22:0	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1
C22:1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1
C22:2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C22:5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C22:6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C24:0	0,1	0	0	0	0,1	0	0,2	0	0	0,1
C24:1	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3.4.1. Óleos

Os óleos usados na mistura sintética, óleo de palma e óleo de peixe, foram adquiridos na empresa Campestre (São Bernardo do Campo - SP). O óleo de coco babaçu foi doado pela empresa COPRA (Sumaré-SP).

3.4.2. Estudo da reação de transesterificação

Nesta etapa, fez-se um estudo das variáveis da reação de transesterificação com o objetivo de observar o comportamento do óleo sintético.

3.4.2.1. Estudo da catálise da reação

Duas catálises foram estudadas: a catálise ácida, usando ácido sulfúrico (99,9%), e a catálise básica, usando hidróxido de sódio (99,8%). Fez-se um estudo da cinética da reação em 72 horas de reação nas condições mostradas na Tabela 3.10.

Tabela 3.10. Condições de operação da reação de transesterificação

Catálise	Temperatura (°C)	Relação óleo:álcool	Catalisador (%)	Álcool
Ácida	70	1:35	5,5	Etanol e Metanol
Básica	60	1:10	1	Etanol

3.4.2.1.1. Catálise básica

Quando é realizada esta catálise, várias etapas anteriores à reação de transesterificação precisam ser acrescentadas ao processo para preparação da matéria prima. Esta catálise, geralmente, é realizada em óleos que apresentam baixa porcentagem de ácidos graxos livres (AGL), já que estes são prejudiciais para a reação de transesterificação.

Primeiramente, foi feita uma reação de neutralização, a qual é uma reação entre um ácido graxo livre e uma base (NaOH) que se faz em meio aquoso. Esta reação tem como produtos: sais de ácidos graxos (sabões) e água. A reação que ocorre está mostrada na Figura 3.25. Após a reação de neutralização, os sabões produzidos são retirados do óleo por meio de uma centrifugação a 3300 rpm, durante 1 hora; após este procedimento, o óleo é lavado para retirar as impurezas que ficaram e, finalmente, a água de lavagem, é retirada por decantação. As etapas necessárias para a preparação da matéria prima são mostradas na Figura 3.26.

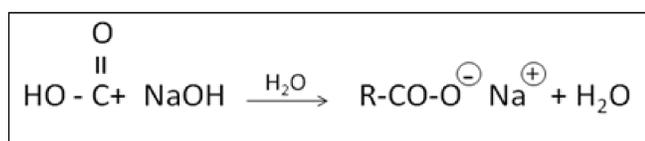


Figura 3. 25. Reação de neutralização



Figura 3. 26. Etapas de preparação da matéria prima

Nesta operação, usou-se um reator em vidro com jaqueta de capacidade 50 mL com agitação magnética. O reator é mostrado na Figura 3.27. Na montagem, foi usado um condensador para recircular o excesso do álcool e dois banhos térmicos, para controle da temperatura de reação e do sistema de condensação.

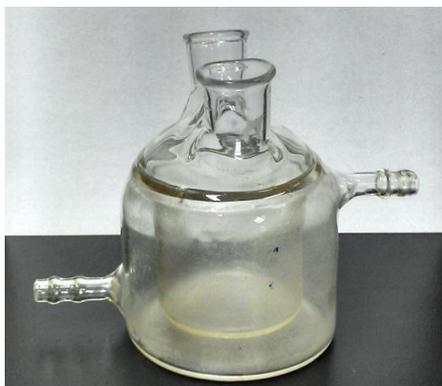


Figura 3. 27. Reator Batch de 50 mL

3.4.2.1.1. Catálise ácida

Na catálise ácida foi realizado um estudo do álcool usado para a reação. Dois alcoóis foram estudados, os quais são os mais usados industrialmente, o etanol e o metanol.

A transesterificação foi feita em um reator batelada com condensador para refluxo do excesso de álcool e aquecimento por meio de jaqueta, como mostrado na Figura 3.28. As reações foram conduzidas durante 72 horas. Com o objetivo de monitorar a produção dos ésteres e glicerol e os consumos dos tri, di e monoacilgliceróis, vários pontos foram tomados durante o transcurso da reação: 10, 20 e 30 min., 1, 2, 4, 6, 17, 21, 25, 27, 42, 44, 48, 65, 69 e 72 horas.



Figura 3. 28. Estudo do álcool na reação de transesterificação ácida

3.4.3. Planejamento de experimentos

Esta etapa é importante para conseguir entender os fenômenos que ocorrem na reação de transesterificação. Pela experiência em produção de biodiesel e pela literatura, quatro variáveis são as mais importantes para este tipo de processo: temperatura, porcentagem de catalisador, relação molar óleo:álcool e tempo de reação.

É de suma importância escolher o planejamento adequado para o estudo das variáveis. Por isto, inicialmente, se fez um planejamento fracionado de resolução IV, com o objetivo de calcular os efeitos principais e a indicação das variáveis que deviam ser incluídas nos seguintes delineamentos e novas faixas a serem estudadas. A partir dos resultados desse planejamento preliminar, conseguiu-se eliminar algumas variáveis e partir para o seguinte planejamento fatorial completo. A seguir, são descritos os dois planejamentos:

3.4.3.1. Planejamento fracionado resolução IV

Com o desenvolvimento deste planejamento é possível conhecer quais variáveis têm maior influência no processo. Neste planejamento foram estudadas e avaliadas os efeitos das quatro variáveis que mais influenciam na produção de biodiesel: porcentagem de catalisador, temperatura, relação óleo:álcool e o tempo de reação. A variável dependente analisada é a conversão de ésteres etílicos, e o objetivo é que esta conversão seja alta. Implicitamente, o que se quer é que todos os TG, DG, e MG sejam gastos. Na Tabela 3.11 são mostradas as variáveis e os níveis nos quais foram estudadas. No total, foram realizados 9 ensaios nos níveis mostrados na Tabela 3.12.

Tabela 3. 11. Níveis planejamento fracionado resolução IV

Variável	- 1	0	+ 1
Catalisador (%)	1,8	3,05	4,3
Temperatura (°C)	55	70	85
Relação óleo:álcool	22,5	35	47,5
Tempo (horas)	6,4	12,3	18,2

Tabela 3. 12. Níveis das variáveis

Variável	Temperatura	Tempo	Catalisador	óleo:álcool
Ensaio 1	-1	-1	-1	-1
Ensaio 2	1	-1	-1	1
Ensaio 3	-1	1	-1	1
Ensaio 4	1	1	-1	-1
Ensaio 5	-1	-1	1	1
Ensaio 6	1	-1	1	-1
Ensaio 7	-1	1	1	-1
Ensaio 8	1	1	1	1
Ensaio 9 (C)	0	0	0	0

3.4.3.2. Planejamento fatorial completo 2²

A partir dos resultados do planejamento anterior se eliminaram duas variáveis, temperatura e relação molar óleo:álcool, cujos efeitos não foram significativos. Partiu-se, então, para o estudo de duas variáveis do processo de produção de biodiesel. O planejamento usado foi o planejamento fatorial completo com pontos estrela. As variáveis a serem estudadas foram: porcentagem de catalisador e o tempo da reação. Os níveis usados são mostrados na Tabela

3.13. Foram realizados 8 ensaios com 3 pontos centrais com o objetivo de calcular o erro dos experimentos. Estes são mostrados na Tabela 3.14.

Tabela 3. 13. Níveis planejamento estrela

Variável	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
Catalisador (%)	0,34	2	6	10	11,66
Tempo (horas)	7,10	10	17	24	26,90

Tabela 3. 14. Níveis das variáveis

Variável	Catalisador	Tempo
Ensaio 1	-1	-1
Ensaio 2	1	-1
Ensaio 3	-1	1
Ensaio 4	1	1
Ensaio 5	-1,41	0
Ensaio 6	1,41	0
Ensaio 7	0	-1,41
Ensaio 8	0	1,41
Ensaio 9 (C)	0	0
Ensaio 10 (C)	0	0
Ensaio 11 (C)	0	0

Os planejamentos foram feitos em uma bateria de cinco reatores com jaqueta de capacidade de 250 mL. Esta bateria de reatores, mostrada na Figura 3.29, contém um controle de temperatura e de agitação magnética.



Figura 3. 29. Bateria de reatores

3.5. MÉTODOS

A seguir, são detalhados os métodos usados para a caracterização e análise dos resultados tanto do óleo de microalga, quanto do óleo sintético.

3.5.1. Determinação do teor de ácidos graxos livres

A determinação do teor de ácidos graxos livres (AGL) presentes nos óleos foi feita pelo método oficial da AOCS *Official Method* Ca 5a-40 (AOCS, 1997). Este método é utilizado para determinar os ácidos graxos livres em óleos brutos ou refinados de origem vegetal, marinhos e animais.

3.5.2. Composição em ácidos graxos

A identificação dos ácidos graxos foi realizada a partir da esterificação dos ácidos graxos; estes foram determinados quantitativamente por cromatografia gasosa capilar (CG capilar) seguindo o método AOCS Ce-266 (AOCS, 1997) e (HARTMANN E LAGO, 1973). Esta análise

foi feita no Laboratório de Óleos e Gorduras, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

3.5.3. Quantificação dos TG, DG, MG, ésteres e GL

A obtenção dos ésteres foi por meio de uma reação de transesterificação do óleo. A determinação e quantificação dos triacilgliceróis (TG), diacilgliceróis (DG), monoacilgliceróis (MG), ésteres (E) e glicerina (GL), foi feita por cromatografia de permeação em gel (CPG). Usou-se um cromatógrafo CG Viscotek TODA 302 triple detector Array, mostrado na Figura 3.30. O detector usado para a análise foi de índice de refração. O sistema montado consistiu em duas colunas de permeação em gel em serie da Phenogel 5 de 100 e 50 angstroms. A temperatura da análise foi de 40°C, um fluxo de fase móvel (tetrahydrofurano) de 0,7 mL/min e um tempo de análise de 35 minutos. A preparação da amostra consistiu na diluição de 100 mg de amostra em 10 ml do solvente THF (tetrahydrofurano). Nestas condições foi possível detectar os TG, DG, MG, E e GL como mostrado na Figura 3.31. A identificação dos componentes, foi feita por comparação com o tempo de retenção dos padrões da Sigma-Aldrich.



Figura 3.30. Cromatógrafo CPG Viscotek TDA 302

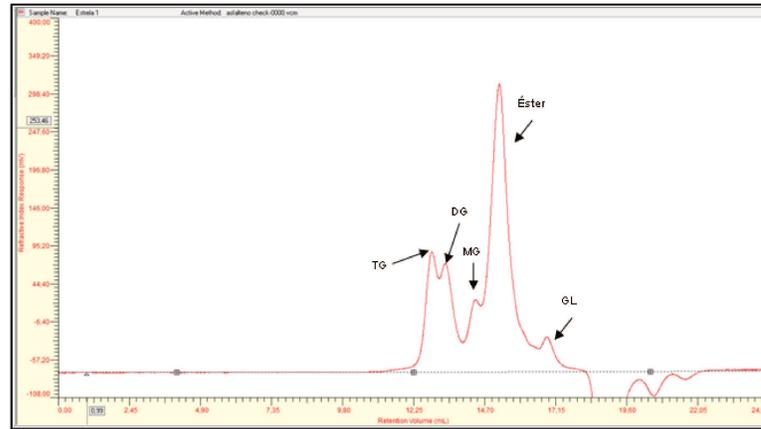


Figura 3.31. Cromatograma típico de uma amostra de biodiesel obtido no GPC Viscotek TODA 302

3.5.4. Estabilidade do óleo sintético

A estabilidade da mistura de óleo sintético foi estudada pela técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura, também conhecida como Calorimetria Exploratória Diferencial, em inglês *Differential Scanning Calorimetry* (DSC). As análises foram feitas em um equipamento modelo 2920 Modulated DSC (TA instruments), mostrado na Figura 3.32. As amostras do óleo, pesando de 10 a 15 mg, foram submetidas a uma programação de aquecimento com taxa de 10 °C/min, no intervalo de temperatura de 25 a 550°C, sob uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Estas medições foram realizadas a pressão atmosférica.



Figura 3.32. Equipamento modelo 2920 Modulated DSC da TA instruments

3.6.CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo foi apresentada detalhadamente a metodologia usada. A metodologia foi dividida em duas grandes fases, primeiramente foi detalhado o estudo do crescimento da microalga em cultivo autotófico, heterotrófico e mixotrófico e, a seguir, foi detalhada a metodologia para o óleo sintético. Foram apresentados os materiais e métodos que foram usados em cada etapa no desenvolvimento do trabalho de tese. Diversas técnicas de análise foram estudadas, aumentando o conhecimento nesta área. Também foram mostrados os equipamentos usados e a metodologia desenvolvida em cada um deles.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo mostra os resultados obtidos e foi dividido em quatro itens. Primeiramente, são mostrados os resultados obtidos no estudo do crescimento autotrófico da microalga *Desmodesmus* sp. Na sequência, são detalhados os resultados obtidos no crescimento heterotrófico, seguido dos resultados obtidos no crescimento mixotrófico e a comparação dos três sistemas de cultivo e, por fim, são mostrados os resultados dos experimentos realizados com o óleo sintético.

4.1. CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO DA MICROALGA *Desmodesmus* sp.

As células da microalga *Desmodesmus* sp. foram medidas pelo Microscópio Ótico (MO) em duas ampliações, como pode ser observado na Figura 4.1. Nesta análise, foi realizada a medição do tamanho das células. Trinta células foram medidas e se fez uma média, dando como resultado 6,25 μm de comprimento.

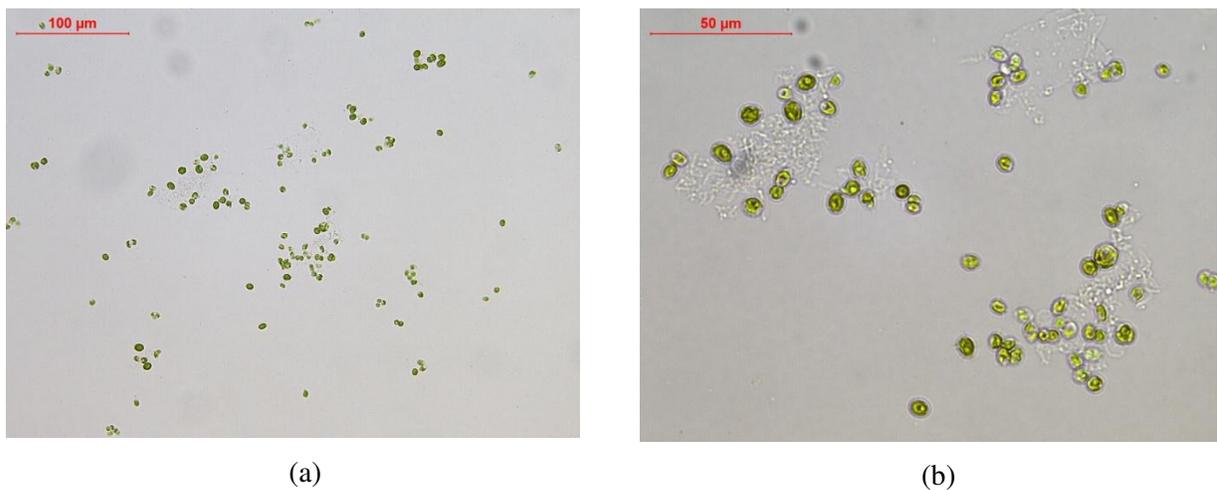


Figura 4. 1. Análise MO da microalga *Desmodesmus* sp. (a) ampliação 200x, (b) ampliação 500x

Na Figura 4.2 pode-se observar a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Esta análise foi realizada a partir da biomassa seca.

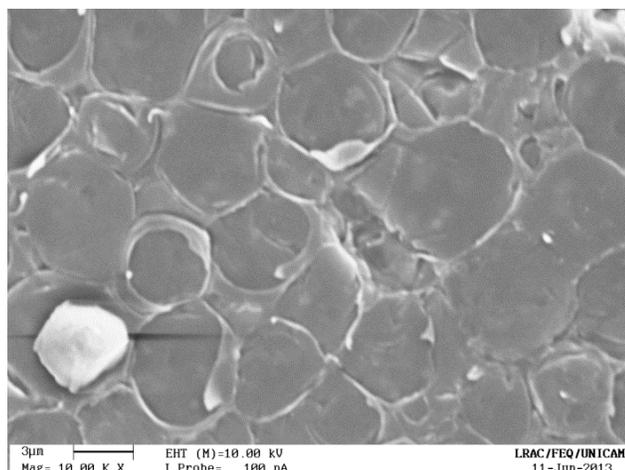


Figura 4. 2. Análise MEV da microalga *Desmodesmus* sp.

Estas duas análises foram feitas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

4.1.1. Crescimento

A fim de produzir grande quantidade de biomassa, o crescimento foi feito em tanques plásticos abertos de 200 e 500 L. Este crescimento foi realizado pelo Grupo Integrado de Aquicultura e Meio Ambiente (GIA) na cidade de Curitiba. Foram estudados dois meios de cultivo para o crescimento da microalga: o Guillard f/2, rico em nitratos, fosfatos, metais e vitaminas e outro, no qual foram adicionados fosfato agrícola e uréia, que foi denominado f/2 + agrícola.

O crescimento foi monitorado durante 11 dias e medido por densidade celular (células/mL). As variáveis que foram controladas durante o crescimento foram: temperatura, pH, nutrientes e agitação. O crescimento é mostrado na Figura 4.3, onde no eixo y pode-se observar a concentração em milhões de células (Mcélulas) por mL do meio de cultivo. O meio com o qual se obteve maior crescimento celular foi o f/2 + agrícola e em tanques de 500 L, obtendo resultados de 1,8 Mcélulas/mL.

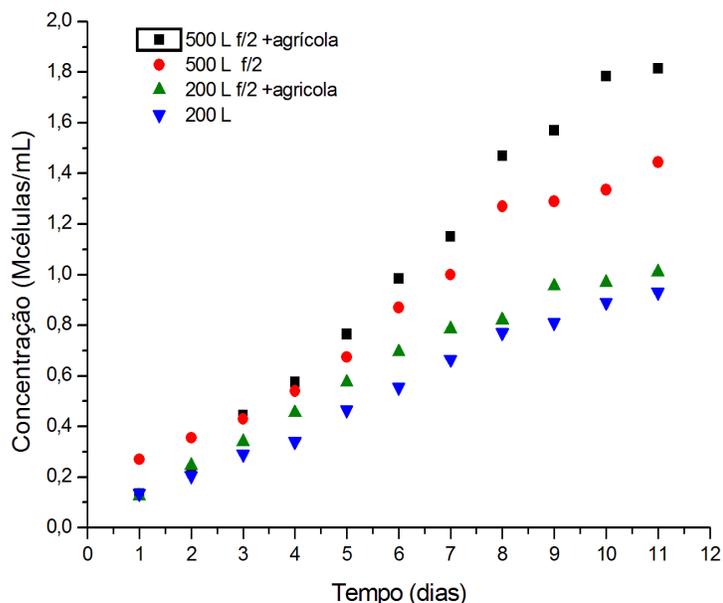


Figura 4. 3. Curva de crescimento em tanques abertos da microalga *Desmodesmus* sp.

Estes resultados foram poucos satisfatórios, apresentando pouca quantidade de biomassa e, por conseguinte, pouca quantidade de óleo na extração. Foi necessário, então, estudar mais a fundo o crescimento da microalga. Optou-se por pedir uma doação da espécie e começar o crescimento em escala laboratorial com o objetivo de aumentar o crescimento da microalga.

No laboratório LDPS estudou-se o crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. em um Erlenmeyer de 500 mL, com o meio de cultivo BG-11 nas seguintes condições: pH 7,5, temperatura média de 27°C e uma luminosidade de 62 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O inóculo inicial foi de 6,9 Mcélulas/mL.

A curva de crescimento da microalga mostrou um gráfico de crescimento populacional padrão que muitos chamam de curva S. Esta curva se caracteriza por possuir 4 fases definidas ao longo da curva: primeiramente tem uma fase de latência (fase *lag*), tempo no qual as células se adaptam ao meio de cultivo; a seguir, vem a fase exponencial da curva (fase *log*), onde as células começam se duplicar; após essa rápida duplicação vem a fase estacionaria, onde as células param de crescer, e, por último, tem-se a fase de morte. A Figura 4.4 mostra que, desde o início até o segundo dia do cultivo, tem-se um crescimento lento (fase *lag*). A partir do segundo dia e até o décimo dia, o crescimento se acelera, iniciando a fase exponencial (fase *log*). Para conseguir uma

maior reprodução da microalga, no momento de começar um novo cultivo, recomenda-se tirar o inóculo dentro da fase exponencial, já que ainda têm dias para se dividir, e, portanto, consegue-se atingir maior número de células no cultivo. A ideia é nunca deixar o cultivo chegar à fase de morte, pois, as células não poderão se reproduzir novamente.

