UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

PATRÍCIA CAROLINE MOLGERO DA RÓS

Avaliação de Óleos de Cianobactérias como Matéria-Prima Lipídica para
Síntese de Biodiesel pela Rota Etílica

Lorena – SP
2012

PATRÍCIA CAROLINE MOLGERO DA RÓS

Avaliação de Óleos de Cianobactérias como Matéria-Prima Lipídica para Síntese de
Biodiesel pela Rota Etílica

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Industrial na área de concentração:
Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Versão original

Lorena – SP
Julho, 2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Da Rós, Patrícia Caroline Molgero

Avaliação de óleos de cianobactérias como matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel pela rota etílica / Patrícia Caroline Molgero Da Rós. – 2012.

175 p. : il.

Tese (Doutora em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2012.

Orientadora: Heizir Ferreira de Castro

1. Biodiesel 2. Micro-organismos fotossintéticos 3. Catálise heterogênea 4. Etanol. I. Título. II. Castro, Heizir Ferreira de, orient.

662.756 - CDU

Dedicatória

*Aos meus amados avós: Erlindo e Iria,
por serem exemplos de vida, sabedoria, honestidade e respeito,
por estarem presentes em cada etapa da minha vida, mesmo que distantes,
pelo amor, carinho e conselhos
por serem os anjos que DEUS colocou em meu caminho...*

*Aos meus pais: Roseli e José Carlos,
por terem me concedido a vida,
por cada palavra dita, cada ensinamento, cada carinho retribuído,
por me possibilitarem a realização deste sonho,
pelo incentivo, paciência, compreensão e companheirismo,
pelo privilégio de ser sua filha...*

*À minha linda irmã Jéssica,
por ser minha companheira sempre,
pela doçura de suas palavras nos momentos difíceis,
pelo carinho, amizade e confiança...*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho e guiar minha vida, tornando possível a realização desta conquista. Obrigado Senhor, por ter me concedido forças e capacidade em todos os momentos difíceis.

À Prof^a Dra. Heizir Ferreira de Castro, minha orientadora. Obrigada pela excelente orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço pela amizade, paciência, dedicação, conselhos, sugestões e acima de tudo por estar ao meu lado sempre que precisei de seu apoio.

Aos meus amados avós, Erlindo e Iria, que apesar da distância e saudade, sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, incentivando e me dando todo amor e carinho.

Aos meus pais, Roseli e José Carlos, que mesmo distantes, estiveram presentes em todos os momentos ao longo dessa trajetória. Além de pais, são meus exemplos de vida, amigos e companheiros que sempre me incentivaram na busca de meus sonhos, por mais difíceis que eles sejam. Agradeço pela excelente educação, amor, carinho e conselhos.

À minha querida irmã Jéssica, pelo amor, carinho, amizade, paciência, companheirismo e momentos de descontração. Obrigada pelas lindas mensagens de carinho e apoio ao longo dessa caminhada. Agradeço a Deus por ter me dado você de presente.

Ao meu namorado Juliano, pelo amor, amizade, paciência, carinho e companheirismo. Agradeço por estar sempre ao meu lado, me ajudando, me apoiando e me fazendo feliz.

Ao Prof Dr. Ernandes Benedito Pereira, que além de ser meu grande amigo é um exemplo de vida. Obrigada por acreditar em mim, me apoiar e incentivar sempre.

À Prof^a Dra. Marli de Fátima Fiore (CENA/USP), por ter concedido as linhagens de cianobactérias usadas neste trabalho, pelo auxílio e aprendizado durante toda etapa de cultivo.

À todo pessoal do CENA/USP, em especial Dra. Caroline Pamplona da Silva e Dra. Estela Stenico Silva, por terem me recebido de portas abertas, por todos os ensinamentos durante toda etapa de cultivo das cianobactérias e por estarem sempre dispostas a me ajudar.

Ao Prof. Pedro e Prof. Júlio pelas sugestões e contribuições neste trabalho.

Aos meus queridos amigos presentes e que já fizeram parte do laboratório de Biocatálise Ana Karine, Larissa, Grazy, Ariela, Gisele, Weriton, William, Daniel, Layne, Bruno, Aline, Natália, Márcio pela amizade, convivência, companheirismo. Agradeço de coração todos os conselhos, ajuda, apoio e os momentos de descontração durante toda etapa deste trabalho.

Aos meus familiares, pelo incentivo, apoio e carinho.

Aos meus amigos/irmãos que conheci ao longo dessa caminhada: Juliana, Joana, Laila, Alegria, Camila e Fernanda, que estiveram comigo durante a realização deste trabalho.

Agradeço pelos momentos de alegria e boas risadas, pela amizade sincera, motivação e carinho.

A todos os professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena, que contribuíram para a concretização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido.

À todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

DA RÓS, P. C. M. **Avaliação de Óleos de Cianobactérias como Matéria-Prima Lipídica para Síntese de Biodiesel pela Rota Etílica.** 2012. 175p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2012.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o óleo produzido por cianobactérias como matéria-prima lipídica para sintetizar biodiesel pela rota etílica empregando catalisadores heterogêneos. Cinco linhagens de cianobactérias não produtoras de toxinas: *Microcystis aeruginosa* NPCD-1, *Synechococcus* sp. PCC7942, *Chlorogloea* sp. CENA170, *Leptolyngbya* sp. CENA104 e *Trichormus* sp. CENA77 foram inicialmente cultivadas e avaliadas, tomando por base parâmetros como: produtividade de biomassa celular, teor de lipídeo e composição em ácidos graxos. Os valores mais elevados de produtividade celular e de lipídeo foram obtidos para as linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942. As matérias-primas lipídicas oriundas das linhagens selecionadas foram ainda caracterizadas quanto as propriedades reológicas (viscosidade), térmicas (termogravimetria) e químicas (espectroscopia na região de infravermelho). Na etapa seguinte, as condições de cultivo das linhagens foram estudadas e otimizadas por meio de um planejamento fatorial avaliando as variáveis intensidade luminosa (50 a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e concentração de Na_2CO_3 ($0,5$ a $1,5 \text{ g/L}$), considerando como variáveis resposta a produtividade celular e o teor de lipídeo. A análise estatística indicou que a intensidade de luz influenciou positivamente os valores de produtividade celular para todas as linhagens estudadas, enquanto a concentração de Na_2CO_3 influenciou negativamente apenas no cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1. Com relação à variável teor de lipídeo, para a linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 nenhuma variável apresentou significância dentro da faixa estudada. No entanto, para as outras linhagens, o emprego das variáveis estudadas nos níveis mais altos implicou valores mais elevados para o teor de lipídeo. Definidas as condições ótimas de cultivo, o trabalho foi direcionado para execução da reação de interesse do projeto, empregando dois catalisadores heterogêneos de comprovada potencialidade: óxido de nióbio impregnado com sódio (químico) e Novozym 435® (bioquímico). Os resultados obtidos demonstraram que ambos os catalisadores atuaram de forma eficiente, convertendo os ácidos graxos em seus respectivos ésteres de etila. Entretanto, a qualidade da biomassa (índice de acidez e presença de pigmentos) interferiu a atuação dos catalisadores de maneira diferenciada. Enquanto o catalisador químico foi sensível à presença de níveis elevados de acidez, como constatado no óleo de *Trichormus* sp. CENA77, o catalisador bioquímico pode ter adsorvido os pigmentos presentes em maior quantidade nessa matéria-prima, reduzindo sua atividade catalítica. Desta forma, com exceção do biodiesel dessa matéria-prima lipídica, parâmetros, tais como número de cetano, ponto de entupimento de filtro a frio, índice de saponificação e índice de iodo, foram estimados por modelos teóricos, visando à predição da qualidade do biodiesel obtido dos diferentes óleos de acordo com as especificações estabelecidas pelas normas oficiais. Do ponto de vista geral, os resultados obtidos neste trabalho foram promissores e demonstraram a potencialidade do uso de cianobactérias como fonte de matéria-prima lipídica na síntese de biodiesel. As amostras de biodiesel das biomassas lipídicas de *Microcystis aeruginosa* NPCD-1 e *Synechococcus* sp. PCC7942 obtidas pela catálise heterogênea química atenderam as especificações estabelecidas na ANP como biocombustível.