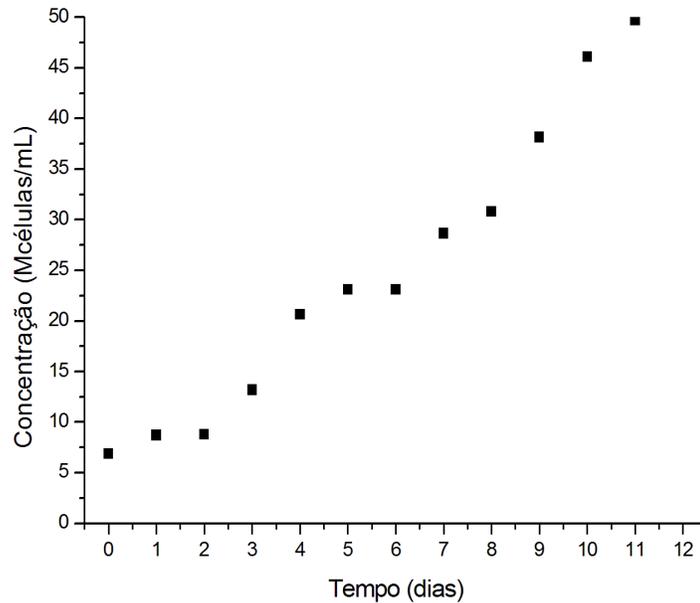


Figura 4. 4. Curva de crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. em meio BG-11

Para se ter certeza de que o meio de cultivo era eficiente para o crescimento foram testados dois meios de cultivo, o BG-11 e Guillard f/2 (cultivo que foi estudado no GIA). Foram comparados o crescimento da microalga em sete dias de cultivo, partindo da mesma quantidade de células em cada meio. Como resultado, se obteve o comportamento mostrado na Figura 4.5. Observa-se que o crescimento no meio BG-11 começa bem mais lento do que o meio Guillard f/2; no quarto dia atingem a mesma quantidade de células, mantendo-se até o quinto dia iguais, e depois, o cultivo BG-11 começa seu período de crescimento exponencial, ultrapassando o Guillard f/2, até que no sétimo dia ele atinge o máximo crescimento, chegando a valores nove vezes maiores do obtido pelo Guillard f/2.

A comparação, permite concluir que a microalga *Desmodesmus* sp. atinge um maior crescimento no cultivo BG-11, razão pela qual, o GIA não conseguiu obter grande quantidade de

células. Decidiu-se, então, continuar os experimentos com o meio de cultivo BG-11 o qual atinge crescimentos bem mais elevados.

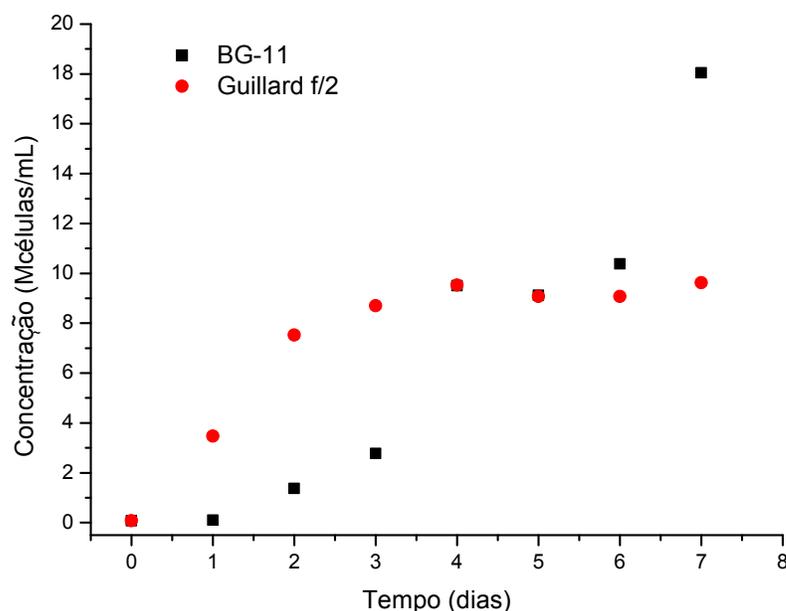


Figura 4. 5. Comparação do crescimento celular nos meios BG-11 e Guillard f/2

4.1.2. Extração de lipídios

A extração de lipídios foi feita pelo método Bligh & Dyer como detalhado no item 3.1.5.5. Esta extração mostrou resultados consistentes com a literatura. No meio BG-11, conseguiu-se uma porcentagem de 20% de lipídios e no meio Guillard f/2 a porcentagem foi de 19%, assim o meio não influenciou muito na porcentagem de lipídios na microalga. Com isto, os procedimentos a seguir foram feitos com o meio BG-11, que pelos resultados obtidos, mostrou, um crescimento maior e mais rápido e, também, uma porcentagem de lipídios ligeiramente maior.

4.1.3. Teor de ácidos graxos livres

A quantificação dos ácidos graxos livres foi realizada em triplicata pelo método mencionado no item 3.5.1, obtendo-se uma média de 4,3% de ácidos graxos livres.

4.1.4. Caracterização dos ácidos graxos

Na Tabela 4.1 é mostrada a simbologia e o nome de cada ácido graxo e a composição dos ácidos graxos da microalga *Desmodesmus* sp. Pode-se ver que o óleo apresenta uma quantidade majoritária de ácido mirístico (30,27%) e ácido palmítico (45,27%). Uma das principais características dos óleos de microalgas é que eles contêm ácidos graxos mais pesados, comparado com os óleos vegetais; na microalga, encontram-se ácidos graxos com até 24 carbonos. Comparando-se este resultado com os dados reportados no trabalho do Islam et al. (2013) e que foi mostrado na Tabela 2.8, pode se observar que o perfil de ácidos graxos das microalgas é bem diferente um do outro. Uma característica importante é que todas apresentam alta porcentagem do ácido palmítico, sendo que os demais ácidos diferem de espécie para espécie.

Tabela 4. 1. Perfil dos ácidos graxos da microalga *Desmodesmus* sp.

Ácido Graxo	Simbologia	Porcentagem (%)
Ácido Caprótico	C6:0	0,18
Ácido Caprílico	C8:0	0,32
Ácido Láurico	C12:0	0,32
Ácido Isomirístico	C13:0	1,61
Ácido Mirístico	C14:0	30,27
Ácido Pentadecanóico	C15:0	5,27
Ácido Palmítico	C16:0	45,27
Ácido Palmitoleico	C16:1	0,64
Ácido Margárico	C17:0	0,24
Ácido Esteárico	C18:0	0,31
Ácido Oléico	C18:1	3,97
Ácido Linoléico	C18:2	6,21
Ácido Linolênico	C18:3	1,39
Ácido Araquidônico	C20:4	3,81
Ácido Nervônico	C24:1	0,19

Assim, desta análise, tem-se que o total de ácidos graxos saturados é de 83,79%, os monoinsaturados de 4,8% e os polinsaturados de 11,41%. Isto implica num problema, já que essa distribuição dos ácidos graxos saturados e insaturados tem um efeito marcante sobre a estabilidade do biodiesel diante do armazenamento e da oxidação. Quedas bruscas na temperatura ambiente promovem o aumento da viscosidade e a cristalização de ésteres graxos saturados que, eventualmente, podem causar o entupimento de filtros de óleo e sistemas de injeção. Para minimizar este problema é possível diminuir o seu ponto de fluidez com a adição de inibidores de cristalização (RAMOS, et al., 2013). As instaurações de um ácido graxo ocasiona a redução de seu ponto de ebulição. Quanto maior o grau de instauração de um ácido graxo, menor será sua estabilidade à oxidação (DE ALMEIDA, 2007).

Na literatura encontra-se uma grande variedade de espécies do gênero *Desmodesmus* sp. A microalga deste trabalho não foi especificada em nenhuma espécie e, portanto, é difícil fazer as comparações. Vários autores mostram o perfil de ácidos graxos e, quando comparados, cinco ácidos graxos são os majoritários neste gênero. O óleo mostrou um perfil de ácidos graxos bem diferente do que se tem publicado na literatura. Isto acontece por várias razões. Esta cepa é nativa e ainda não se tem a espécie especificada, sendo difícil compará-la com as que são isoladas e com espécie identificada.

Na Tabela 4.2, pode-se observar uma comparação da porcentagem destes ácidos graxos majoritários no óleo proveniente do gênero *Desmodesmus* sp. de diferentes espécies estudadas por diferentes autores. A diferença no valor do ácido capróico comparado com as espécies da literatura foi bem significativo. Acredita-se que esta microalga, por ser nativa, apresenta características diferentes das cepas isoladas e com subgênero que são mostradas na tabela. É importante também mencionar que esta microalga foi, inicialmente identificada como *Scenedesmus* sp. mas, por possuir espinhos na sua células, estas microalgas emigraram para o gênero *Desmodemus* sp. (MORESCO E BUENO, 2007). O perfil da *Scenedesmusm* sp. estudada pelo Chan Yoo et al. (2010) mostra uma porcentagem de 36,3% C16:0, 25,9% C18:1 e 31,1% C18:2 o que também não concorda com o nosso perfil de ácidos graxos. Podemos concluir, então, que microalga utilizada neste trabalho tem um perfil diferente e precisa ser estudada mais a fundo para ser classificada.

Tabela 4. 2. Perfil dos ácidos graxos majoritários de várias linhagens do gênero*Desmodesmus* sp.

Espécie	C14:0	C16:0	C18:1	C18:2	C18:3	Referência
DRLMA7	0,9	22,2	19,6	6,3	24,3	(KAUR et al., 2012)
F1	-	25,37	36,15	16,41	7,71	(PAN et al., 2011)
F5	-	30,96	36,55	9,94	10,43	(PAN et al., 2011)
F44	-	26 ± 2	15 ± 2	30 ± 2	20 ± 2	(HO et al., 2013)
S1	-	17,08	44,81	7,99	9,38	(HU et al., 2013)
<i>Desmodesmus</i> sp.	30,27	45,27	3,97	6,21	1,39	Neste estudo

4.1.5. Estresse de nutrientes (Nitrogênio)

No estudo do estresse com nitrogênio, vários resultados foram obtidos pelo estudo tanto do comportamento da microalga *Desmodesmus* sp., quanto do crescimento celular e da porcentagem de lipídios.

4.1.5.1. Crescimento

Para o estudo do crescimento celular em deficiência de nitrogênio, inicialmente inoculou-se em meio BG-11. O cultivo foi retirado no sexto dia de crescimento, tempo no qual começa a fase exponencial, centrifugado e a biomassa foi lavada com água destilada três vezes. A biomassa úmida foi dividida em quatro partes iguais para que os cultivos tivessem a mesma quantidade inicial de células em média 3 Mcélulas/mL, permitindo posterior comparação. Cada parte foi, então, colocada com diferentes porcentagens de nitrogênio, modificando a quantidade de NaNO₃, contendo 0%, 25%, 50% e 100% deste composto. O experimento é mostrado na Figura 4.6, onde os quatro Erlenmeyer com concentrações diferentes de nitrogênio e inoculados foram colocados no banco de luzes para crescimento.



Figura 4. 6. Crescimento dos quatro cultivos com diferentes concentrações de Nitrogênio

O crescimento do cultivo foi monitorado por sete dias e a contagem foi feita por microscópio; os resultados do crescimento, nos quatro cultivos, são mostrados na Figura 4.7. Os cultivos comportaram-se bem diferente um do outro. O cultivo 0 N foi o cultivo que, inicialmente, cresceu mais rápido, mas depois do quarto dia de cultivo, teve seu crescimento reduzido, e no final foi o cultivo com menor crescimento dentre todos. Isto era de se esperar pois, sem nitrogênio suficiente, a célula não tem como se reproduzir. O cultivo 25 N e 100 N mostraram um crescimento similar, pouco crescimento atingindo valores de 15 e 18 Mcélulas/mL. Já o cultivo que conseguiu a maior quantidade de células foi obtida no meio de 50 N, atingindo até duas vezes mais do que nos outros meios.

Este comportamento de pouco crescimento celular era no cultivo de 0 N e 25 N, pois com o término de nitrogênio as células param de se reproduzir. Já não esperava-se que o cultivo 50N fosse atingir maior crescimento do que o 100N, por isto, estudou-se o crescimento no meio de 50N e comparou-se com o 100N. Foram iniciados e monitorados os cultivos com uma quantidade parecida de células durante 14 dias, estudo este que é mostrado na Figura 4.8. Como resultado, verificou-se um perfil de crescimento com grande semelhança, isto quer dizer que o cultivo BG-11 contém uma grande quantidade de nitrogênio, e isto é verificado nas proporções do NaNO_3 que é 750 mg/L, o que é bastante comparado com as proporções de nitrogênio de outros meios de cultivo, usado para crescimento de microalgas. Pode-se concluir, então, que é possível diminuir a quantidade de nitrogênio no meio em 50% que o crescimento não será tão afetado.

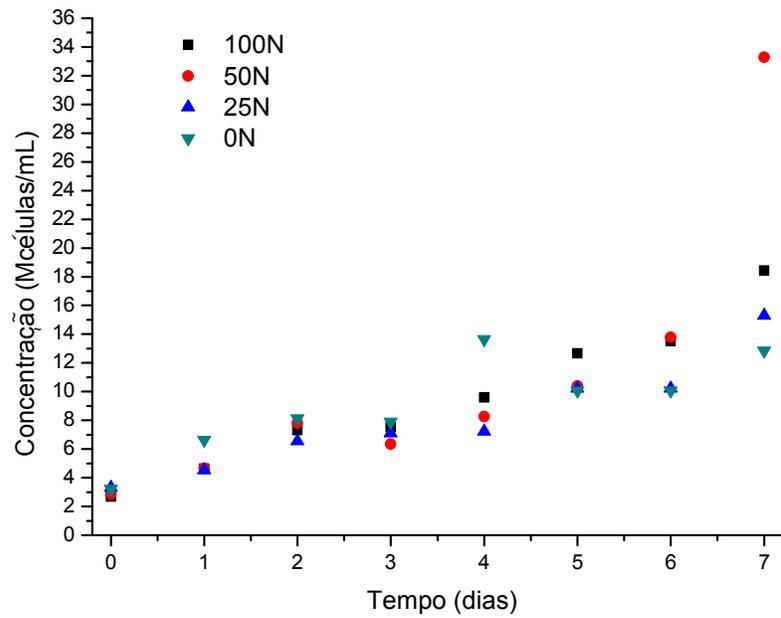


Figura 4.7. Crescimento celular nos quatro níveis de nitrogênio no meio de cultivo

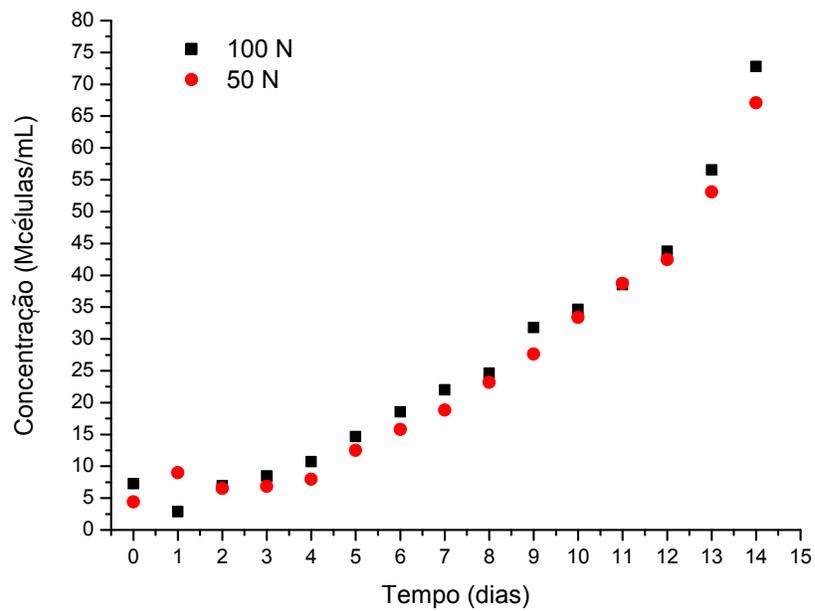


Figura 4. 8. Comparação do crescimento celular no meio 100 N e 50 N

A fim de observar se era o estresse que gerou esse aumento no crescimento, no sexto dia de crescimento no cultivo 100 N, a biomassa foi retirada do meio, lavada e centrifugada. Dois cultivos novos, com 50N e 100 N foram monitorados e as células contadas por microscópio durante seis dias. Na Figura 4.9 é comparado o crescimento do cultivo quando é retirado do BG-11 sem modificações e colocado em deficiência de 50 N, denotado no gráfico como 100/50 N. Pode-se verificar pelo gráfico que este meio resulta em maiores crescimentos que aquele com deficiência de 50 N.

Verificou-se, portanto, maiores crescimentos com o estresse de nitrogênio em 50 N, porém a diferença no crescimento foi muito pequena, de apenas 1 Mcélulas/mL, dessa forma, não vale a pena modificar o meio para aumentar o crescimento. Continuou-se trabalhando com o BG-11 sem modificações.

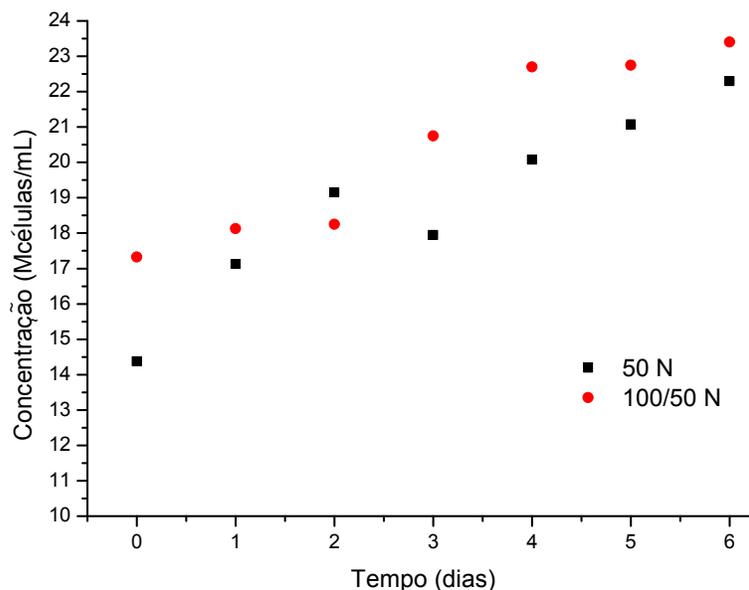


Figura 4. 9. Comparação do crescimento celular do meio 50N e do meio 100/50 N

Neste mesmo estudo de deficiência de nitrogênio, avaliou-se o comportamento do teor de lipídios nesta deficiência. A seguir os resultados são apresentados.

4.1.5.2. Teor de lipídios

Este estudo foi realizado por dois métodos qualitativos. O primeiro estudo foi por fluorimetria e o segundo por FT-IR. A seguir, são detalhados os resultados obtidos em cada uma das análises.

4.1.5.2.1. Fluorimetria

Nesta análise observou-se qualitativamente o aumento de lipídios e clorofila na mesma análise, como foi dito e explicado no item 3.1.5.6.1. Foram estudados os sete dias de cultivo, nos diferentes níveis de nitrogênio. Gráficos com os resultados dos quatro cultivos por dia são mostrados nas figuras 4.10 até 4.17, os quais foram identificados em cores diferentes. Estes gráficos mostram o espectro de emissão, a parte do espectro de excitação (515 nm) foi retirada da figura por tem um sinal muito alto.

A Figura 4.10 mostra o comportamento nos quatro cultivos no dia inicial do cultivo. Neste gráfico, pode-se observar que não existe teor de lipídios significativo em nenhum dos níveis de nitrogênio. Somente aparece o pico da clorofila mostrando que, para o cultivo 25N, a clorofila é bem mais representativa do que os outros cultivos.

No primeiro dia de cultivo dos quatro meios, mostrado na Figura 4.11, pode-se observar um aumento dos lipídios no meio 0N, quando comparado com os outros meios. No segundo dia, o perfil dos gráficos mudou bastante, mostrando um aumento significativo dos lipídios em todas as porcentagens de nitrogênio do meio. Neste gráfico (Figura 4.12) destaca-se o aumento de lipídios no cultivo 25N.

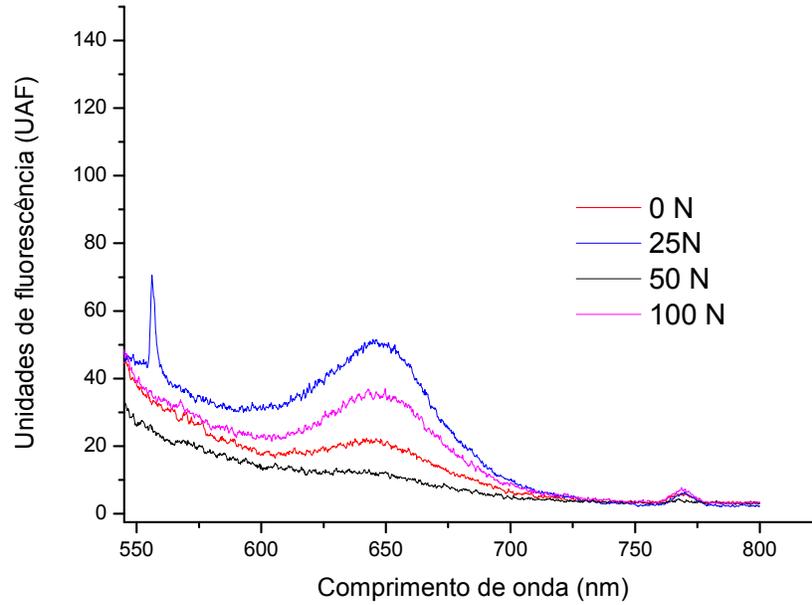


Figura 4. 10. Comparação dos espectros de emissão no início dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.

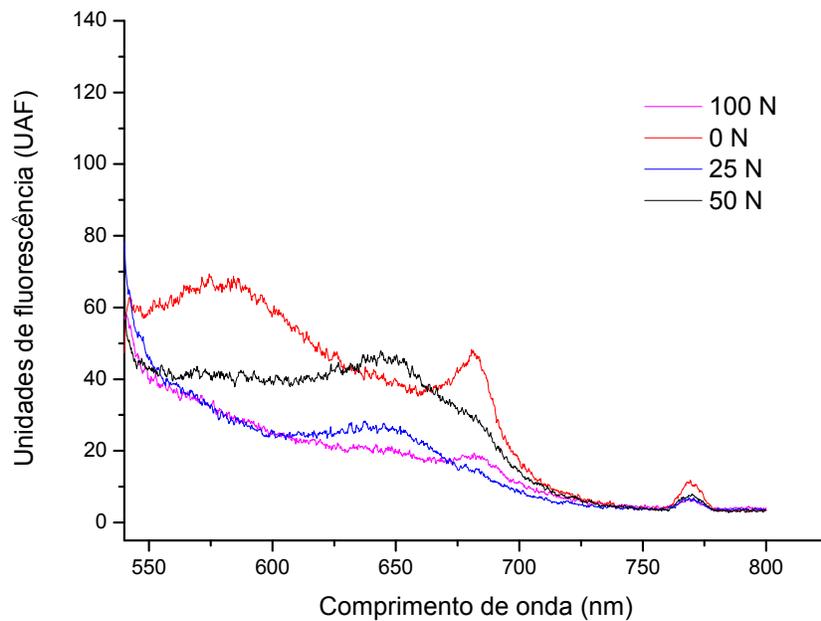


Figura 4. 11. Comparação dos espectros de emissão no primeiro dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.