Palavras chave: Biodiesel. Micro-organismos fotossintéticos. Catálise heterogênea. Etanol.

ABSTRACT

DA RÓS, P. C. M. **Evaluation of Cyanobacteria Oil as Lipid Feedstock for Biodiesel Synthesis by Ethanol Route.** 2012. 175p. Thesis (Doctor of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2012.

The main goal of this study was to evaluate the lipid extracted from cyanobacteria as feedstock source for the synthesis of biodiesel using heterogeneous catalysis and ethanol as acyl acceptor. Five cyanobacterial non-microcystin producer strains: *Microcystis aeruginosa* NPCD-1; *Synechococcus* sp. PCC7942; *Chlorogloea* CENA170; *Leptolyngbya* CENA104 and *Trichormus* sp. CENA77 were cultivated and evaluated taking into account the biomass productivity, lipid content and fatty acid composition. Results indicated that *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 and *Synechococcus* sp. PCC7942 gave the best set of parameters and were selected for further characterization using analytical techniques, including: viscosimetry, thermogravimetry and infrared spectroscopy. Following this, the cultivation conditions were studied and optimized using a factorial design, taking into consideration as independent variables light irradiance (50 to 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and concentration of Na_2CO_3 (0.5 to 1.5 g/L) as a carbon source. Cell productivity and lipid content were taking as response variables. For all strains, the most important factor was the light irradiance, since it presented a significant effect for all responses. Depend on the cyanobacteria strain, the concentration of Na_2CO_3 was found to have either positive or negative influence on the response variables. While for the *M. aeruginosa* NPCD-1 the presence of the Na_2CO_3 in the culture medium negative affected both cell productivity and lipid level, for the other strains high levels of Na_2CO_3 increase the lipid levels. After establishing the optimum cultivation conditions the experimental work was directed towards to perform the reaction of interest, using cyanobacterial feedstocks and two heterogeneous catalysts: chemical (niobium oxide impregnated with sodium) and biochemical (Novozym 435®). The dataset obtained demonstrated that the formation of ethyl esters from the feedstocks was feasible for the tested catalysts. Both catalysts were efficient in converting all fatty acids present in the feedstocks into the corresponding ethyl esters; however the chemical catalyst gave higher conversion than the biochemical one. The lower quality of the *Trichormus* sp. CENA77 feedstock strong affected the performance of the catalysts in a different way. While the chemical catalyst was sensitive to high acidity level verified in this microbial oil, the biocatalyst performance was influenced by the presence of pigments which was adsorbed on the biocatalyst matrix reducing its catalytic activity. Except for this oil, parameters such as cetane number, cold filter plugging point, saponification number and iodine value were estimated by theoretical models to predict the quality of biodiesel according to the specifications established by official standards. The results obtained in this study were promising and demonstrated the potential of using cyanobacteria as a feedstock source in the biodiesel synthesis. The lipid biomass from *M. aeruginosa* NPCD-1 and *Synechococcus* sp. PCC7942 originated biodiesel samples with appropriate characteristics to be used as fuel that are in accordance with specifications recommended by ANP.