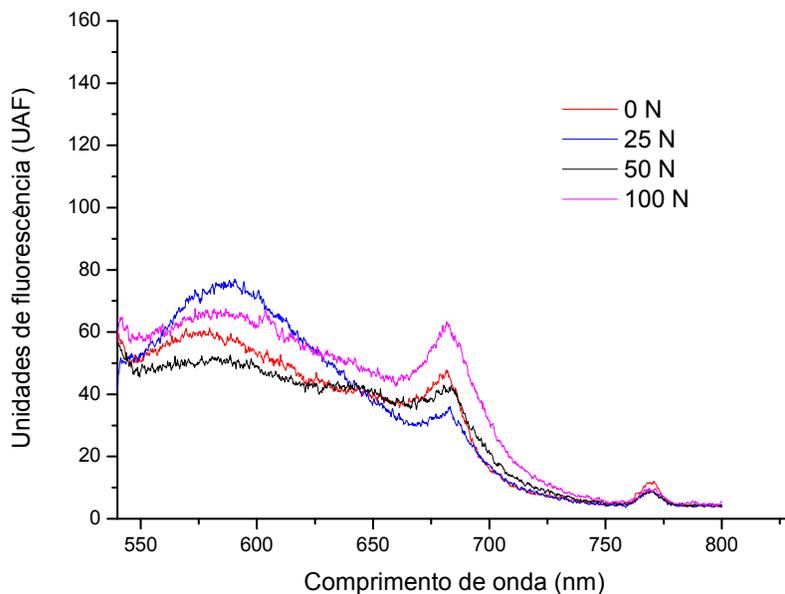


Figura 4. 12. Comparação dos espectros de emissão no segundo dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.

No terceiro dia, mostrado na Figura 4.13, não se observa qualquer mudança e os cultivos mostraram pouco sinal nos lipídios. Neste dia, 100 N é o mais significativo em teor de lipídios e 0 N em clorofila.

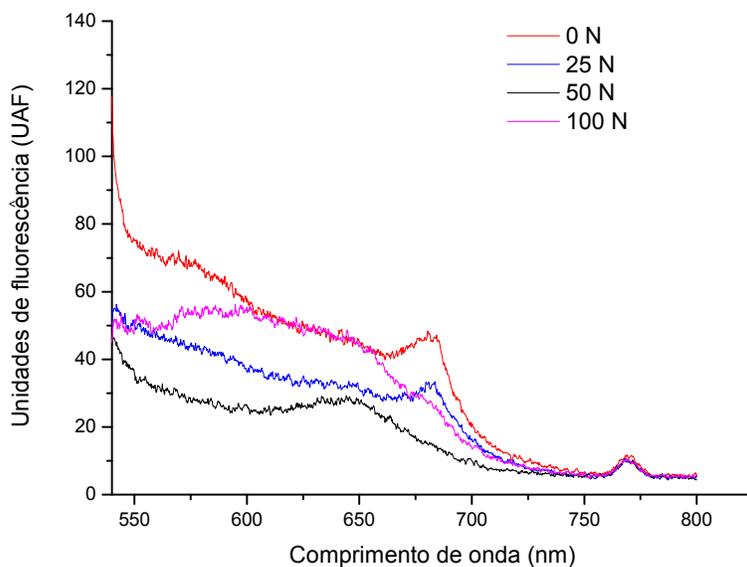


Figura 4. 13. Comparação dos espectros de emissão no terceiro dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.

No quarto dia, o aumento dos lipídios para o cultivo com zero nitrogênio, foi bastante significativo, ultrapassando a porcentagem dos outros cultivos. Também, pode-se verificar que a clorofila é bem maior nos outros cultivos; isto era de se esperar, já que o crescimento de células foi bem maior nos outros cultivos. Estes resultados podem ser vistos na Figura 4.14.

Na Figura 4.15 pode ser observado que no quinto dia deste cultivo, o aumento dos lipídios acontece com 100% de nitrogênio (BG-11 sem modificações).

As curvas do sexto dia de cultivo são mostradas na Figura 4.16. Neste gráfico pode-se ver o aumento dos lipídios no cultivo com 50% de nitrogênio.

No último dia de cultivo (sétimo dia) não se observa qualquer mudança significativa de aumento dos lipídios, mas sim um aumento na clorofila.

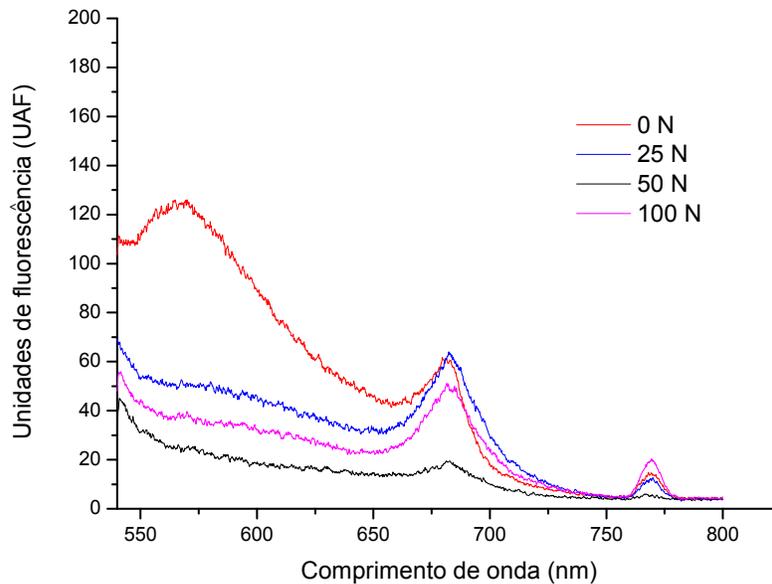


Figura 4. 14. Comparação dos espectros de emissão no quarto dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.

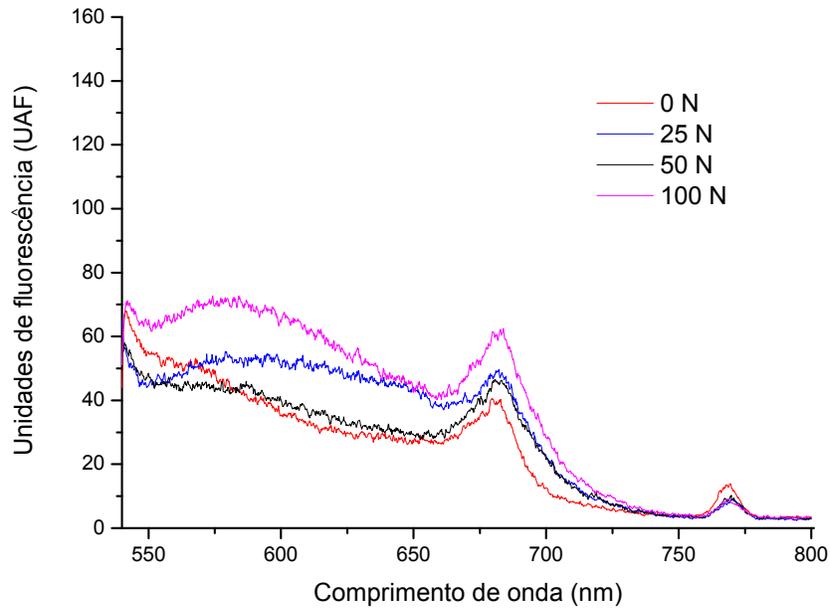


Figura 4. 15. Comparação dos espectros de emissão no quinto dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.

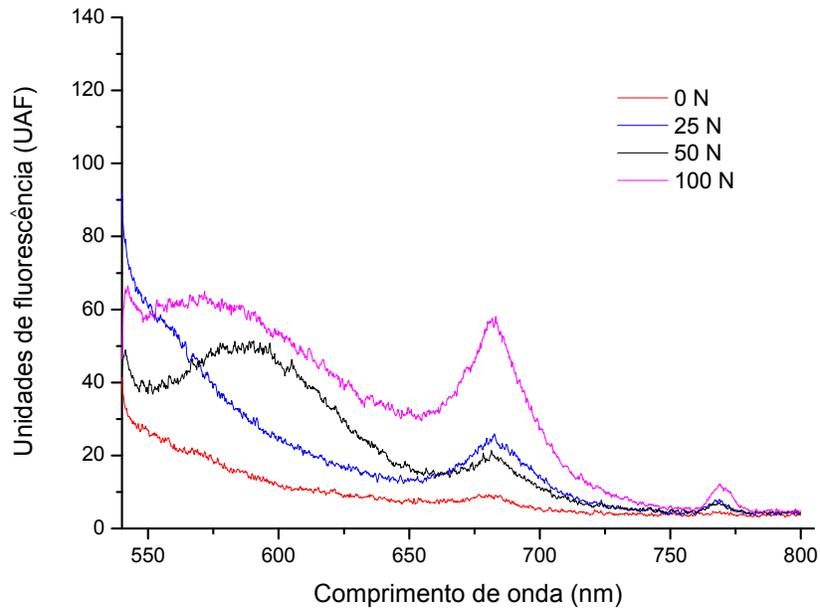


Figura 4. 16. Comparação dos espectros de emissão no sexto dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.

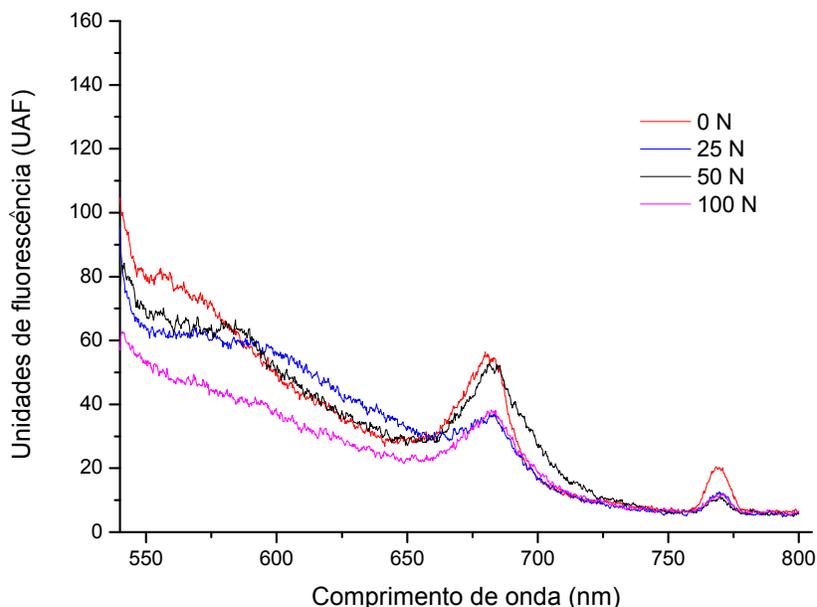


Figura 4. 17. Comparação dos espectros de emissão no sétimo dia dos cultivos nos diferentes níveis de nitrogênio.

Depois de fazer este estudo, pode-se concluir que a microalga *Desmodesmus* sp. consegue acumular lipídios quando submetida ao estresse de nitrogênio, atingindo seu máximo teor no quarto dia de estresse total de nitrogênio.

4.1.5.2.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Esta análise foi feita para o segundo, quarto e sétimo dias de cultivo. Com esta análise foi possível identificar as bandas da ligação de amidas, identificadas como proteína, e as ligações C=O, identificadas como lipídios. Os resultados podem ser observados na Figura 4.19. Neste gráfico, pode-se ressaltar que o pico da ligação C-N desaparece nos cultivos de 0% de nitrogênio, o que era de se esperar, e diminui enquanto os dias de cultivo passam. Esta análise foi realizada com o objetivo de identificar as bandas da proteína, carboidrato, lipídios e consumo de nitrogênio. Foi usada pois permitia a análise em biomassa seca. Esta análise foi simplesmente qualitativa, pois para quantificar o método é bem rigoroso.

4.1.5.1. Extração e quantificação de lipídios

A extração dos lipídios nos quatro cultivos foi realizada pelo método Bligh & Dyer (1959) detalhado no item 3.1.5.5, e foi realizada no último dia de crescimento (sétimo dia). Os cultivos foram retirados e a biomassa separada por centrifugação. A biomassa foi levada para secagem em estufa durante 24 horas a 105°C. A biomassa seca de cada cultivo é mostrada na Figura 4.18.

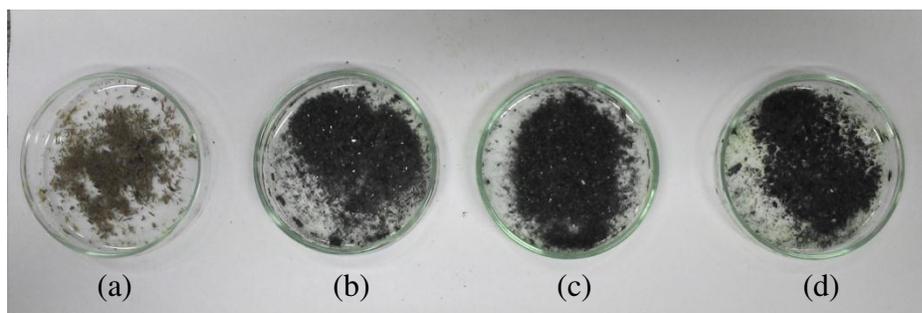


Figura 4. 18. Biomassa seca do cultivo (a) 0%N, (b) 25%N, (c) %50N, (d) 100%N.

Para a extração, 50 mg da biomassa seca de cada cultivo foi colocada num tubo de ensaio de capacidade de 70 mL, como mostrado na Figura 4.20 (passo (1)). A seguir, foram adicionados 1,6 mL de água destilada, 4 mL de metanol e 2 mL de clorofórmio (passo (2)). Esta mistura foi colocada sob forte agitação em um vortex durante 30 minutos para garantir o contato dos solventes com a biomassa (passo (3)). Então, foram adicionados 2 mL de água destilada e 2 mL de clorofórmio e levado à agitação (passo (4)) durante 2 minutos (passo (5)). A emulsão foi separada por meio de centrifugação, após a qual foram obtidas três fases, como pode ser visto no passo (6) da Figura 4.20. A fase superior, metanólica, foi descartada. A fase intermediária é a proteína e a fase inferior é a fase de interesse, a orgânica, onde estão misturados os lipídios no clorofórmio. Por último, a fase orgânica (passo (7)) foi separada e o clorofórmio foi evaporado numa estufa a 150°C, obtendo-se, assim, os lipídios.

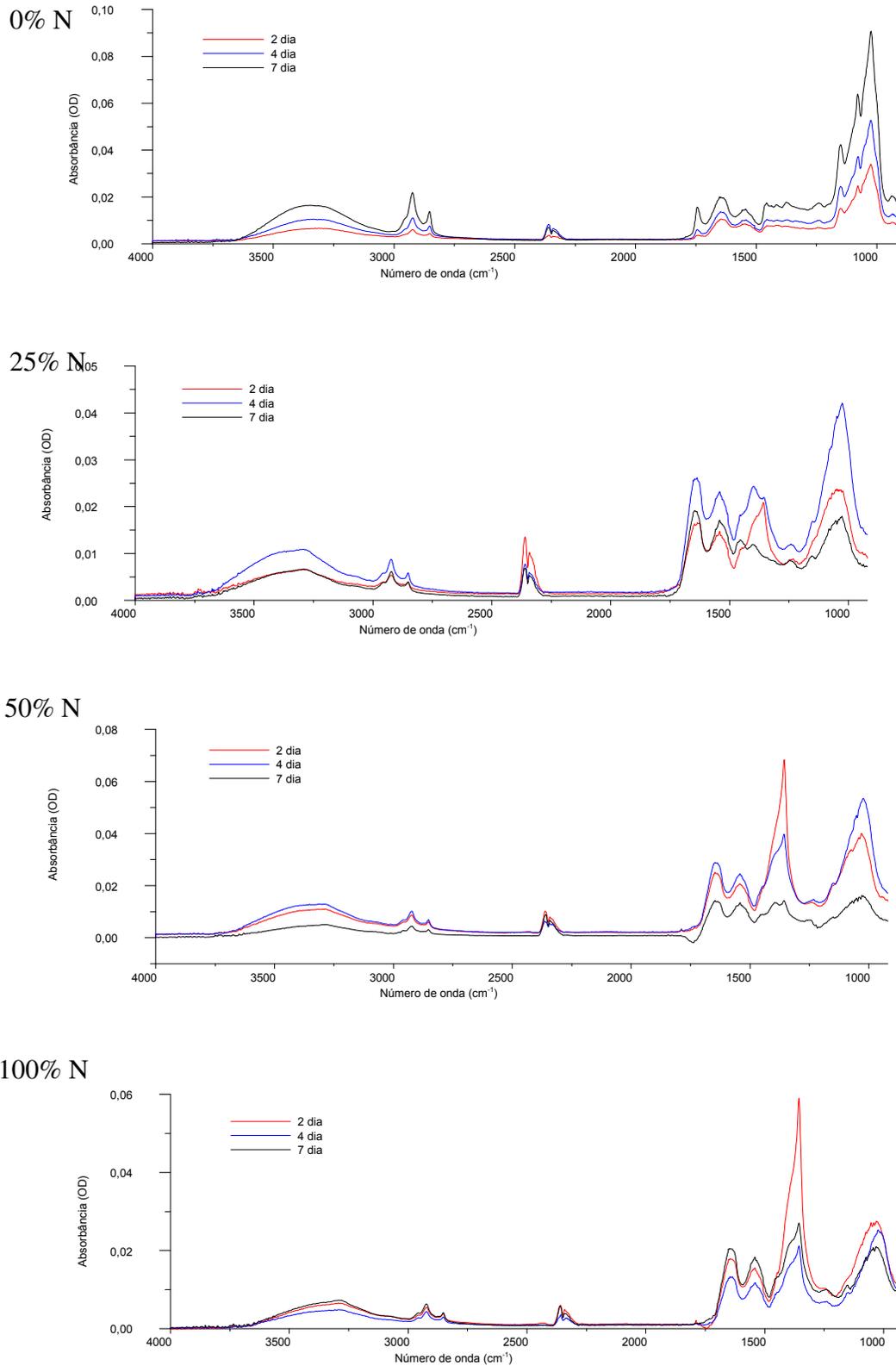


Figura 4. 19. Comparação do espectro do FT-IR da biomassa seca nos diferentes níveis de nitrogênio no segundo, quarto e sétimo dia de cultivo

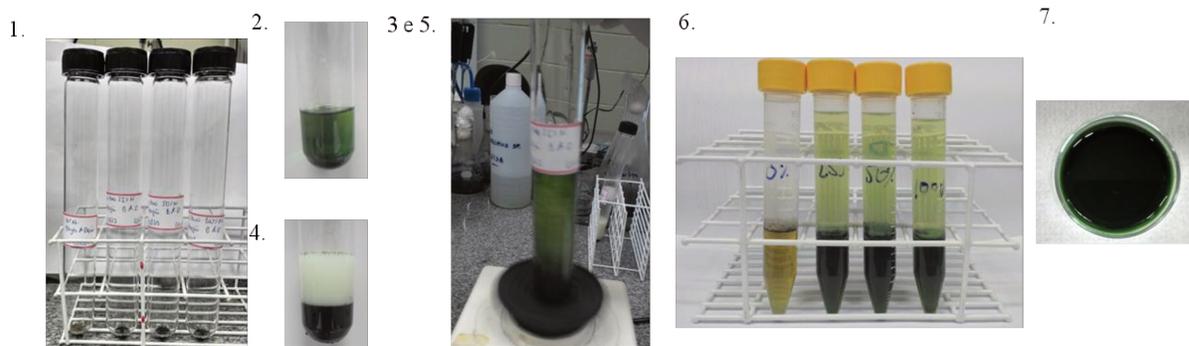


Figura 4. 20. Extração de lipídios nos quatro cultivos.

Após a secagem completa do clorofórmio (Figura 4.21), as amostras foram pesadas e calculou-se a porcentagem de lipídios. Os resultados são mostrados na Tabela 4.3. Embora não seja possível visualizar o meio com 0 N, criou-se uma camada muito fina com características de óleo cuja quantidade de lipídios é bem maior quando comparado com os outros meios.



Figura 4. 21. Lipídios nos quatro cultivos.

Tabela 4. 3. Porcentagem de lipídios nos quatro cultivos

Cultivo	Teor lipídios (%)
0% N	23
25% N	5,8
50% N	11
100% N	15

4.1.6. Quantificação da clorofila e carotenóides

Esta quantificação foi medida pelo método descrito no item 3.1.5.4. Estes pigmentos não são bons para a produção de biodiesel, mas possuem um valor comercial adicional. Foram medidos em duplicata depois de 14 dias de crescimento. A clorofila total teve um resultado de 20,02 µg/mL, sendo que, deste valor, 59% representa a clorofila-a, a qual é a principal constituinte nos organismos fotossintéticos (Ritchie, 2006). Este pigmento pode ser extraído por solventes orgânicos como acetona, metanol, etanol ou dimetilformamida, ou pelo processo de extração supercrítica (Hosikian et al., 2010). O teor de carotenóides na amostra foi de 4,75 µg/mL.