Key words: Biodiesel. Photosynthetic microorganisms. Heterogeneous catalysis. Ethanol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Comparação entre catalisadores homogêneos e heterogêneos usados para produção de biodiesel.	30
Tabela 3.2 Exemplos de catalisadores heterogêneos usados na produção de biodiesel.	31
Tabela 3.3. Comparação das vantagens e desvantagens do etanol e metanol como agente acilante na obtenção de biodiesel.....	32
Tabela 3.4. Comparação da produção do biodiesel a partir de óleos vegetais e microalgas e/ou cianobactérias.....	36
Tabela 3.5. Comparação de algumas fontes de matérias-primas lipídicas para produção de biodiesel.....	38
Tabela 3.6. Toxinas produzidas por cianobactérias.....	43
Tabela 3.7. Vantagens e desvantagens dos métodos de separação da biomassa.	53
Tabela 3.8. Comparação entre plantas e micro-organismos fotossintetizantes como fonte de material de alto teor lipídico para geração de biodiesel.....	56
Tabela 3.9. Teor de óleo de algumas microalgas.....	58
Tabela 3.10. Teor de lipídeos (%) produzido por diferentes linhagens de cianobactérias.	59
Tabela 3.11. Exemplos representativos de composição de ácidos graxos de cianobactérias.	59
Tabela 3.11. Processos de obtenção de biodiesel empregando microalgas e cianobactérias como fonte de lipídeo	71
Tabela 3.11. (continuação) Processos de obtenção de biodiesel empregando microalgas e cianobactérias como fonte de lipídeo.....	72
Tabela 3.11. (continuação) Processos de obtenção de biodiesel empregando microalgas e cianobactérias como fonte de lipídeo.....	73
Tabela 3.11. (conclusão) Processos de obtenção de biodiesel empregando microalgas e cianobactérias como fonte de lipídeo.....	74
Tabela 4.1. Linhagens de cianobactérias selecionadas para desenvolvimento deste trabalho	76
Tabela 4.2. Disposição das lâmpadas e intensidade luminosa emitida na câmara de cultivo.	78
Tabela 4.3. Níveis reais e codificados para as variáveis: nitrogênio e fósforo avaliados segundo planejamento fatorial 2 ²	81
Tabela 4.4. Níveis reais e codificados para as variáveis: intensidade luminosa e fonte de carbono inorgânico (Na ₂ CO ₃) no cultivo das cianobactérias <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 avaliados segundo planejamento fatorial 2 ²	83
Tabela 5.1. Descrição das linhagens previamente selecionadas a serem testadas como fonte de matéria-prima na síntese de biodiesel.....	92
Tabela 5.1. (conclusão) Descrição das linhagens previamente selecionadas a serem testadas como fonte de matéria-prima na síntese de biodiesel.	93
Tabela 5.2. Produtividade de biomassa, teor de lipídeos e produtividade lipídica das linhagens de cianobactérias selecionadas.	94
Tabela 5.3. Perfil de ácidos graxos (%) presente nas biomassas lipídicas produzidas pelo cultivo das linhagens de cianobactérias	98

Tabela 5.4. Desempenho das linhagens de cianobactérias: <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Synechococcus</i> sp. e <i>Trichormus</i> sp CENA77 cultivadas sob maior intensidade luminosa	100
Tabela 5.5. Valores de viscosidade e coeficiente de ajuste dos dados a lei de potência ...	102
Tabela 5.6. Matriz experimental e resultados obtidos pelo planejamento fatorial 2 ² utilizado para otimizar as variáveis: nitrogênio e fósforo no meio de cultivo ASM-1.....	106
Tabela 5.7. Estimativas dos efeitos das variáveis, erros padrão, valores de t e p para a produtividade celular obtida em 8 dias de cultivo.	107
Tabela 5.8. Análise de variância (ANOVA) para os resultados de produtividade celular obtida em 8 dias de cultivo.	107
Tabela 5.9. Confirmação do modelo estatístico obtido (+N e +P): produtividade celular e teor de lipídeos obtidos ao final de 8 dias de cultivo.....	108
Tabela 5.10. Comparação de diferentes métodos de extração de lipídeos empregando a biomassa celular de <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1.....	110
Tabela 5.11. Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial 2 ² utilizado para otimizar as variáveis independentes: intensidade de luz (X ₁) e concentração de Na ₂ CO ₃ (X ₂) no meio de cultivo.....	113
Tabela 5.12. Análise de variância (ANOVA) usando o programa Design expert para a variável resposta produtividade celular (mg/L/dia) obtida ao final do cultivo da linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, ao nível de confiança de 90 %.....	115
Tabela 5.13. Análise de variância (ANOVA) usando o programa Design expert para a variável resposta produtividade celular (mg/L/dia) obtida ao final do cultivo da linhagem <i>Trichormus</i> sp. CENA77, ao nível de confiança de 95%.	118
Tabela 5.14. Análise de variância (ANOVA) usando o programa Design expert para a variável resposta teor de lipídeo (%) obtida ao final do cultivo da linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, ao nível de confiança de 95%.	123
Tabela 5.15. Análise de variância (ANOVA) usando o programa Design expert para a variável resposta teor de lipídeo (%) obtida ao final do cultivo da linhagem <i>Trichormus</i> sp. CENA77, ao nível de confiança de 90%.	125
Tabela 5.16. Análise de variância (ANOVA) usando o programa Design expert para a variável resposta teor de lipídeo (%) obtida ao final do cultivo da linhagem <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942, ao nível de confiança de 90%.	127
Tabela 5.17. Comparação do desempenho das linhagens de cianobactérias: <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Synechococcus</i> sp. e <i>Trichormus</i> sp. CENA77 cultivadas sob diferentes condições	130
Tabela 5.18. Comparação do desempenho dos catalisadores heterogêneos na síntese de biodiesel a partir do material lipídico de cianobactérias pela rota etílica.	142
Tabela 5.19. Comparação das propriedades das amostras de biodiesel obtidas de diferentes linhagens de cianobactérias em relação ao óleo de palma.	144
Tabela 5.20. Quadro comparativo das propriedades das linhagens de cianobactérias testadas como fonte de matéria-prima lipídica neste trabalho	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Representação esquemática da reação global de transesterificação.....	27
Figura 3.2. Representação esquemática das etapas envolvidas na transesterificação.	28
Figura 3.3. Classificação dos processos de transesterificação (Fonte: Adaptado ATABANI et al., 2012).	29
Figura 3.4. Aparato fotossintético das cianobactérias	42
Figura 3.5. Desempenho atual da produção de biocombustíveis.....	67
Figura 3.6. Desempenho previsto para o futuro da produção de biocombustíveis.....	67
Figura 3.7. Sistema integrado para produção de biodiesel em larga escala empregando micro-organismos fotossintéticos como fonte de matéria-prima. (Adaptado Fonte: GONG; JIANG, 2011).....	68
Figura 4.1. Câmara de incubação	77
Figura 4.2. Frascos conectados por tubos de látex a membranas filtrantes: recebendo aeração	77
Figura 4.3. Bligh and Dyer.	79
Figura 4.4. Folch empregando banho de ultrassom.	79
Figura 4.5. Extração por micro-ondas.	79
Figura 4.6. Folch empregando ultrassom de sonda.	79
Figura 4.7. Esquema reacional das reações de síntese de biodiesel.	84
Figura 4.8. Reator de vidro utilizado para síntese de biodiesel.	84
Figura 4.9. Esquema reacional das reações de síntese de biodiesel por via química.	84
Figura 4.10. Região entre 4,35 a 4,05 ppm dos espectros simulados de RMN ¹ H dos TAG, DAG, MAG e ésteres etílicos.	87
Figura 4.11. Desdobramento dos picos de ressonância segundo a regra do n+1.....	88
Figura 4.12. Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio metilênicos do grupo etoxílico dos ésteres etílicos.....	88
Figura 5.1. Esquema das etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho experimental.	91
Figura 5.2. Composição em ácidos graxos (%) dos óleos de: <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1; <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942; <i>Chlorogloea</i> sp. CENA 170; <i>Trichormus</i> sp. CENA77; <i>Leptolyngbya</i> sp CENA104.	97
Figura 5.3. Viscosidade absoluta em função da taxa de deformação dos materiais lipídicos das biomassas de <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1 (a), <i>Trichormus</i> sp. CENA77 (b) e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 (c).....	102
Figura 5.4. Análise termogravimétrica (TGA) dos materiais lipídicos das biomassas de <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp.CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.	103