4.1.7. Crescimento em tanque de 30 L

Neste crescimento obtiveram-se 67,5 Mcélulas/mL em 20 L de meio de cultivo. Realizou-se a extração de lipídios alcançando um valor de 22% da biomassa.

4.2. CRESCIMENTO HETEROTRÓFICO DA MICROALGA *Desmodesmus* sp.

4.2.1. Crescimento em placas de Petri

Com este crescimento conseguiu-se observar a quantidade de bactérias que se tinha na cepa doada pela UFPR. Estas bactérias não influenciaram no crescimento autotrófico, mas para o crescimento heterotrófico, estas bactérias precisam ser diminuídas no cultivo, já que podem consumir a fonte de carbono (glicose) mais rápido do que a microalga, inibindo o crescimento desta.

4.2.1.1. Controle de bactérias

Foram identificadas várias bactérias dentro do meio, em maior quantidade foram encontrados cocos e bacilos. Dependendo do meio em que eram cultivadas, cresciam diferentes colônias de bactérias, e se distribuíam de maneira diferente, como mostrado na Figura 4.22.

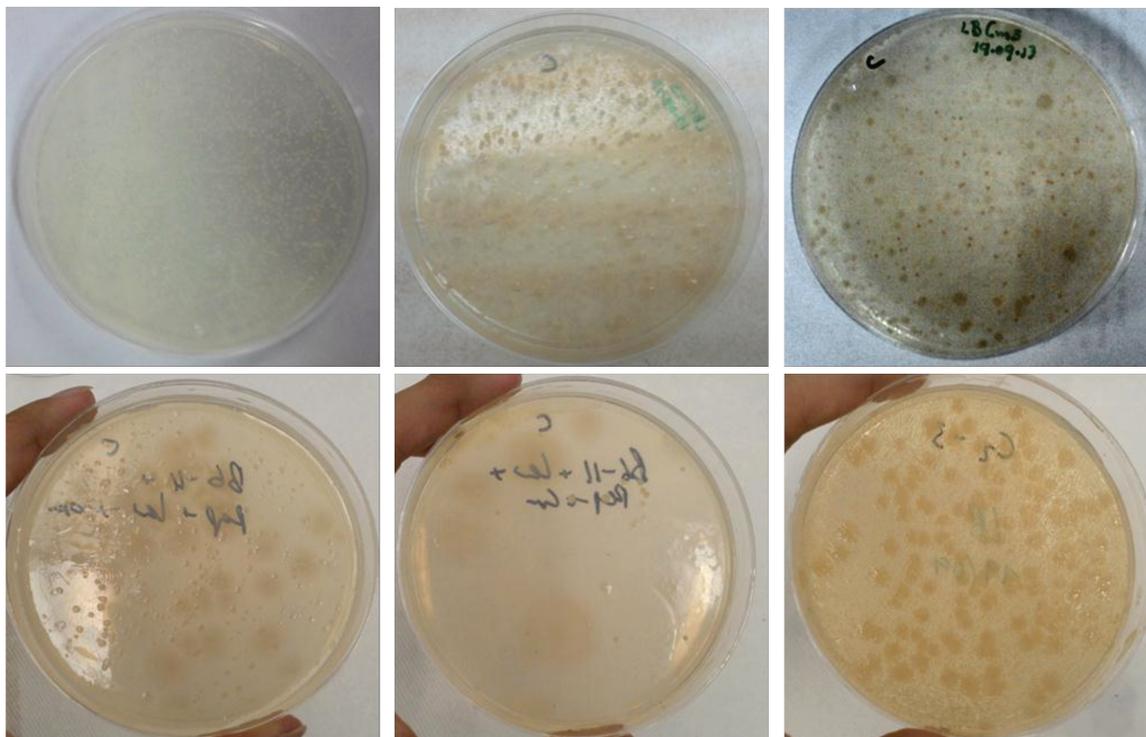


Figura 4. 22. Crescimento de bactérias em placas Petri

4.2.1.2. Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Cultivaram-se as diluições - 4 e - 5 em duplicata e foram contabilizadas as UFC. Na Figura 4.23 mostra-se como foram identificadas e contadas as bactérias, algumas destas foram marcadas nos círculos vermelhos. Nos resultados foram encontradas $3,1 \times 10^6$ UFC no meio de cultivo e no inóculo da *Desmodemus* sp.

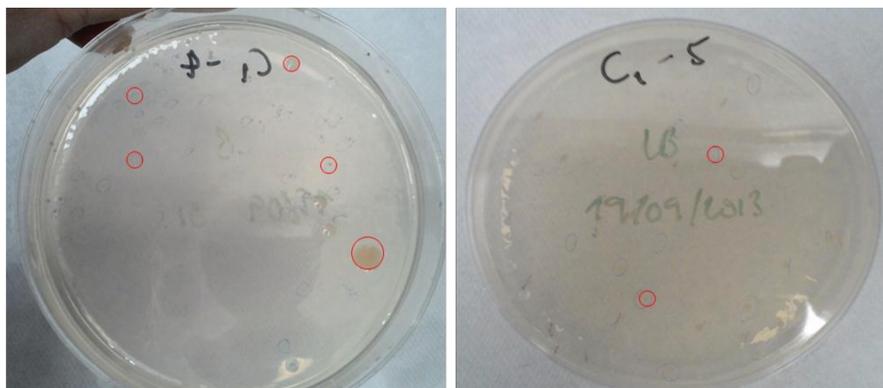


Figura 4. 23. Contagem de bactérias

4.2.1.3. Isolamento da cepa com antibióticos

Nesta etapa foi cultivado o inóculo durante quatro dias em placas de Petri no meio BG-11 com e sem glicose e com diferentes antibióticos. Vários testes foram feitos, inclusive realizou-se o cruzamento dos antibióticos, ou seja, no começo iniciou-se o cultivo com um antibiótico e depois de atingir o quarto dia de crescimento, se inoculou com um outro antibiótico, tentando acabar com a maior quantidade de bactérias. Os resultados dos antibióticos são mostrados na Tabela 4.4.

Tabela 4. 4. Resultados dos antibióticos

Antibiótico	Observação
Cm	Inibiu o crescimento da microalga
Km	Mostrou crescimento e diminuiu as bactérias
Cb	Crescimento de diferentes classes de bactérias
Amoxicilina/Acido Clavulânico	Não diminuíram as bactérias

O antibiótico que não inibiu o crescimento da microalga e conseguiu matar maior quantidade de bactérias foi a canamicina (Km).

4.2.1.4. Esgotamento por estrias

A partir da identificação do melhor antibiótico, cultivou-se o inóculo no meio BG-11 com glicose e Km em placas de Petri para tentar conseguir condições assépticas. A amostra que foi cultivada é aquela que se encontra no final das estrias, quer dizer a que se encontra mais asséptica no meio. Este estriamento é mostrado na Figura 4.24.

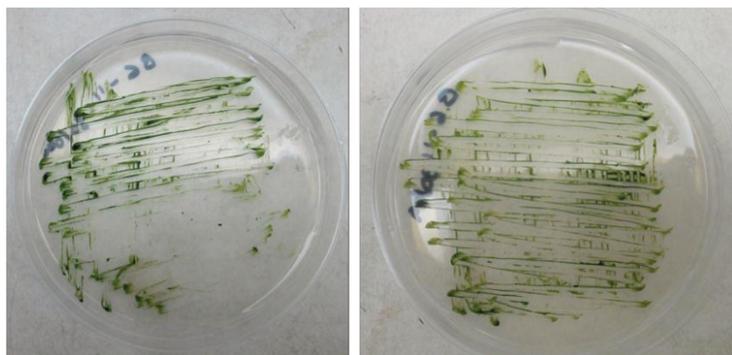


Figura 4. 24. Cultivo em estrias para o isolamento da microalga

4.2.2. Crescimento heterotrófico

Estudou-se o crescimento em condições heterotróficas. O inóculo foi proveniente de um cultivo autotrófico crescido durante 6 dias (fase exponencial). O cultivo foi realizado em duplicata e o gráfico do crescimento pode ser observado na Figura 4.25, onde H1 é cultivo heterotrófico (1) e o H2 é o cultivo em duplicata. O crescimento mostrou bastante semelhança, e pode-se observar que as células ainda estavam se duplicando. No sexto dia de crescimento atingiu-se em média 260 Mcélulas/mL no cultivo heterotrófico, o que é mais de 5 vezes a mais do que conseguiu-se no cultivo autotrófico. O cultivo foi retirado no sexto dia para conseguir inocular outro cultivo e tentar aumentar o crescimento mas como resultado, verificou-se que a microalga *Desmodesmus* sp. não consegue crescer em um cultivo inteiramente heterotrófico, o que significa que esta microalga precisa crescer em um cultivo autotrófico ou mixotrófico antes para, somente então, conseguir crescer heterotróficamente.

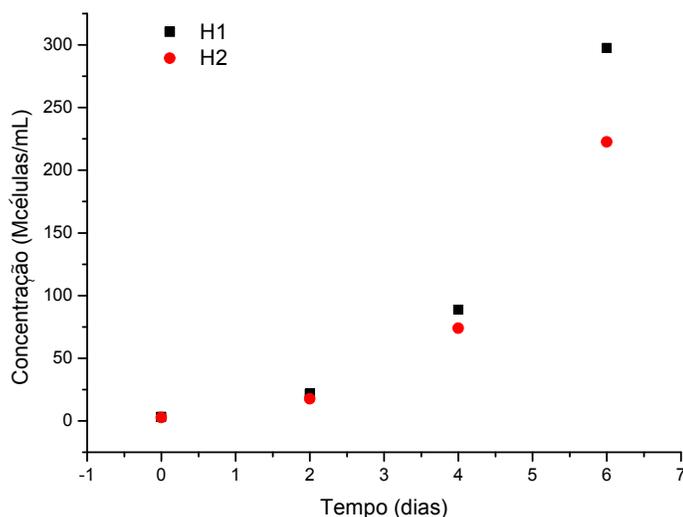


Figura 4. 25. Crescimento heterotrófico da microalga *Desmodesmus* sp.

4.2.2.1. Consumo de Glicose

O estudo do consumo de glicose mostrou que a microalga *Desmodesmus* sp. consome glicose e a usa para seu crescimento, como foi mostrado na Figura 4.25. Foram colocados 10 g/L iniciais de glicose no meio de cultivo e, como pode ser observado na Figura 4.26, a glicose não se esgotou. Isto quer dizer que foi colocada em excesso e a microalga não conseguiu consumir toda a concentração de glicose nesses 6 dias de crescimento, chegando em média até 4,45 g/L de glicose, o que corresponde a mais da metade do que tinha inicialmente.

4.2.2.1. Porcentagem de lipídios

A extração de lipídios mostrou um resultado em média de 17,26% da biomassa seca, isto quer dizer que este crescimento diminuiu a porcentagem de lipídios quando comparado com o cultivo autotrófico.

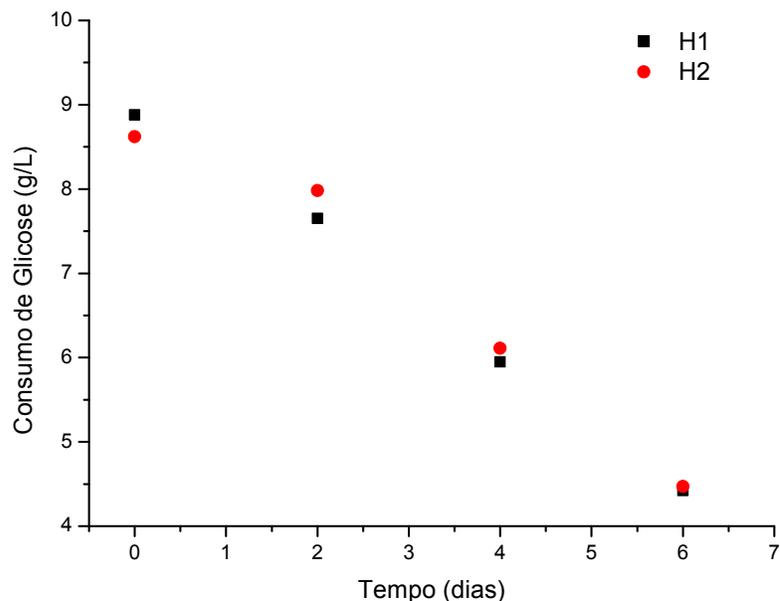


Figura 4. 26. Consumo de glicose cultivo heterotrófico.

4.2.3. Estresse de nutrientes (nitrogênio) no cultivo heterotrófico

Realizou-se o estudo do estresse de nitrogênio no cultivo heterotrófico com a finalidade de observar o comportamento no crescimento celular e na porcentagem de lipídios. Estes cultivos foram inoculados de um cultivo proveniente de um crescimento mixotrófico. 10% do volume do Erlenmeyer foi inoculado.

4.2.3.1. Crescimento

Estudou-se o crescimento em condições heterotróficas nos quatro níveis de nitrogênio. Os cultivos foram realizados em duplicata. A Figura 4.27 mostra o crescimento. Pode-se observar que os valores das duplicatas do cultivo 0 N apresentou bastante diferença entre eles mas, pelos dados, é possível detectar que o crescimento do cultivo 0 N2 era para ser maior no sétimo dia, e talvez tenha ocorrido um erro na contagem das células deste cultivo e, portanto, decidiu-se escolher como verdadeiro o crescimento do cultivo 0 N1. Os cultivos 25 N e 50 N mostraram

semelhança no crescimento, mas os cultivos que mostraram menor crescimento foi o de 100 N, bem diferente do que aconteceu no cultivo autotrófico. Como resultado, no cultivo heterotrófico consegue-se maiores crescimentos celulares quando a célula é estressada com deficiência de nitrogênio.

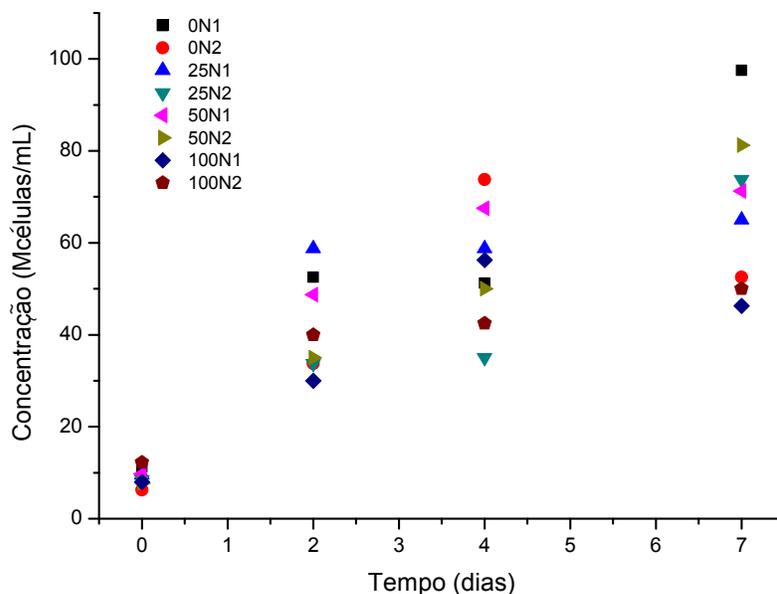


Figura 4. 27. Crescimento celular nas diferentes concentrações de nitrogênio

4.2.3.2. Consumo de glicose

O consumo de glicose nos diferentes cultivos pode ser observado na Figura 4.28 foi bem baixo quando comparado com o crescimento sem estresse de nitrogênio. No gráfico se observa que o cultivo que consumiu maior quantidade de glicose foi o cultivo de 50 N e o que consumiu menor quantidade foi o do 0 N.

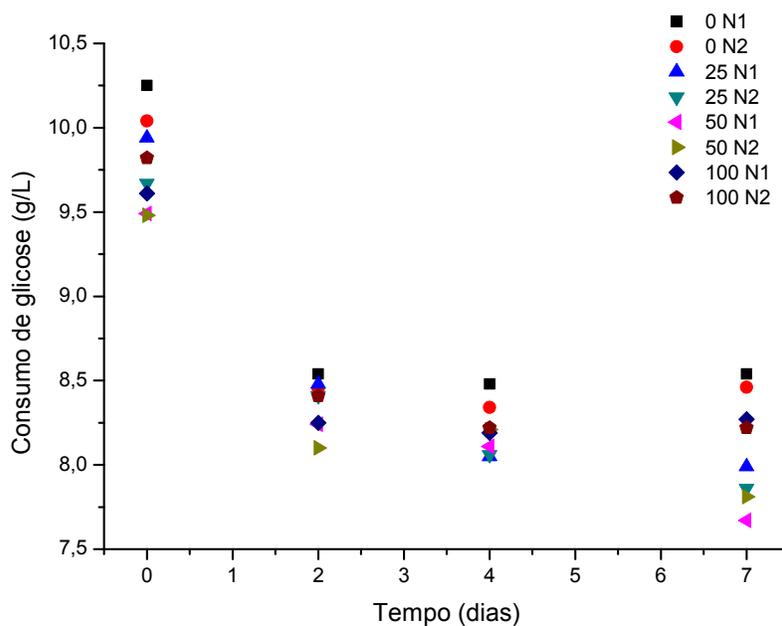


Figura 4. 28. Consumo de glicose nos cultivos com diferentes concentrações de nitrogênio

4.2.3.3. Porcentagem de lipídios

Os resultados dos quatro cultivos e suas duplicatas são mostrados na Tabela 4.5 em porcentagem de biomassa seca. As menores porcentagens foram atingidas nos cultivos de 25 e 50 N.

Tabela 4. 5. Porcentagem de lipídios

Cultivo	Teor de lipídios (%)
0N1	25,51
0N2	21,81
25N1	21,33
25N2	17,06
50N1	21,52
50N1	21,52
50N2	19,46

Cultivo	Teor de lipídios (%)
100N1	22,96
100N2	20,64

Em média, o cultivo 0 N atingiu 24% de lipídios, sendo o cultivo com o qual atingiu maior quantidade de lipídios nos quatro níveis de nitrogênio. Já o cultivo 100 N atingiu em média 21,8%, obtendo 4,54% a mais do que o cultivo inoculado do cultivo autotrófico.

4.3.CRESCIMENTO MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Desmodesmus* sp.

Este cultivo foi considerado, inicialmente, para ter certeza de que a microalga consumia glicose. Com este crescimento conseguiu-se comparar os três sistemas de cultivo existentes atualmente.

4.3.1. Crescimento

Na Figura 4.29 pode-se observar o crescimento celular neste cultivo. O cultivo foi realizado em duplicata, sendo o M1 o cultivo mixotrófico (1) e o M2 a duplicata. Os cultivos mostraram bastante semelhança e um comportamento similar ao heterotrófico. Este cultivo conseguiu atingir em média 192 Mcélulas/mL. Não atingiu tanto quanto o heterotrófico, mas atingiu 3,8 vezes a mais do que o autotrófico.

4.3.2. Consumo de glicose

O consumo de glicose do cultivo mixotrófico em duplicata pode ser observado na Figura 4.30. O consumo foi em média de 4,61 g/L. Durante os seis dias avaliados, o consumo da glicose atingiu quase a metade do valor adicionado inicialmente.

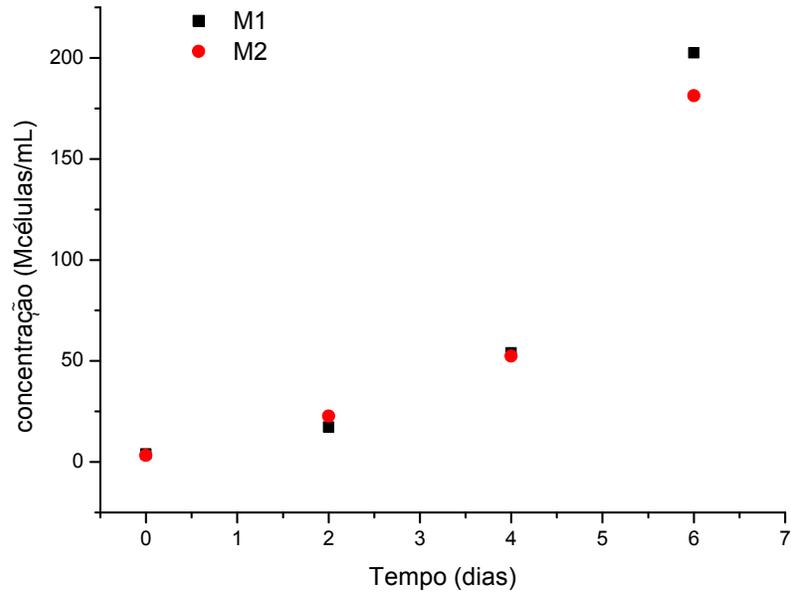


Figura 4. 29. Crescimento celular no cultivo mixotrófico da microalga *Desmodesmus* sp.

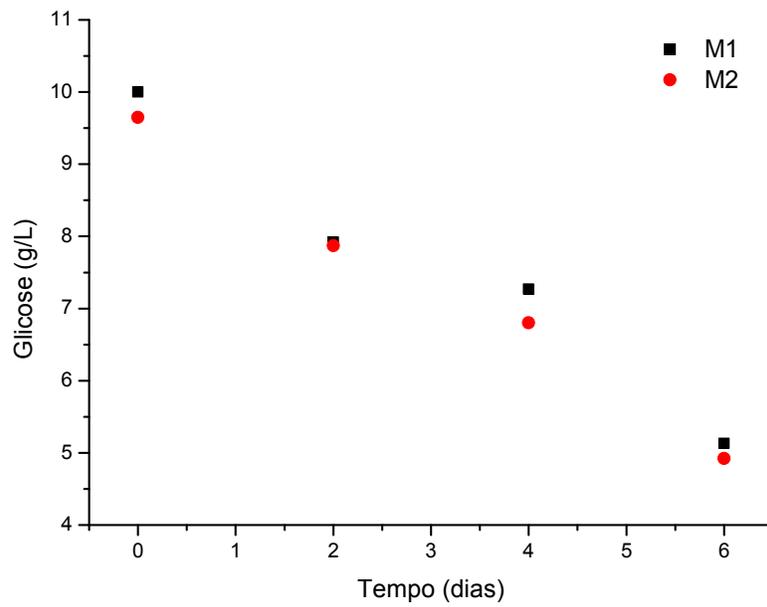


Figura 4. 30. Consumo de glicose no cultivo mixotrófico

4.3.3. Porcentagem de lipídios

A porcentagem de lipídios no cultivo mixotófico foi em média de 25,10%, sendo que esta foi a maior porcentagem obtida com esta cepa *Desmodesmus* sp.

4.3.4. Comparação do crescimento nos cultivos autotrófico, mixotrófico e heterotrófico

Foram comparados os crescimentos dos três cultivos nas mesmas condições de temperatura e agitação. Os resultados do crescimento são mostrados na Figura 4.31. Os dados do sexto dia são listados na Tabela 4.6. O maior crescimento foi obtido no cultivo heterotrófico, que atingiu 4,8 vezes mais do que o cultivo autotrófico, e 1,34 vezes a mais do que o cultivo mixotrófico. Assim, o cultivo heterotrófico é o mais eficiente, para obter maior quantidade de células.

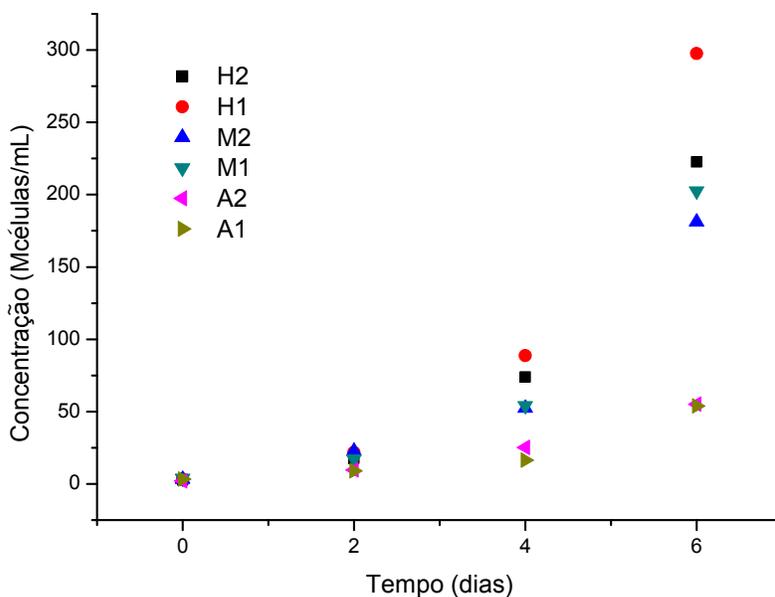


Figura 4. 31. Comparação do crescimento celular da microalga *Desmodesmus* sp. nos três sistemas de cultivo

Tabela 4. 6. Comparação do crescimento celular dos três cultivos

Cultivo	Crescimento (Mcélulas/mL)
Autotrófico	54,4
Mixotrófico	192
Heterotrófico	261

A Tabela 4.7 mostra os resultados da velocidade específica de crescimento e do tempo de duplicação dos três cultivos. Pode-se notar que o cultivo heterotrófico tem tempo de duplicação menor do que os outros cultivos e, por causa disso, atinge maior crescimento celular. O cultivo requer, em média, 7,35 horas a menos para duplicar as células do que o cultivo mixotrófico, e, 25,71 horas a menos do que o cultivo autotrófico.

Tabela 4. 7. Valores de velocidade de crescimento e tempo de duplicação

Cultivo	Velocidade de crescimento	Tempo de duplicação	Tempo de duplicação
	μ (dias ⁻¹)	t_d (dias)	t_d (horas)
A1	0,1963	3,53	84,75
A2	0,2367	2,93	70,28
M1	0,2813	2,46	59,14
M2	0,2811	2,47	59,18
H1	0,3232	2,14	51,47
H2	0,319	2,17	52,15

Na Tabela 4.8 são listadas as porcentagens de lipídios nos três cultivos. O cultivo mixotrófico se caracterizou por conseguir a maior porcentagem de lipídios, já o cultivo heterotrófico foi o que apresentou menor porcentagem dos três cultivos. Também cabe ressaltar que, com as condições de cultivo do autotrófico, 24 horas de luz e agitação por *shaker*, conseguiram-se maiores porcentagens de lipídios do que o cultivo que foi realizado em fotoperíodo de 12 horas e agitação por ar.

Tabela 4. 8. Porcentagem de lipídios

Cultivo	Teor de lipídios (%)
A1	23,24
A2	20,59
M1	27,54
M2	22,64
H1	16,47
H2	18,04

Como resultado desta comparação, pode-se concluir que o melhor cultivo para o crescimento e maior porcentagem de lipídios foi o cultivo mixotrófico mas, no que diz respeito aos custos, o mais eficiente é o autotrófico, já que este não precisa de fonte de carbono adicional e com este cultivo se obtém 3,2% a menos de lipídios do que com o cultivo mixotrófico. Mas para ser realmente eficiente, precisa-se de cultivos em grande escala que consigam uma produção celular eficiente.

No sexto dia, os cultivos mostraram colorações bem diferentes. Na Figura 4.32 são mostrados os Erlenmeyers. Pode-se observar que o cultivo heterotrófico, no meio, o verde é bem menos intenso do que os cultivos mixotrófico (esquerda da foto) e autotrófico (direita da foto); isto se deve a que, no cultivo heterotrófico, o crescimento celular não ocorre por meio de fotossíntese e, portanto, produz pouca clorofila. Os resultados da medição de clorofila para estes três cultivos são listados na Tabela 4.9. A medição foi realizada na mesma quantidade de células/mL e foi fixado no valor de $5,38 \times 10^7$ para ter um dado comparativo. Os cultivos heterotrófico e mixotrófico mostraram uma menor quantidade de clorofila e o autotrófico mostrou quase 8 vezes a mais do que os outros cultivos. A cor verde intensa do mixotrófico deve-se a maior densidade celular do que o autotrófico. Os carotenóides se comportaram da mesma maneira, o cultivo autotrófico mostrou um teor de carotenóides maior do que os outros cultivos.

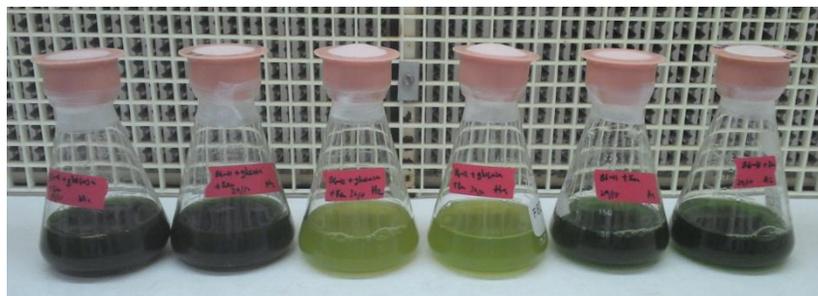


Figura 4. 32. Comparação da coloração dos cultivos cultivo mixotrófico a esquerda, na metade cultivo heterotrófico e a direita cultivo autotrófico

Tabela 4. 9. Clorofila e carotenóides

Cultivo	Clorofila ($\mu\text{g/mL}$)	Carotenóides ($\mu\text{g/mL}$)
Autotrófico	8,08	1,85
Mixotrófico	1,17	0,43
Heterotrófico	0,75	0,19

4.4.ÓLEO SINTÉTICO

Este óleo sintético foi produzido pela necessidade de estudar as variáveis da reação de transesterificação: tipo de catálise, álcool, temperatura, porcentagem de catalisador e relação óleo:álcool. Isto foi necessário, já que poucas informações têm-se a respeito das variáveis da reação de transesterificação a partir de óleo de microalga, e na produção do óleo em escala laboratorial, a quantidade é mínima, sendo possível caracterizá-lo. Este óleo foi produzido a partir dos resultados obtidos na análise do perfil de ácidos graxos da microalga *Desmodesmus* sp., mostrados na Tabela 4.1.

A partir da matriz feita com a revisão bibliográfica foi montado um sistema de 28 equações. Nestas equações cada x corresponde à composição do ácido graxo em cada óleo. A idéia foi tentar obter composições dos óleos, para suprir a composição de cada ácido graxo na composição da microalga. Por exemplo, na Equação 4.1, que corresponde ao ácido hexanóico (C6:0) tem-se composições x dos óleos de coco e de coco babaçu para tentar chegar a uma composição de 0,18 correspondente a esse ácido graxo na microalga *Desmodesmus* sp. Assim,

igualou-se à composição de todos os ácidos graxos contidos no óleo da microalga *Desmodesmus* sp. com os óleos da base de dados. A seguir, são mostradas as equações a serem resolvidas pelo método iterativo:

C6:0 $0,6x_2 + 0,4x_{15} = 0,18$ Equação 4. 1

C 8:0 $0,8x_1 + 6,8x_2 + 5,3x_{15} + 4,7x_{16} = 0,32$ Equação 4. 2

C10:0 $0,5x_1 + 5,4x_2 + 0,1x_{12} + 5,9x_{15} + +3,8x_{16} = 0$ Equação 4. 3

C12:0 $0,3x_1 + 47,7x_2 + 0,1x_3 + 0,1x_6 + 44,3x_{15} + +44,5x_{16} = 0,32$ Equação 4. 4

C13:0 Sem equação=1,61 Equação 4. 5

C14:0 $0,7x_1 + 18,5x_2 + 0,1x_3 + 5,01x_4 + 0,08x_5 + 0,1x_6 + 0,7x_8 + 0,1x_{10}$
 $+ 0,21x_{11} + 0,6x_{13} + 15,8x_{15} + 14,1x_{16} + 0,1x_{18}$ Equação 4. 6
 $+ 0,08x_{20} = 30,27$

C15:0 $0,09x_4 + 0,03x_5 = 5,27$ Equação 4. 7

C16:0 $41,6x_1 + 9,1x_2 + 11,3x_3 + 25,1x_4 + 10,76x_5 + 6,4x_6 + 25,79x_7 + 25x_8$
 $+ 10,3x_9 + 8x_{10} + 20,69x_{11} + 4,2x_{12} + 15x_{13} + 3,7x_{14}$ Equação 4. 8
 $+ 8,6x_{15} + 8,4x_{16} + 9,7x_{17} + 19,3x_{18} + 3,9x_{19}$
 $+ 12,25x_{20} + 12x_{21} = 45,27$

C16:1 $0,2x_1 + 0,1x_2 + 0,2x_3 + 0,59x_4 + 0,09x_5 + 0,1x_6 + 2,85x_7 + 0,43x_8$
 $+ 0,4x_9 + 0,13x_{11} + 0,3x_{12} + 0,3x_{13} + 0,2x_{18} + 0,2x_{21}$ Equação 4. 9
 $= 0,64$

C16:2 $0,2x_{18} = 0$ Equação 4. 10

C17:0 $0,1x_3 + 0,97x_4 + 0,1x_5 + 0,1x_6 + 0,08x_8 + 0,1x_{12} = 0,24$ Equação 4. 11

C17:1 $0,05x_5 + 0,1x_6 + 0,1x_{12} + 0,1x_{21} = 0$ Equação 4. 12

$$\begin{aligned}
 \text{C18:0} \quad & 4,2x_1 + 2,7x_2 + 3,6x_3 + 3,47x_4 + 3,7x_5 + 3,6x_6 + 0,77x_7 + 3x_8 \\
 & + 2,9x_9 + 1,8x_{10} + 2,18x_{11} + 2x_{12} + 8x_{13} + 0,42x_{14} \\
 & + 2,9x_{15} + 2,8x_{16} + 5,4x_{17} + 0,7x_{18} + 2,8x_{19} + 0,13x_{20} \\
 & + 1,9x_{21} = 0,31
 \end{aligned}$$

Equação 4. 13

$$\begin{aligned}
 \text{C18:1} \quad & 41,3x_1 + 6,8x_2 + 23,7x_3 + 5,16x_4 + 26,25x_5 + 21,7x_6 + 46,11x_7 + 17x_8 \\
 & + 77x_9 + 53,3x_{10} + 40,16x_{11} + 60x_{12} + 36,8x_{13} \\
 & + 82,08x_{14} + 15,1x_{15} + 18,1x_{16} + 38,37x_{17} + 15,9x_{18} \\
 & + 13,7x_{19} + 18,06x_{20} + 26,5x_{21} = 3,97
 \end{aligned}$$

Equação 4. 14

$$\begin{aligned}
 \text{C18:2} \quad & 9,5x_1 + 2x_2 + 53,6x_3 + 21,32x_4 + 51,43x_5 + 64,9x_6 + 22,8x_7 + 53x_8 \\
 & + 7,6x_9 + 28,4x_{10} + 35,36x_{11} + 20,25x_{12} + 39x_{13} \\
 & + 13,19x_{14} + 1,7x_{15} + 2,9x_{16} + 46,1x_{17} + 50,9x_{18} \\
 & + 12,5x_{19} + 68,79x_{20} + 58,5x_{21} = 6,21
 \end{aligned}$$

Equação 4. 15

$$\begin{aligned}
 \text{C18:3} \quad & 0,3x_1 + 0,1x_2 + 5,9x_3 + 0,57x_4 + 6,24x_5 + 1,5x_6 + 1,3x_7 + 0,12x_8 \\
 & + 0,8x_9 + 0,3x_{10} + 0,5x_{11} + 9,4x_{12} + 0,28x_{14} + 0,2x_{16} \\
 & + 0,07x_{17} + 12,3x_{18} + 67,1x_{19} + 0,69x_{20} + 0,6x_{21} \\
 & = 1,39
 \end{aligned}$$

Equação 4. 16

$$\begin{aligned}
 \text{C20:0} \quad & 0,3x_1 + 0,1x_2 + 0,3x_3 + 1,01x_4 + 0,38x_5 + 0,3x_6 + 0,16x_7 + 0,32x_8 \\
 & + 0,3x_9 + 0,9x_{10} + 0,56x_{11} + 0,7x_{12} + 0,3 + 0,33x_{14} \\
 & + 0,4x_{16} + 0,36x_{17} + 0,2x_{18} + 0,3x_{21} = 0
 \end{aligned}$$

Equação 4. 17

$$\begin{aligned}
 \text{C20:1} \quad & 0,1x_1 + 0,3x_3 + 1,3x_4 + 0,23x_5 + 0,2x_6 + 0,22x_7 + 0,1x_8 + 2,4x_{10} + 1,5x_{12} \\
 & + 0,1x_{21} = 0
 \end{aligned}$$

Equação 4. 18

$$\text{C20:2} \quad 0,1x_{12} = 0$$

Equação 4. 19

$$\text{C20:4} \quad 0,34x_4 = 3,81$$

Equação 4. 20

$$\text{C20:5} \quad 5,46x_4 = 0$$

Equação 4. 21

$$\text{C22:0} \quad 0,1x_1 + 0,3x_3 + 1,06x_4 + 0,49x_5 + 0,6x_6 + 0,15x_8 + 0,1x_9 + 3x_{10} + 0,3x_{12} + 0,1x_{21} = 0 \quad \text{Equação 4. 22}$$

$$\text{C22:1} \quad 0,1x_3 + 0,1x_6 + 0,5x_{12} + 1,5x_{12} + 0,1x_{21} = 0 \quad \text{Equação 4. 23}$$

$$\text{C22:2} \quad 0,29x_4 = 0 \quad \text{Equação 4. 24}$$

$$\text{C22:5} \quad 4,24x_4 = 0 \quad \text{Equação 4. 25}$$

$$\text{C22:6} \quad 6,95x_4 = 0 \quad \text{Equação 4. 26}$$

$$\text{C24:0} \quad 0,1x_1 + 0,1x_3 + 16,79x_4 + 0,17x_5 + 0,2x_6 + 0,1x_8 + 0,2x_9 + 1,8x_{10} + 0,21x_{11} + 0,1x_{12} + 0,1x_{16} + 0,2x_{18} + 0,1x_{21} = 0 \quad \text{Equação 4. 27}$$

$$\text{C24:1} \quad 0,1x_2 + 0,3x_3 + 0,4x_9 + 0,1x_{12} = 0,19 \quad \text{Equação 4. 28}$$

Como resultado do primeiro método iterativo foram encontrados três óleos que misturados mostraram uma semelhança com o óleo da microalga *Desmodesmus* sp. Esta semelhança teve desvios em vários ácidos graxos, não se conseguindo uma igualdade na composição, mas sim uma aproximação. Foram adquiridos, então, estes óleos: óleo de coco babaçu, óleo de palma e óleo de peixe. Foram analisados os ácidos graxos destes óleos e um novo cálculo foi feito gerando uma nova proporção da mistura. O resultado da mistura final foi uma composição de 65% de óleo de peixe, 20% óleo de palma e 15% de óleo de coco de babaçu. Com o método de cálculo, vários desvios foram obtidos quando comparado com a porcentagem do óleo de microalga; onde mais se encontrou diferença nos valores, foi nos ácidos graxos de maior proporção da microalga, entre eles o C14:0 e o C16:0. Como o objetivo deste óleo é saber o comportamento do óleo de microalga na transesterificação, as reações foram inicialmente realizadas com esta mistura, até conseguir extrair o óleo de microalga.

4.4.1. Caracterização em ácidos graxos

Foram feitas análises dos óleos brutos e do óleo sintético em duplicata para conhecer o perfil dos ácidos graxos; o resultado é mostrado na Tabela 4.10. Estas análises foram feitas realizando uma esterificação dos óleos pelo método descrito no item 3.5.2. Na última coluna, à

direita, é mostrado o perfil de ácidos graxos da microalga. Na tabela pode-se identificar que os óleos mostram um perfil de dois ou mais ácidos graxos que se encontram em maior proporção. O óleo de palma pode ser representado por dois ácidos graxos: o C16:0 (ácido palmítico) e o C18:1 (ácido oleico), que representam 82,7% do total. O óleo de coco babaçu, pelos ácidos C12:0 (ácido láurico), o C14:0 (ácido mirístico) e, em menor proporção o C18:1t (ácido eláidico).

O óleo de peixe pode-se representar por quatro, já que a proporção deles é bastante distribuída, estes ácidos são: C16:0 (ácido palmítico), C18:1 (ácido oleico), C18:2 (ácido linoléico) e o C20:5 (ácido eicosapentaenóico), que representam o 63,72% do total. Na última coluna é mostrada a composição obtida com a mistura destes óleos na proporção de 65% de óleo de peixe, 20% óleo de palma e 15% de óleo de coco de babaçu. Pode-se observar que os ácidos graxos em maior porcentagem são o C16:0 (ácido palmítico) e o C18:1 (ácido oleico), mas só conseguem representar o 49,45% do óleo, o restante está bem distribuído nos outros ácidos.

Comparando com o perfil dos ácidos graxos da microalga, pode-se notar que foi representado quase o 50% dele. Também pode ser observado na tabela que o perfil de ácidos graxos gerado com a mistura de óleos não obedece a média que representa o ácido graxo no óleo, ou seja, se tomamos como exemplo o C14:0 e fazemos o que corresponderia desse ácido no óleo sintético, quando se misturam nas proporções estabelecidas para a mistura, teríamos que: $0,66(0,2) + 23,07(0,25) + 5,46(0,65) = 9,45$ deste ácido graxo e pela análise obteve-se 5,71. Isto quer dizer que a mistura não se comporta, em composição, como as porcentagens que se estabeleceram e gerou-se um novo perfil de ácidos graxos. No final da Tabela 4.1 observa-se a somatória dos ácidos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados dos óleos, permitindo a comparação com os ácidos graxos de cada óleo.

Os TG, DG e MG dos óleos puros e a mistura sintética foram quantificados via cromatografia de permeação em gel (GPC) pela metodologia descrita no item 3.5.3. Os resultados das composições, em porcentagem, são mostrados na Tabela 4.11. Podem-se observar nas composições que os MG do óleo sintético são maiores do que os outros, ficando fora até da média dos três óleos. Isto pode ser possível por várias razões, como foi observado na análise da composição de ácidos graxos, o óleo sintético gerou um perfil diferente do que a média dos três óleos, isto quer dizer que, quando misturados, os óleos podem gerar uma mistura completamente diferente, e não necessariamente mostrar o valor médio de todos os valores.

Tabela 4. 10. Perfil de ácidos graxos de óleos

Ácido Graxo	Óleo de Palma	Óleo de coco babaçu	Óleo de peixe	Óleo sintético	Óleo de microalga
C 6:0	0,00	0,28	0,00	0,15	0,18
C 8:0	0,04	3,80	0,00	0,63	0,32
C10:0	0,04	3,67	0,08	0,62	0,00
C12:0	0,51	39,90	0,14	8,09	0,32
C14:0	0,66	23,07	5,46	5,71	30,27
C15:0	0,05	0,03	0,47	0,26	5,27
C16:0	40,56	8,61	21,19	23,86	45,27
C16:1	0,18	0,04	6,84	3,50	0,64
C17:0	0,09	0,04	0,89	0,73	0,24
C17:1	0,03	0,03	1,04	0,54	0,00
C18:0	4,67	2,98	3,97	4,00	0,31
C18:1t	0,00	14,60	0,24	0,00	0,00
C18:1	42,14	0,00	14,26	25,59	0,00
C18:2t	0,18	0,00	0,14	0,10	0,00
C18:2	9,11	2,54	12,73	9,49	6,21
C18:3t	0,26	0,00	0,41	0,20	0,00
C18:3	0,26	0,05	1,91	0,99	1,39
C20:0	0,41	0,12	2,01	1,19	0,00
C20:1	0,22	0,10	1,06	0,70	0,00
C20:4	0,00	0,00	1,18	0,58	3,81
C20:5	0,00	0,00	15,54	8,00	0,00
C22:0	0,07	0,06	0,21	0,13	0,00
C22:4	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00
C22:5	0,00	0,00	1,73	0,90	0,00
C22:6	0,00	0,00	7,73	3,95	0,00
C24:0	0,10	0,00	0,13	0,10	0,00
C24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19
Saturados	47,2	82,56	34,55	45,47	82,18
Monoinsaturados	42,57	14,77	23,44	30,33	0,83
Poli-insaturados	9,81	2,66	41,37	24,21	11,41

Esta diferença nas composições também pode ser possível pela oxidação dos ácidos graxos, pela armazenagem, e pela mudança das condições ambientais. Foi observado então que o óleo sintético varia um pouco a sua composição com o tempo. Estas análises foram realizadas com bastante cuidado, e, a cada planejamento realizado, analisou-se a amostra pelo GPC para ter certeza da composição inicial da mistura.

Tabela 4. 11. Perfil de acilgliceróis dos óleos

Óleo	TG (%)	DG (%)	MG (%)
Óleo de coco babaçu	95,4	2,0	2,6
Óleo de palma	96,2	2,9	0,9
Óleo de peixe	88,7	1,4	9,9
Óleo sintético	81,1	6,2	12,7

4.4.2. Quantificação dos ácidos graxos livres

Foi feita a quantificação dos ácidos graxos livres (AGL), em triplicata, pelo método mencionado no item 3.5.1, para cada óleo e para o óleo sintético. O resultado é mostrado na Tabela 4.12. O óleo de palma adquirido foi refinado, razão pela qual a quantidade de AGL é bem menor do que os outros. O óleo de peixe mostrou uma porcentagem elevada de AGL. Com o valor da acidez obtido é possível ver que o valor não é a média dos três óleos, o valor foi mais alto do que a média, que foi de 3,2, e a análise da acidez do óleo sintético teve um valor de 4,7 de AGL. Mas este valor mostrou uma semelhança com o óleo da microalga *Desmodesmus* sp. Isto é um bom resultado, já que tem uma característica a mais parecida e que influencia na produção de biodiesel.

Tabela 4. 12. Ácidos graxos livres

Óleo	% AGL
Óleo de Palma	0,18
Óleo de coco babaçu	1,9
Óleo de peixe	7,5
Óleo sintético	4,7

4.4.3. Estabilidade do óleo sintético

Foram realizadas análises de DSC para se ter uma noção do comportamento da degradação térmica e do ponto de fulgor de cada um dos óleos puros e do óleo sintético, com o objetivo de conhecer o comportamento da mistura. Esta análise foi feita pelo método descrito no item 3.5.4. As curvas de DSC são mostradas nas Figura 4.33 a Figura 4.36, obtidas sob pressão atmosférica. O óleo de coco mostrou uma curva bem definida. As curvas do óleo de palma e óleo de peixe mostraram vários picos endotérmicos que pode ser explicado pela grande diferença no perfil de ácidos graxos e por conter maior quantidade de ácidos graxos mais pesados. A mistura, por tanto, apresentou o comportamento de uma mistura multicomponente. As triplicatas para todos os óleos mostraram bastante semelhança.

O comportamento térmico do óleo de peixe teve dois tipos de efeitos térmicos, um endotérmico e outro exotérmico. Já nos outros óleos, só o efeito endotérmico foi representativo. O pico de degradação (pico exotérmico) só apareceu no óleo de peixe e no óleo sintético. A temperatura de fulgor do óleo sintético mostrou semelhança com o comportamento das análises dos óleos, o que demonstra que a mistura é homogênea e tem um comportamento parecido com todos os óleos.

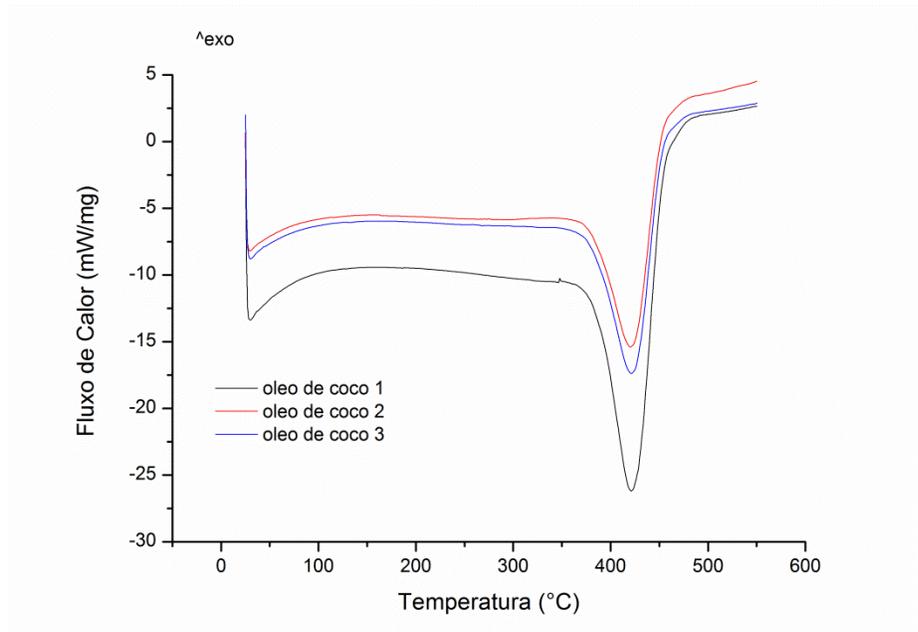


Figura 4. 33. Curva de DSC em triplicata do óleo de coco babaçu obtidas sob atmosfera de N₂ (50 mL.min⁻¹)

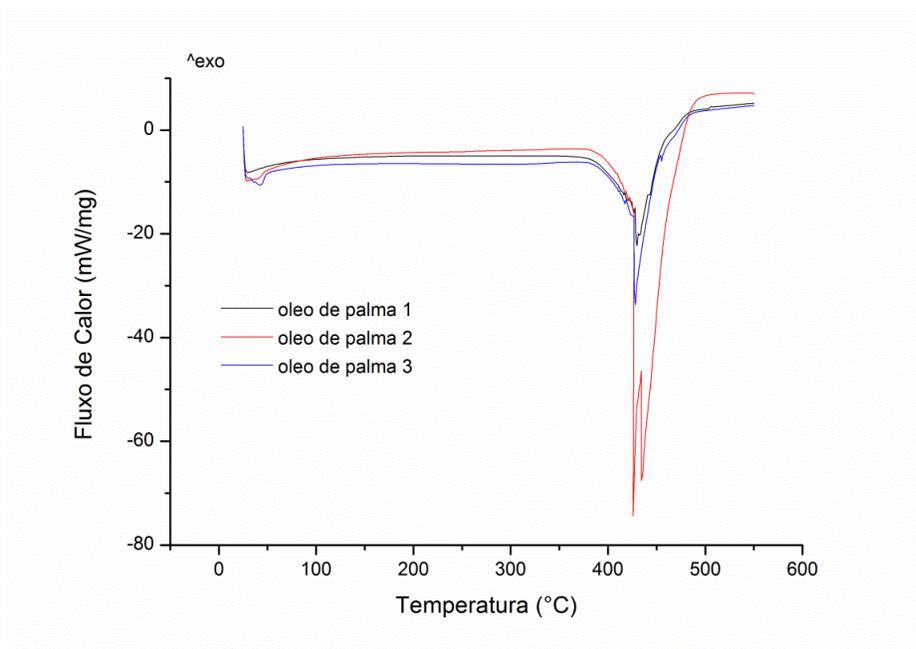


Figura 4. 34. Curva de DSC em triplicata do óleo de palma obtidas sob atmosfera de N₂ (50 mL.min⁻¹)

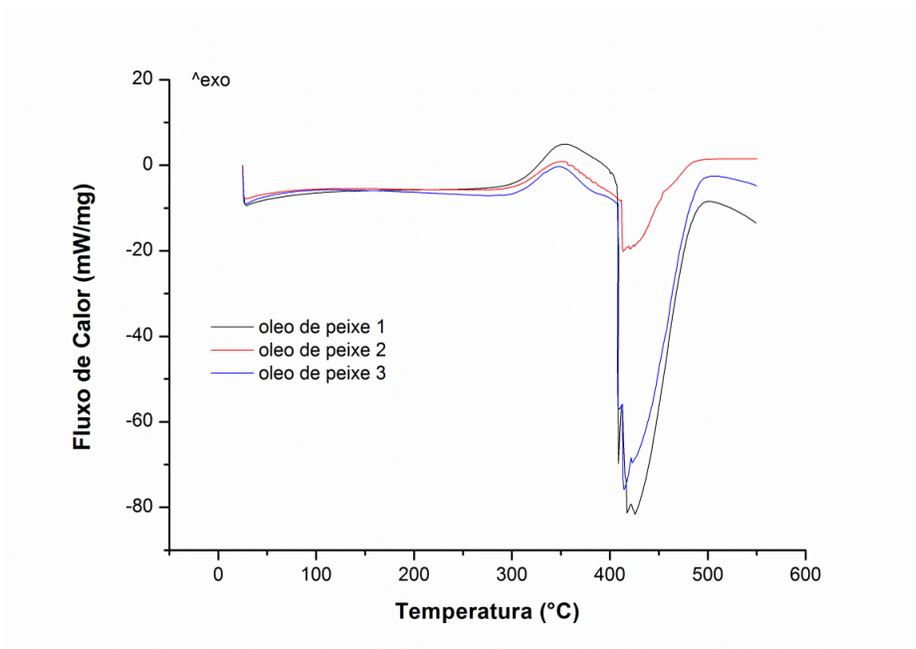


Figura 4. 35. Curva de DSC em triplicata do óleo de peixe obtidas sob atmosfera de N₂ (50 mL.min⁻¹)

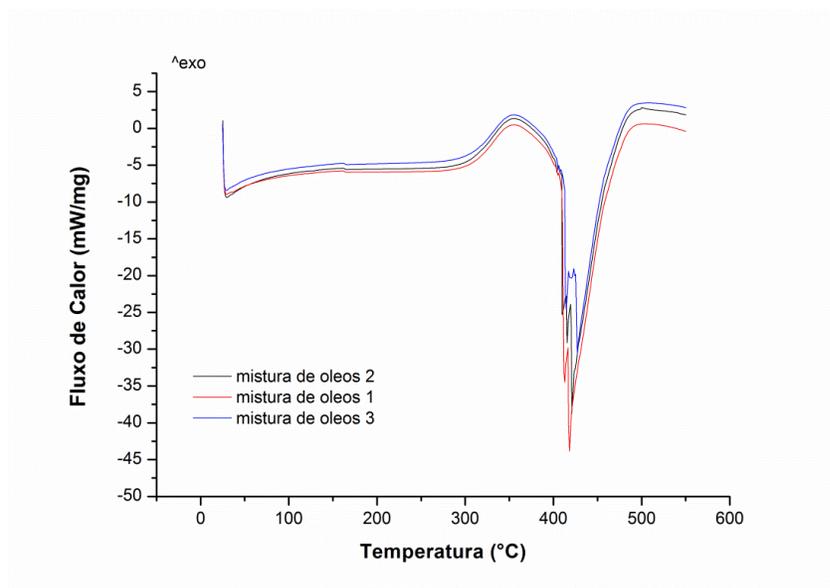


Figura 4. 36. Curva de DSC em triplicata do óleo sintético obtidas sob atmosfera de N₂ (50 mL.min⁻¹)

Os resultados da temperatura onde começa a vaporização de cada óleo podem ser vistos na Tabela 4.13. Pode-se notar que a temperatura de todos os óleos, incluindo o óleo sintético, é elevada. Sendo a maior de todas, a do óleo sintético que mostrou seu pico de endotérmico (ponto de fulgor) em 410°C. A degradação térmica do óleo (pico exotérmico) sintético começa em torno dos 310°C, ponto no qual o óleo começa perder as suas propriedades e a mistura pode não ter a mesma composição. A temperatura do ponto de fulgor mostrou um aumento no óleo sintético, isto aconteceu em quase todas as análises, os resultados não mostraram valores médios dos três óleos e sim um novo comportamento. O aumento da temperatura de fulgor pode-se considerar como um resultado bom, já que quanto maior a temperatura de fulgor do óleo, provavelmente será maior a do biodiesel produzido

Tabela 4. 13. Ponto de fulgor dos óleos a pressão atmosférica

Óleo	Ponto de Fulgor (°C)
Óleo de coco de babaçu	371
Óleo de palma	387
Óleo de peixe	408
Óleo sintético	410

4.4.4. Produção de biodiesel

A produção de biodiesel a partir do óleo sintético foi feita via reação de transesterificação. Nesta etapa se estudaram as variáveis que influenciam na reação. A seguir, são detalhadas as etapas:

4.4.4.1. Análise da catálise da reação

Inicialmente, se fez um estudo da catálise da reação. Foram estudadas as reações de catálises ácida e básica com o objetivo de escolher a melhor e mais eficiente na produção de ésteres.

4.4.4.1.1. Catálise básica

O óleo sintético apresentou uma porcentagem de 4,7 % de AGL e por esse motivo, foi necessária uma preparação prévia da matéria prima, já que estes ácidos graxos livres podem reagir com o catalisador da reação de transesterificação (NaOH) formando sabão e diminuindo a eficiência da reação.

Foi realizada uma reação de neutralização usando 1% de NaOH como catalisador durante 15 min. Assim que os sais foram produzidos, a mistura foi centrifugada e os sais separados do óleo neutralizado. Por fim, este óleo neutralizado foi lavado. Depois destas etapas, foi realizada a reação de transesterificação, reagindo o óleo com o álcool (etanol) em proporções de 1:10, a uma temperatura de 60°C com 1% de catalisador (NaOH). A reação estudada foi monitorada no tempo de 15, 30 e 60 minutos, e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.14. Pode-se observar que, nos resultados da temperatura de 60°C, os TG e os MG aumentaram suas composições. Isto pode acontecer, já que todas as reações são reversíveis, podendo, pelas condições da reação, favorecer a produção dos TG, DG e MG. Este aumento, nestes produtos, significou uma diminuição da produção de glicerina. Os resultados da reação básica foram poucos satisfatórios, a perda de matéria prima na preparação foi de 6% e as conversões não foram muito altas. Ainda, são necessários muitos estudos das etapas envolvidas para se chegar a um biodiesel de qualidade.

Tabela 4. 14. Resultados da reação básica T=60°C

Tempo da reação (min.)	TG (%)	DG (%)	MG (%)	EE (%)	GL (%)
0	83	9,5	7,5	0	0
15	8,2	12,6	8,2	70,9	0
30	3,6	9,8	0,41	81,4	1,2
60	4,5	9,4	1,7	83,8	0,6

4.4.4.1.2. Catálise ácida

As vantagens de realizar catálise ácida é que a etapa na preparação da matéria prima deixa de ser necessária, isto porque na transesterificação ácida ocorrem as duas reações consecutivamente. Primeiramente, ocorre uma esterificação dos sais dos ácidos e, depois, acontece a transesterificação de todos os ácidos graxos. Várias desvantagens se têm quando se trabalha com este tipo de reação: a reação é bem mais longa, é utilizado um grande excesso de álcool e grande porcentagem de catalisador.

Foram estudados dois alcoóis como reagente em excesso. O metanol, que é o álcool mais usado para este tipo de reação, e o etanol. O metanol é mais usado já que a separação da glicerina com o biodiesel é bem mais fácil. Quando se trabalha com etanol, geralmente se acrescenta uma etapa de destilação para retirar o álcool em excesso antes do processo de separação da glicerina, mas este álcool pode ser recuperado.

Para a análise da catálise ácida da reação de transesterificação, com o objetivo de comparar a performance dos dois alcoóis, foi feita uma revisão bibliográfica de estudos feitos desta reação e das variáveis de operação em diferentes óleos. Mediante isso, conseguiu-se entender quais variáveis poderiam influenciar nos resultados, e encontrou-se que, variáveis como a porcentagem de catalisador, relação molar óleo:álcool, temperatura e tempo da reação são as que mais influenciam a reação de transesterificação. Baseado na literatura, foram escolhidos os valores destas variáveis para realizar a reação com o etanol e o metanol como reagentes em excesso.

A produção de ésteres foi estudada em função do tempo nas duas reações. Os gráficos da conversão de ésteres metílicos e etílicos são mostrados nas Figura 4.37 e Figura 4.38, respectivamente. O comportamento foi bem semelhante; pode-se observar que nos dois gráficos os TG diminuem sempre com o tempo. Diferentemente acontece com os DG e MG, que começam a aumentar e depois diminuem, isto deve-se as reações paralelas da reação de transesterificação, primeiro se formam os DG e MG para depois ser consumidos e transformados em éster. Por outro lado, os ésteres sempre aumentam sua fração e a glicerina, permanece quase constante durante o tempo da reação.

Os gráficos mostraram quase o mesmo perfil, mas os resultados atingidos foram bem diferentes. A reação feita com metanol foi bem mais lenta e conseguiram-se menores conversões de ésteres metílicos. Diferente disto aconteceu com a reação com etanol, que em menos tempo atingiu-se maiores conversões de ésteres etílicos.

A reação com o metanol resultou em conversões de 70% de éster nas 72 horas de reação, já com o etanol se conseguiram conversões de 90% nas 48 horas de reação. Foi, então, concluído que a reação com etanol é mais eficiente, conseguindo maior produção de ésteres. Este resultado é bom, já que é possível obter etanol a partir de matérias primas renováveis, o que torna o processo bem mais limpo. No entanto, o metanol é muito mais usado na indústria do biodiesel produzido a partir de óleos vegetais, por ser bem mais barato do que o etanol e pela separação com a glicerina que é bem mais fácil e rápida.

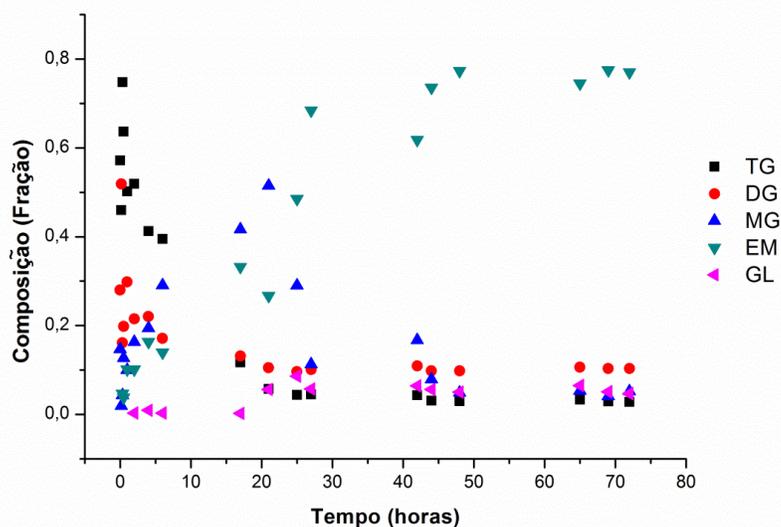


Figura 4. 37. Curva de consumo de TG, DG e MG e produção de glicerina e ésteres metílicos

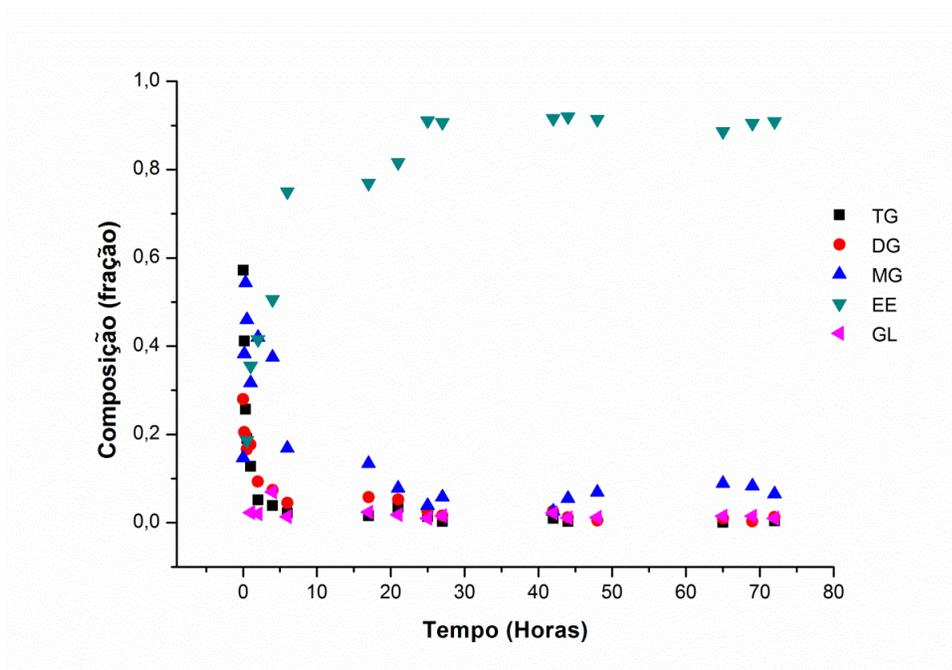


Figura 4. 38. Curva de consumo de TG, DG, MG e produção de glicerina e ésteres etílicos

4.4.4.2. Planejamento de experimentos

A partir dos resultados da etapa anterior, se escolheu realizar uma reação de catálise ácida em excesso de etanol. Partiu-se, então, para o planejamento de experimentos com o fim de tentar otimizar as condições de operação da reação de transesterificação. Dois planejamentos foram feitos e são descritos a seguir:

4.4.4.2.1. Planejamento fracionado resolução IV

Foi realizado um planejamento fracionado resolução IV, com o objetivo de obter os efeitos principais das variáveis em estudo, o que irá permitir definir quais variáveis são usadas para o planejamento fatorial completo, e assim, conseguir otimizá-lo. Quatro variáveis foram estudadas nos níveis inferior, superior e ponto central, conforme Tabela 3.11.

Os resultados deste primeiro planejamento são mostrados na Tabela 4.15, onde são apresentadas as composições dos TG, MG, DG, EE e GL dos nove ensaios; também é mostrada a composição do óleo sintético usado no planejamento.

Tabela 4. 15. Resultados planejamento fracionado resolução IV

Ensaio	Temperatura	Tempo	Catalisador	óleo:álcool	TG	DG	MG	EE	GL
Óleo sintético					0,807	0	0,193	0	0
1	-1	-1	-1	-1	0,62	0	0	0,364	0,016
2	1	-1	-1	1	0,038	0	0,043	0,857	0,062
3	-1	1	-1	1	0,524	0,136	0	0,304	0,036
4	1	1	-1	-1	0,227	0,158	0,027	0,564	0,023
5	-1	-1	1	1	0,08	0,057	0,072	0,741	0,05
6	1	-1	1	-1	0	0	0,045	0,911	0,044
7	-1	1	1	-1	0,028	0,03	0,035	0,84	0,066
8	1	1	1	1	0,021	0,012	0,024	0,89	0,053
9	0	0	0	0	0,073	0,106	0,072	0,7	0,049

A análise dos resultados foi feita pelo *software* STATISTICA 7. Na Tabela 4.16 são mostrados os efeitos das variáveis lineares (L) e suas interações. Em negrito estão os efeitos que considerados significativos nessa faixa de trabalho. Observa-se, então, que as variáveis relação de óleo:álcool e a temperatura não são significativas para este processo.

No diagrama de Pareto, mostrado na Figura 4.39, pode-se observar que estes efeitos ficaram fora do limite de confiança, que foi de 95%. Como resultado, a temperatura na produção de ésteres etílicos a partir da mistura sintética não foi muito significativa, obtendo-se uma faixa de melhores resultados entre 50 e 75°C. Com isto, conclui-se que a temperatura da reação de transesterificação em catálise ácida para o óleo sintético não precisa ser muito alta, o que é uma vantagem, já que se evita a evaporação do álcool em excesso.

Tabela 4. 16. Coeficientes de regressão para a conversão de EE

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(1)	p-valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. 95%
Média	0,692222	0,002750	251,7300	0,002529	0,657282	0,727163
(1) Catalisador (L)	0,114250	0,002917	39,1714	0,016249	0,077190	0,151310
(2) Temperatura (L)	-0,027000	0,002917	-9,2571	0,068505	-0,064060	0,010060
(3)Tempo (L)	0,169000	0,002917	57,9429	0,010986	0,131940	0,206060
(4)Relação óleo:álcool (L)	0,006750	0,002917	2,3143	0,259657	-0,030310	0,043810
1L x 2L	-0,051500	0,002917	-17,6571	0,036016	-0,088560	-0,014440
1L x 3L	-0,074000	0,002917	-25,3714	0,025079	-0,111060	-0,036940
1L x 4L	0,061250	0,002917	21,0000	0,030292	0,024190	0,098310

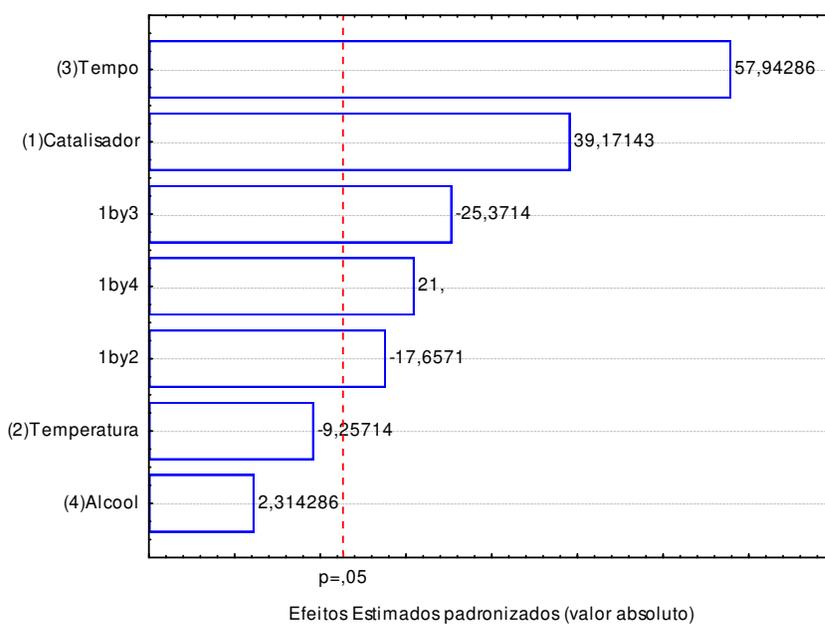


Figura 4. 39. Diagrama de Pareto planejamento resolução IV

A partir da análise feita decidiu-se, então, fixar a temperatura em 60°C para trabalhar, já que esta temperatura esta bem inferior a temperatura de ebulição do etanol, que sob pressão atmosférica é de 78°C. Já para o efeito da relação óleo:álcool, se observou que esta variável depende muito da porcentagem de catalisador a ser utilizado e, assim, quando se trabalha com altas porcentagens de catalisador, se requer alta relação de óleo:álcool. Além do que, com maiores quantidades de álcool na mistura, se obtém melhores conversões de ésteres. Se escolheu o ponto central da relação óleo:álcool que é 1:35 molar.

Contudo, foram eliminadas duas variáveis do processo e seus valores foram fixados. A variável relação de óleo:álcool teve seus melhores resultados (altas conversões de ésteres) quando se trabalhou na relação 1:35 molar. A temperatura, como dito anteriormente, foi fixada em 60°C.

4.4.4.2.2. Planejamento fatorial completo

A partir dos resultados do planejamento fracionado de resolução IV eliminaram-se duas variáveis, a relação molar óleo:álcool e a temperatura da reação, nos valores de 1:35 molar e 60°C, respectivamente. Para completar o estudo das variáveis da reação de transesterificação foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 com três pontos centrais. Os ensaios foram realizados numa bateria de reatores, onde foi possível fazer 5 ensaios ao mesmo tempo, controlando separadamente a temperatura e a agitação.

Foi estudada a tabela ANOVA para o planejamento completo e realizado o teste F, obtendo-se que o modelo não poderia ser representado linearmente. Portanto, foram adicionados os pontos estrela e partiu-se para um delineamento composto central rotacional (DCCR). Os resultados dos ensaios com a conversão de ésteres, são mostrados na Tabela 4.17, nos níveis anteriormente apresentados na Tabela 3.13.

A análise dos resultados foi feita pelo *software* STATISTICA 7 em variáveis codificadas. Os efeitos das variáveis são mostrados na Tabela 4.18, onde pode-se observar que o único efeito não significativo é o tempo de reação. Para estudar melhor o efeito que tem cada variável, foi construído o diagrama Pareto, mostrado na Figura 4.40, no qual pode-se observar as variáveis significativas no limite de confiança definido, que foi de 95%. Como conclusão, tem-se que as

duas variáveis, porcentagem de catalisador e tempo da reação, são significativas para o processo de produção de biodiesel na faixa de estudo, e que só o efeito quadrático da variável do tempo não é significativo.

Tabela 4. 17. Resultados planejamento fatorial completo 2²

Ensaio	Catalisador	Tempo	TG	MG	DG	EE	GL
1	-1	-1	0,155	0,16	0,088	0,554	0,042
2	1	-1	0,044	0,053	0,064	0,778	0,061
3	-1	1	0,012	0,018	0,036	0,825	0,11
4	1	1	0,017	0,026	0,047	0,823	0,088
5	-1,41	0	0,391	0,247	0,071	0,24	0,051
6	1,41	0	0,016	0,02	0,045	0,802	0,117
7	0	-1,41	0,072	0,08	0,065	0,699	0,083
8	0	1,41	0,016	0,037	0,06	0,805	0,082
9 (C)	0	0	0,021	0,023	0,051	0,801	0,103
10 (C)	0	0	0,02	0,024	0,045	0,818	0,093
11 (C)	0	0	0,012	0,019	0,07	0,789	0,111

Tabela 4. 18. Coeficientes de regressão para a conversão de EE

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Lim. de conf. -90%	Lim. de conf. 90%
Média	0,802667	0,008413	95,4084	0,000110	0,766469	0,838865
(1) Catalisador (L)	0,138849	0,005152	26,9511	0,001374	0,116682	0,161015
Catalisador (Q)	-0,113708	0,006132	-18,5436	0,002895	-0,140092	-0,087325
(2)Tempo (L)	0,046488	0,005152	9,0236	0,012059	0,024322	0,068655
(2)Tempo (Q)	0,001792	0,006132	0,2922	0,797667	-0,024592	0,028175
1L x 2L	-0,056500	0,007286	-7,7548	0,016225	-0,087848	-0,025152

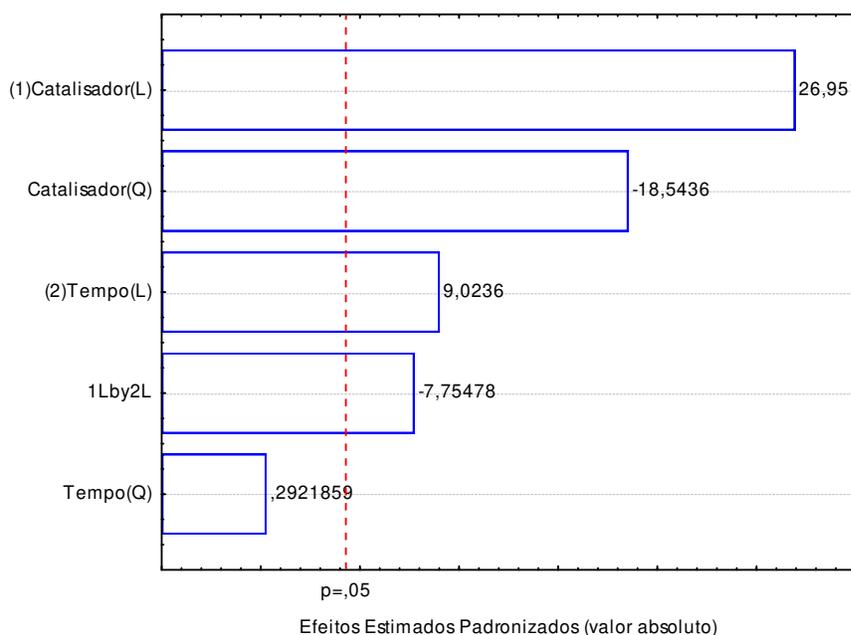


Figura 4. 40. Diagrama de Pareto planejamento fatorial completo 2^2

Para estudar se o modelo pode ser representado estatisticamente é necessário realizar um estudo de variância, com o qual é construída a tabela ANOVA. Esta tabela é obtida pelo *software* STATISTICA 7. Para este estudo foi retirada a variável não significativa (tempo quadrático) obtendo-se uma nova tabela de efeitos, mostrada na Tabela 4.19. A partir destes dados foi construída a tabela ANOVA, apresentada na Tabela 4.20.

Tabela 4. 19. Coeficientes de regressão para a conversão de EE

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. 95%
Média	0,804353	0,006121	131,4018	0,000058	0,778015	0,830691
(1) Catalisador (L)	0,138849	0,010304	26,9511	0,001374	0,233364	0,322030
Catalisador (Q)	-0,114235	0,011721	-19,4917	0,002622	-0,278904	-0,178037
(2)Tempo (L)	0,046488	0,010304	9,0236	0,012059	0,048643	0,137310
1L x 2L	-0,056500	0,014572	-7,7548	0,016225	-0,175697	-0,050303

Tabela 4. 20. Tabela ANOVA

Fonte de variação	SQ	Nº Graus de Liberdade	MQ	Teste F
<i>Regressão</i>	0,264960	4	0,0662	
<i>Resíduos</i>	0,053292	6	0,0089	7,46
<i>Falta de ajuste</i>	0,052867	4	0,0132	
<i>Erro puro</i>	0,000425	2	2,2E-4	62,25
<i>Total</i>	0,318252	10		
% de Variação explicável:		83,25		
% máxima de variação explicável:		99,87		

O teste F foi aplicado nos resultados, sendo que o F calculado para a variação entre os efeitos da regressão e resíduos foi de 7,46. Na tabela dos pontos de porcentagem de distribuição para uma confiança de 95%, o F tabelado é $F_{(4,6)}=4,53$. O F calculado é maior do que o tabelado, e, portanto, o teste se cumpre. Para a análise dos efeitos de falta de ajuste e erro puro o teste F também é cumprido, já que o F calculado foi de 62,25 que é bem maior do que o F tabelado, que é de $F_{(4,2)}=19,25$. A partir destes resultados conclui-se que o planejamento pode ser representado por meio de uma equação quadrática mostrada em função dos valores reais (Equação 4. 29), onde C é a porcentagem de álcool e t é o tempo de reação.

$$EE = 0,020329 + 0,154692 * C - 0,007140 * C^2 + 0,018748 * t - 0,002018 * C * t \quad \text{Equação 4. 29}$$

A partir destes resultados foi construída a superfície de resposta e a curva de contorno, mostradas nas Figura 4.41. Nestas figuras pode-se observar claramente que é possível conseguir altas porcentagens de ésteres em diferentes tempos de reação, e que a variável que influencia mais no processo é a porcentagem do catalisador. Valores mais altos de produção de ésteres são encontrados trabalhando com altas porcentagens de catalisador, encontrando-se uma faixa ótima a partir de 7,5 até 12% de catalisador.

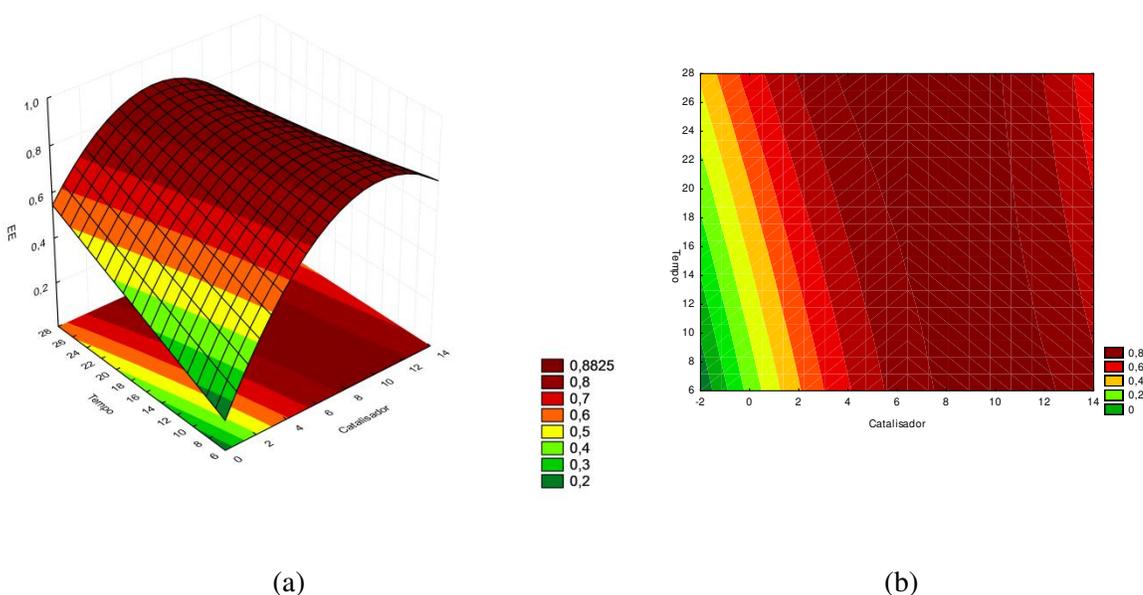


Figura 4. 41. (a) Superfície de resposta, (b) curva de contorno para a resposta de ésteres etílicos em função da porcentagem de catalisador e o tempo de reação.

Concluindo, com o estudo estatístico foi possível encontrar um ótimo para a produção de biodiesel da mistura sintética, e essas condições foram usadas com o óleo da microalga *Desmodesmus* sp. As condições de operação para a produção de biodiesel são: catálise ácida com 10% de catalisador, excesso de 1:35 mol/mol de álcool etílico, uma temperatura de 60°C e um tempo de reação de 24 horas. O tempo foi fixado neste valor baseado nos estudos da escolha do álcool do item 4.4.4.1.2 no estudo da catálise ácida, já que nesse tempo, pela cinética da reação, conseguiu-se maior conversão de ésteres e a conversão a partir deste tempo não muda muito.

4.5.CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo os resultados foram satisfatórios, cumprindo-se os objetivos propostos no trabalho de tese. O trabalho com a microalga foi enriquecedor. Em cada etapa realizada foi necessária a revisão bibliográfica para conseguir os melhores e mais eficientes métodos. Conhecimentos foram adquiridos, desde a manipulação da microalga até o estudo das melhores condições de cultivo. Precisou-se de estudos aprofundados para o tratamento do micro-organismo. Foi necessário conhecer como foi conduzida a fotossíntese e como se realizava a reprodução celular.

Contudo, foi possível reproduzir a microalga de forma eficiente. O estudo do crescimento nos três cultivos existentes foi um dos resultados mais relevantes, conseguindo obter valores bem diferentes de densidade celular em cada um dos cultivos. Os resultados do crescimento celular foram 54,4, 192 e 261 Mcélulas/mL para o cultivo autotrófico, mixotrófico e heterotrófico, respectivamente. Com esses resultados, pode-se concluir que, para se obter um maior crescimento celular, o melhor cultivo é o heterotrófico. O estudo para separação do meio, processo de extração e quantificação dos lipídios foram eficientes. Os resultados foram bastante coerentes, obtendo um teor de lipídios de 23, 25 e 17 % em biomassa seca para o cultivo autotrófico, mixotrófico e heterotrófico, respectivamente. O cultivo que teve maior teor de lipídios foi o mixotrófico pois apresentou um alto crescimento celular e uma alta porcentagem de lipídios.

O óleo sintético, mesmo não sendo idêntico ao óleo da microalga *Desmodesmus* sp., mostrou ser eficiente para o estudo da transesterificação, conseguindo, pelo planejamento de experimentos, as melhores condições da reação. Foram estudadas as principais variáveis que influenciam no processo: porcentagem de catalisador, relação molar óleo:álcool, temperatura e tempo da reação. Com o planejamento de experimentos, conseguiu-se chegar as melhores condições de operação para uma transesterificação ácida com excesso de álcool etílico (relação molar óleo:álcool de 1:35), uma temperatura de 60°C e um tempo de reação de 24 horas. Com estes valores, o óleo sintético atingiu uma composição de 90% de ésteres etílicos, 2% de glicerina e, em menor proporção, 3,9% MG, 2,6% DG e 1,4% TG.

5. CONCLUSÕES

Várias condições de crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. foram estudadas. O crescimento foi avaliado em sistemas abertos e fechados. O crescimento em sistemas abertos foi realizado em tanques de 200 e 500 L, já os sistemas fechados foram em fotobiorreatores de capacidade de 250 mL até 30 L. Os sistemas de cultivo usados foram os três existentes: crescimento autotrófico, mixotrófico e heterotrófico. Três meios de cultivo foram estudados: o meio Guillard f/2, Guillard f/2 modificado com meio agrícola e o BG-11, mas nos três sistemas só foi estudado o meio de cultivo BG-11, o Guillard f/2 só foi estudado no cultivo autotrófico.

O crescimento celular atingido foi de 54, 192 e 261 Mcélulas para o cultivo autotrófico, mixotrófico e heterotrófico, respectivamente. O cultivo heterotrófico foi quase 5 vezes maior em densidade celular do que o autotrófico. A porcentagem de lipídios foi de 23, 25 e 17 % para o cultivo autotrófico, mixotrófico e heterotrófico, respectivamente. Pode-se, então, concluir que o melhor sistema de cultivo é o mixotrófico, que resultou num alto crescimento celular e alta porcentagem de lipídios em biomassa seca. Um dos inconvenientes de se trabalhar com este sistema é que os custos aumentam, devido a quantidade de glicose adicionada.

Os estudos de deficiência de nitrogênio realizados no cultivo autotrófico e heterotrófico mostraram que com a deficiência deste nutriente é possível aumentar a quantidade de lipídios. No cultivo autotrófico foi possível aumentar em até 3% o teor total de lipídios, já no cultivo heterotrófico, em até 6%.

Na produção do óleo sintético, vários inconvenientes foram encontrados na simulação do óleo ao se montar o sistema de equações. Um deles foi que o C13:0 (ácido isomirístico) não foi encontrado em nenhum perfil dos ácidos graxos dos diferentes óleos. Outro é que vários ácidos graxos presentes em alguns óleos não são encontrados no óleo da microalga. Isto aconteceu com o C10:0 (ácido decanóico), C20:5 (ácido eicosapentaenóico), C22:0 (ácido docosanóico), C22:1 ácido docosenóico, C22:2 (ácido docosadienóico), C22:5 (ácido docosapentaenóico) e o C22:6 (ácido docosa-hexaenóico). Isso não se tornou um grande problema, pois tais ácidos graxos

aparecem em baixa quantidade em todos os óleos, o que diminuiu o erro. Outro ponto foi que uma das equações (equação 4.20) do sistema não convergiu, pois somente o óleo de peixe tem o C20:4 em sua composição, sendo esta composição bem menor do que no óleo da microalga. Este inconveniente era esperado, pois era impossível ter um óleo sintético idêntico ao da microalga, mas sim uma aproximação.

Os resultados obtidos com o óleo sintético deram uma noção do que deveria-se esperar para o óleo extraído da microalga *Desmodesmus* sp. Com o estudo das variáveis da reação de transesterificação com o óleo sintético também foi possível escolher a catálise da reação, optando-se pela ácida e o álcool escolhido foi o etanol, pela performance e porque é possível obtê-lo de recursos renováveis. A partir do planejamento de experimentos foram determinadas as melhores condições de operação para a transesterificação ácida, encontrando os valores ótimos das variáveis de operação: porcentagem de catalisador de 10%, relação óleo:álcool de 1:35 mol/mol, temperatura de 60°C e tempo da reação de 24 horas. Este resultado foi extremamente relevante já que, nestas condições, é possível produzir até 90% de ésteres etílicos com o óleo sintético.

5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Já que os estudos de produção de biodiesel a partir de óleo de microalga são relativamente novos, muitos aspectos precisam ser estudados mais profundamente com a finalidade de diminuir os custos e aumentar a produtividade.

Espécie de microalga: encontram-se na atualidade milhões de espécies de microalgas que são oleaginosas, as quais contêm maior porcentagem de lipídios nas suas células. Testar diferentes espécies.

Meio de cultivo: testar diferentes meios de cultivo como o BOLD, BBM, dentre outros.

Fotobiorreator: testar com fotobiorreatores equipados com controle das variáveis como pH, temperatura e nutrientes.

Sistema de cultivo: estudar mais a fundo o crescimento mixotrófico e heterotrófico com fontes de carbono: glicose, glicerol, acetato, frutose, lactose, xilose, sacarose, arabinose, dentre outras.

Recuperação da biomassa: usar diferentes métodos para a recuperação da biomassa como sedimentadores, floculantes, dentre outros.

Extração de lipídios: testar diferentes solventes, diferentes métodos de extração: extração supercrítica, ultrassom, micro-ondas, pressão, entre outros.

Integração de processos: atualmente, é fundamental para que um processo industrial se torne economicamente viável. Várias partes das microalgas podem ser aproveitadas e criar uma integração de processos de produção de biodiesel, bioetanol, biogás e tratamento de efluentes. Isto é uma parte importante para se trabalhar futuramente já que, atualmente, é a única maneira de tornar o processo economicamente viável para competir com os biocombustíveis provenientes de óleos vegetais.

Produção de biodiesel: realizar reação *in situ*, ou utilizar processos em condições supercríticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J.; CID, A.; FIDALGO, P.; TORRES, E.; HERRERO, C. **Microalgas: cultivo y aplicaciones**, Monografias v. 26, Universidade da Coruña, 1995.

ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. R.; NAJAFI, G. Current biodiesel production technologies: A comparative review. **Energy Conversion and Management**, p. 138-148, 2012.

ADAMS, C.; GODFREY, V.; WAHLEN, B.; SEEFELDT, L.; BUGBEE, B.. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. **Bioresource Technology**. p 188-194, 2013.

AMERICAN OIL CHEMISTS'. **AOCS Ca-5a-40**: Free Fatty Acids. Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils. 1997.

AMERICAN OIL CHEMISTS'. **AOCS Ce-266**: Preparations of Methyl Esters of Fatty Acids. 1997.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D6751-11**. Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. USA, 2011.

ANP. AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS. **Boletim de 2010**, Boletim de maio de 2012. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=69916&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1393360190094>. Acesso em 13 jun. 2012.

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

ARDILA, YURANY CAMACHO. **Sistemas de extração líquido-líquido para processos de purificação de biodiesel**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação de Mestrado.

BANDEKAR J. Amide modes and protein conformation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1120, n.2, p. 123–143, 1992.

BARNES, P.J. Lipid Composition of Wheat Germ and Wheat Germ Oil. **European Journal Lipid Science and Technology**, v. 84, n. 7, p. 256-269, 1982.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. NY: Cambridge University Press, 1994.

BELARBI, E.H.; MOLINA, E.; CHISTI, Y. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 26, n. 7, p. 516-529, 2000.

BENEMANN, J.R.; VAN OLST, J.C.; MASSINGILL, M.J.; WEISSMAN, J.C.; BRUNE, D.E. The controlled eutrophication process: using microalgae for CO₂ utilization and agricultural fertilizer recycling. In: **Greenhouse Gas Control Technologies - 6th International Conference II**, v. II, p.1433–1438, Kyoto, Japan, 2003.

BIODIESEL TIMES. **Biodiesel**. Outubro de 2005. Disponível em: <<http://biodiesel.rain-barrel.net/biodiesel/>> Acesso em 2009.

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

BRANDÃO, M.C. **Desenvolvimento tecnológico da biomassa: Síntese e avaliação de biocombustíveis de segunda geração e aditivos melhoradores de cetano.** João Pessoa, Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba. 2011. Dissertação de Mestrado.

BRITISH PETROLEUM. **BP Statistical Review.** Disponível em: <<http://www.bp.com/en/global/corporate/about-bp/statistical-review-of-world-energy-2013/2012-in-review.html>> Acesso em jul. de 2012.

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N. A.; ROESCH, L. F.; JACQUES, R. J. S.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O. C.; BENTO, F. M. Impact of biodiesel biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 01, p. 172-178, 2011.

CAMPESTRE IND. E COM. DE ÓLEOS VEGETAIS LTDA. **Especificações técnicas de óleos.** Disponível em: <www.campestre.com.br> Acesso em jun. 2010.

CHAN YOO; SO-YOUNG JUN; JAE-YON LEE; CHI-YONG AHN; HEE-MOCK OH. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v.101, p. 571-574, 2010.

CHAPMAN D.; WILLIAMS R.M.; LADBROOKE B.D. Physical studies of phospholipids. VI Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins). **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 1, n.5, p.445-475, 1967.

CHEN, W.; ZHANG, C.; SONG, L.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. **Journal of Microbiological Methods**, v.77, n.1, p. 41-47, 2009.

COHEN, Z. **Products from microalgae.** In: CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. (ed.) RICHMOND, A. E. CRC Press, Boca Raton, p. 421-454, 1986.

COSTA, G.M.; PAES, J.B.C.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu. *Ceres*, v. 53, n. 308, p. 463-470, 2006.

CURADO, R. E. **Análise dos efeitos da privação de nitrogênio da microalga *Neochloris oleoabundans*, visando à produção de cadeias carbônicas lipídicas.** Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2011. Dissertação de Mestrado

DA SILVA, M. C., J. NEUZA, A.M. RAUEN DE OLIVEIRA, E E. VICENTE. Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração em óleos de fritura. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 956-961, 2008.

DA SILVA, NIVEA. **Otimização das variáveis de processo da transesterificação (etanólise) do óleo de mamoma: Produção de biodiesel.** Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Dissertação de Mestrado

DA SILVA, NIVEA. **Produção de biodiesel: processo e caracterizações.** Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Tese de Doutorado.

DANTAS, M. B.; CONCEIÇÃO, M. M.; FERNANDES JR, V. J.; SANTOS, N.A.; ROSENHAIM, R.; MARQUES, A.L.B.; SANTOS, I. M.G.; SOUZA, A.G. Thermal and kinetics study of corn biodiesel obtained by the methanol and ethanol routes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 87, n. 3, p. 835–839, 2007.

DANTAS, T. **Otimização das variáveis de processo da transesterificação do óleo de soja e milho: produção de biodiesel em uma coluna de pratos perfurados.** Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011, Dissertação de Mestrado.

DARNOKO, D.; CHEYRAN, M. Continuous Production of Palm Methyl Esters. *JAACS*, v. 77, n. 12, p. 1269-1272, 2000.

DE ALMEIDA, A.A.F., **Avaliação da oxidação do biodiesel etílico de milho por meio de técnicas espectroscópicas**. João Pessoa, Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 2007, Dissertação de Mestrado.

DE ALMEIDA, J. K. P.; NUNES, G.P.; TEXEIRA, C.C.; RODRIGUES, D.; DE MELO, J.R. Caracterizações de óleos vegetais utilizados para produção de biodiesel com metodologias alternativas simples. In: XXXI Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Belo Horizonte, out. **Anais**. 2011.

DE-BASHAN, L.E.; HERNANDEZ, J.P.; MOREY, T.; BASHAN, Y. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. **Water Research**, v. 38, n. 2, p. 466-474, 2004.

DOS SANTOS, R. E.; GATTI, A.L.F.; ASSAD FILHO, N.; COELHO, T.M. Processo de refinamento do óleo de abacate para uso comestível. In: V Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. Maringá. **Anais**, 2007.

EHIMEN, E.A.; SUN, Z.F.; CARRINGTON, C.G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v. 89, n.3, p. 677-684, 2010.

ELSEY, D.; JAMESON, D.; RALEIGH, B.; COONEY, M.J. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 3, p. 639-642, 2007.

EN. EUROPEAN STANDARDS. EN 14214. Standar-especifications and the test methods, 2003.
FAPRI. U.S. AND WORLD AGRICULTURAL OUTLOOK. **FAPRI Staff Report 10-FSR 1**, University of Missouri-Columbia, Ames, Iowa: Food and Agricultural Policy Research Institute, 2010.

FERREIRA, M.S. **Formulação de combustíveis alternativos em sistemas microemulsionados empregando óleos vegetais e derivados**. São Luis, Centro de ciências exatas e tecnologia. Universidade Federal do Maranhão, 2006. Dissertação de Mestrado.

FRANCISCO, E. C. **Biofixação de dióxido de carbono por microalgas acumuladoras de materiais graxos**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Dissertação de Mestrado.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R.O.; PRYDE, E.H. Transesterification Kinetics of Soybean Oil. **JAOCs**, v. 63, n. 10, p. 1375-1380, 1986.

GONZALEZ, J. A. **Determinação experimental dos dados cinéticos da reação de transesterificação de óleos vegetais**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação de Mestrado.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A.C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, p. 269–274, 2009.

GRABOSKY, M.; McCORMICK, R. Combustion of fat and vegetable oils derived fuels in diesel engines. **Prog Energy Combust Sci**, v. 24, n. 2, p. 125-164, 1998.

GUI, M.M.; LEE, K.T.; BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs non-edible oil vs waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**, v. 33, n. 11, p. 1646-1653, 2008.

GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. In: SMITH, M. H. (Eds.), por Culture of Marine Invertebrate Animals, p. 29-60. New York, 1975.

GUILLARD, R.; E J. RYTHER. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. **Canadian journal of microbiology**, v.8, p. 229-239, 1962.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. **Algaebase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2013. Disponível em < <http://www.algaebase.org/>> Acesso em: 31 de jan. 2013.

GUIRY, M.D. HOW MANY SPECIES OF ALGAE ARE THERE? **J.Phycol**, v. 48, n. 5, p. 1057-1063, 2012.

HAAS, M.J.; WAGNER, K. Simplifying biodiesel production: The direct or in situ transesterification of algal biomass. **J. Lipid Sci. Technol**, v. 113, n. 10, p. 1219-1229, 2011.

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

HALIM, R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 178-185, 2011.

HARTMANN, L.; LAGO, R.C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 26, n. 6 p. 475-476, 1973.

HINENO, M. Infrared spectra and normal vibrations of beta-D-glucopyranose. **Carbohydrate Research**, v.56, n. 2, p. 219-227, 1977.

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

HOSIKIAN, A.; LIM, S.; HADILM, R.; DANQUAH, M.K. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. **International Journal of Chemical Engineering**, p. 1-11, 2010.

HOSSAIN, S. A.B.M.; SALLEH, A.; BOYCE, A.N.; CHOWDHURY, P.; NAQUIUDDIN, M. Biodiesel Fuel Production form Algae as Renewable Energy. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 250-254, 2008.

HU, G; FAN, Y; ZHANG, L; YUAN, C; WANG, J; LI, W; HU, Q; LI F. Enhanced Lipid Productivity and Photosynthesis Efficiency in a *Desmodesmus* sp. Mutant Induced by Heavy Carbon Ions. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-8, 2013.

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

INDEXMUNDI. **index mundi**. Disponível em < <http://www.indexmundi.com/pt/pre%E7os-de-mercado/?mercadoria=petr%C3%B3leo-bruto>> Acesso em jun. 2013.

ISLAM, M. A.; AYOKO, G. A.; BROWN, R.; STUART, D.; HEIMANN, K. Influence of Fatty Acid Structure on Fuel Properties of Algae Derived Biodiesel. **Procedia Engineering**, v. 56, p. 591-596, 2013.

JIANG, Y.; CHEN, F.; LIANG, SHI-ZHONG. Production potential of docosahexaenoic acid by heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. **Process Biochemistry**, v. 4, n. 6-7, p. 633-637, 1999.

JITPUTTI, J.; KITTIYANAN, B.; RANGSUNVIGIT, P.; BUNYAKIAT, K.; ATTANATHO, L.; JENVANITPANJAKUL, P. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalyts. **Chemical Engineering Journal**, v. 116, n. 1, p. 61-66, 2006.

KARMEE, S.K.; MAHESH, P.; RAVI, R.; CHADHA, A. Kinetic Study of the Base-Catalyzed Transesterification of Monoglycerides from *Pongamia* Oil. **JAACS**, v. 81, n. 5, p. 425-430, 2004.

KAUR, S.; SARKAR, M.; SRIVASTAVA, R.B; GOGOI, H.K.; KALITA, M.C. Fatty acid profiling and molecular characterization of some freshwater microalgae from India with potential for biodiesel production. **New Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 332-344, 2012.

KIRROILA, A.; BISHNOI, N.R.; SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 20, p. 642-656, 2013.

KLEIN, B. **Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2013. Dissertação de Mestrado.

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K.R. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. **Fuel**, v. 84, n. 9. p. 1059-1065, 2005.

KUSDIANA, D.; SAKA, S . Kinetics of Transesterification in Rapeseed Oil to Biodiesel Fuel as Treated in Supercritical Methanol. **Fuel**, v. 80, n. 6, p. 693-698, 2001.

LEE, Jae.-YON; YOO, C.; JUN, So.-YOUNG; AHN, Chi.-YONG; OH, Hee.-MOCK. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n.1, p. 575-577, 2010.

LEE, Y. K. **Algal nutrition**: heterotrophic carbon nutrition. In: Handbook of Mass Culture: biotechnology and applied phycology, por Amos Richmond, 116-124. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

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

LEUNG, D.Y.C.; WU, X; LEUNG, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.

LI, Y., M.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C.Q.; DUBUOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, n.4, p. 815-820, 2008.

LI, Y.; SHUANG, L.; TONG, D.; SONG, R.; YANG, W.; FAN, Y.; QING, R.; HU, C. One-step production of biodiesel from *Nannochloropsis* sp. on solid base Mg-Zr catalyst. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3313-3317, 2011.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v.70, n.1, p. 1-15, 1999.

MACHADO, A. **Produção de biodiesel: processo e caracterizações**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Tese de Doutorado.

MARTINEZ, E. L. **Desenvolvimento e avaliação de microreatores: aplicação para produção de biodiesel**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Dissertação de Mestrado.

MATA, T.; 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.

MEIER, R. L. **Biological cycles in the transformation of solar energy into useful fuels**. In: *Solar Energy Research*, Duffie Daniels, 179-183. Wisconsin: J.A. (Eds.) Madison University Wisconsin Press, 1955.

MIRANDA, J. **Criação do banco de dados, simulação e análise energética do processo de produção do biodiesel de soja, mamona e pinhão manso.** Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011. Dissertação de Mestrado.

MORALES-SANCHEZ, D.; TINOCO-VALENCIA, R.; KYNDT, J.; MARTINEZ, A. Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, n 100, p. 1-12, 2013.

MORESCO, C.; BUENO, N.C. Scenedesmaceae (Chlorophyceae-Chlorococcales) de um lago artificial urbano: *Desmodesmus* e *Scenedesmus*. **Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 289-296, 2007.

NAIK, S.N.; GOUD, V.V.; ROUT, P.K.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.

NINGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52-68, 2011.

NOOR LIDA, H.M.D.; SUNDRAM, K.; SIEW, W.L.; AMINAH; A.; MAMOT, S. TAG Composition and Solid Fat Content of Palm Oil, Sunflower Oil, and Palm Kernel Olein Blends Before and After Chemical Interesterification. **JAACS**, v. 79, n. 11, p. 1137-1144, 2002.

NORTON, T. A.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R. A. Algal biodiversity. **Phycologia**, v. 35, n. 4, p. 308-326, 1996.

NUERNBERG, K.; FISCHER, K.; NUERNBERG, G.; KUECHENMEISTER, U.; KLOSOWSKA, D.; ELIMINOWSKA-WENDA, G.; FIEDLER, I.; ENDER, K. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. **Meat Science**, v.70, n. 1, p. 63-74, 2005.

PACKER, M. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. **Energy Policy**, v. 37, n. 9, p. 3428-3437, 2009.

PAN, Y.Y.; WANG, S.T.; CHUANG, L.T.; CHANG, Y.W.; NATHAN CHEN, C.N. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. **Bioresource Technology**, v. 102, n.22, p. 10510-10517, 2011.

PARENTE, E.J. **Biodiesel**: Termos de referência do programa de implusão e difusão tecnológica. Programa de Impulsão e Difusão Tecnológica do BioDiesel, 2003.

PARKER, T.D., D.A. ADAMS, K. ZHOU, M. HARRIS, e L. Y U. Fatty Acid Composition and Oxidative Stability of Cold-pressed Edible Seed Oils. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 4, p. 1240-1243, 2003.

PETROBRAS. **Microalgas geram maior produtividade e sustentabilidade na cadeia do biodiesel**. Blog da Petrobras 5 jul. 2013. Disponível em: <<http://fatosedados.blogspetrobras.com.br/2013/07/05/microalgas-geram-maior-produtividade-e-sustentabilidade-na-cadeia-do-biodiesel/#sthash.fnN0dwli.dpuf>> Acesso em: 13 dez. 2013.

PISTORIUS, A. M.A.; DEGRIP, W.J.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T.A. Monitoring of Biomass Composition from Microbiological Sources by Means of FT-IR Spectroscopy. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, v.1, p. 123-129. 2009.

PORTAL BRASIL. **Portal Brasil**. 6 nov. 2012. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2012/11/aumento-na-producao-de-biodiesel-exigira-novas-materias-primas>>. Acesso em: 6 jun. 2013.

PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P.K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 24, p. 159-171, 2013.

PULZ, O.; WOLFGANG, G. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

RAMOS, L.P.; KUCEK, K.T.; DOMINGOS, A.K.; WILHELM, H.M. **Resol.** s.d. Disponível em <www.resol.com.br> Acesso em 2013.

RAVEN, J.A. Limits to growth. **Microbial Biotechnology**. Cambridge University: BOROWITZKA, L. J. (Eds.), 1988.

REN21. RENEWABLES 2012. **Global Status Report**. Disponível em <http://www.ren21.net/Portals/0/documents/Resources/%20GSR_2012%20highres.pdf> Acesso em 6 fev. 2013.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, 2004.

RIOS, L. F. **Estudo do processo de destilação molecular para a obtenção de beta caroteno (pró-vitamina A) a partir do óleo de palma**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas 2010. Dissertação de Mestrado.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RITCHIE, R. J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. **Photosynthesis Research**, v. 86, p. 27-41, 2006.

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI N.; BONINI G.; TREDICI, MR. Microalgae for Oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100-112, 2009.

RODRIGUEZ, J. K. **Síntese de biodiesel a partir de óleo de mamona empregando etanol subcrítico**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011. Dissertação de Mestrado.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L.G.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 58-64, 2010.

SAMORI, G.; SAMORI, C; GUERRINI, F; PISTOCCH, R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water Research**, v. 47, n.2, p. 791-801, 2013.

SANTANA, A. **Desenvolvimento do processo de obtenção do biodiesel de microalga *botryococcus braunii* por transesterificação supercrítica**, Projeto Fapesp em andamento. 2011

SANTANA, G. C. **Simulação e análise de custos na produção de biodiesel a partir de óleos vegetais**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008. Tese de Doutorado.

SANTANDER, C. M. **Modelagem e simulação de uma planta de destilação reativa para a produção de biodiesel**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Dissertação de Mestrado.

SANTORI, G.; DI NICOLA, G.; MOGLIE, M.; POLARANA, F. A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. **Applied Energy**, v. 92, p. 109-132. 2012

SANTOS DE JESUS, S. **Projeto e construção de um Fotobiorreator airlift agitado para a produção de biodiesel**. Projeto Fapesp em andamento, 2010.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. **A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from Algae**. Golden, Colorado: U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development, National Renewable Energy Laboratory. 1998.

SINGH, S.P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 200-216, 2010.

SPOLAOREA, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n.2, p. 87–96, 2006.

TABERNERO, A.; MARTÍN DEL VALLE, E. M.; GALÁN, M.A. Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 104-115, 2012.

TEWARI, J.; IRUDAYARAJ, J. Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.11, p. 3237-3243, 2004.

TOMASELLI, L. The Microalgal Cell. In: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Publishing Ltd. 2007. p. 1-19.

TRAJANO, M. F.; MELLO, V. S.; FAUSTINO, L.S.M.; MOTTA, J.M.; CARNEIRO, K.A.A. Reaproveitamento da Semente de Maracujá para Biocombustíveis. In: 2º Simpósio Nacional de Biocombustíveis. **Anais**. Recife, 2009.

UTEX. **The culture collection of algae**. Austin, The University of Texas at. 2013. Disponível em: < <http://web.biosci.utexas.edu/utex/media.aspx>>. Acesso em 14 fev. 2013.

VALDERRAMA, L. T.; DEL CAMPO, C. M.; RODRIGUEZ, C.M.; de-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric production using the microalgae *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. **Water Research**, v. 36, n.17, p. 4185-4192, 2002.

VELICHKOVA, K.; SIRAKOV I.; GEORGIEV, G. Cultivation of *Brotryococcus braunii* strain in relation of its use for biodiesel production. **J. BioSci. Biotech**, p. 157-162, 2012.

WANG, H.; XIONG, H.. HUI, Z.; ZENG, X. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggyery wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, v.104, p. 215-220, 2012.

WANG, Y.; OU,S.; LIU, P.; ZHANG, Z. Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process. **Energy Conversion and Management**, v. 48, n. 1, p, 184-188, 2007.

WEN, ZHI-YOU; CHEN, FENG. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances** , v. 21, n. 4, p. 273–294, 2003.

YEN, G.C. Influence of Seed Roasting Process on the Changes in Composition and Quality of Sesame (*Sesame indicum*) Oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 50, n.4, p. 563-570, 1990.

YUSUF, N.N.A.N.; KAMARUDIN, S.K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. **Energy Conversion and Management**. v, 52, n. 7, p. 2741-2751, 2011.