Figura 5.5. Espectro na região do infravermelho das matérias-primas lipídicas das linhagens: <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.....	105
Figura 5.6. Superfície de resposta para a produtividade celular (mg/L/dia) para um tempo de cultivo de 8 dias mostrando o efeito das variáveis: nitrogênio e fósforo.....	108
Figura 5.7. Produtividade de biomassa e teor de lipídeo obtido pela linhagem de <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1 cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo no meio ASM-1.	109
Figura 5.8. Testes de concentração de carbonato de sódio (g/L) no meio de cultura BG-11 com inóculo de <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 para selecionar melhor faixa de crescimento: A-0,02; B-0,1; C-0,2; D-1,0; E-2,0; F-4,0; G-8,0; H-10,0; I-14,0.....	111
Figura 5.9. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre a produtividade celular (mg/L/dia), produzida pelo cultivo da linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, para um nível de confiança de 90% ($p<0,1$).	114
Figura 5.10. Curvas de nível apresentada para a produtividade celular (mg/L/dia) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1.	116
Figura 5.11. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre a produtividade celular (mg/L/dia), produzida durante 10 dias de cultivo da linhagem <i>Trichormus</i> sp. CENA77, para um nível de confiança de 95% ($p<0,05$).	117
Figura 5.12. Superfície de resposta para a produtividade celular (mg/L/dia) mostrando o efeito das variáveis: intensidade luminosa e concentração de Na_2CO_3 no meio de cultivo da linhagem <i>Trichormus</i> sp. CENA77.	118
Figura 5.13. Curvas de nível apresentada para a produtividade celular (mg/L/dia) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem <i>Trichormus</i> sp. CENA77.	119
Figura 5.14. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre a produtividade celular (mg/L/dia), produzida pelo cultivo da linhagem <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942, para um nível de confiança de 95% ($p<0,05$).	120
Figura 5.15. Gráfico <i>square</i> para a produtividade celular (mg/L/dia) mostrando o efeito das variáveis: intensidade luminosa e concentração de Na_2CO_3 no meio de cultivo da linhagem <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.	120
Figura 5.16. Curvas de nível apresentada para a produtividade celular (mg/L/dia) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.	121
Figura 5.17. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre o teor de lipídeo (%) obtido ao final do cultivo da linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, para um nível de confiança de 95% ($p<0,05$).	122
Figura 5.18. Curvas de nível apresentada para o teor de lipídeo obtido (%) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1.	123
Figura 5.19. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre o teor de lipídeo (%) obtido ao final do cultivo da linhagem <i>Trichormus</i> sp. CENA77, para um nível de confiança de 90% ($p<0,1$).	124

Figura 5.20. Superfície de resposta para o teor de lipídeo (%) mostrando o efeito das variáveis: intensidade luminosa e concentração de Na_2CO_3 no meio de cultivo da linhagem <i>Trichormus</i> sp. CENA77.	125
Figura 5.21. Curvas de nível apresentada para o teor de lipídeo obtido (%) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem <i>Trichormus</i> sp. CENA77.....	126
Figura 5.22. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre o teor de lipídeo (%) obtido ao final do cultivo da linhagem <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942, para um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$).	126
Figura 5.23. Superfície de resposta para o teor de lipídeo (%) mostrando o efeito das variáveis: intensidade de luz e concentração de Na_2CO_3 no meio de cultivo da linhagem <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.	128
Figura 5.24. Curvas de nível apresentada para o teor de lipídeo obtido (%) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.	128
Figura 5.25. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação a partir do óleo de <i>M. aeruginosa</i> em presença de terc-butanol.....	130
Figura 5.26. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação a partir do óleo de palma em presença de terc-butanol.	130
Figura 5.27. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação a partir do óleo de <i>M. aeruginosa</i> em presença de iso-octano.	131
Figura 5.28. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação a partir do óleo de palma em presença de iso-octano.	131
Figura 5.29. Influência do tipo de solvente na síntese de biodiesel a partir do óleo de palma e etanol.	132
Figura 5.30. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação de etanólise do óleo de <i>Trichormus</i> CENA77.	133
Figura 5.31. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação de etanólise do óleo de palma.....	133
Figura 5.32. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação de etanólise do óleo de <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.	134
Figura 5.33. Ressonância magnética nuclear de prótons do biodiesel da biomassa de <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1.	137
Figura 5.34. Ressonância magnética nuclear de prótons do biodiesel da biomassa de <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.	137
Figura 5.35. Ressonância magnética nuclear de prótons do biodiesel da biomassa de <i>Trichormus</i> sp. CENA77.	138
Figura 5.36. Espectros na região do infravermelho das amostras de biodiesel oriundo das linhagens de <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.....	139
Figura 5.37. Análise termogravimétrica (TGA) das amostras de biodiesel oriundo das matérias-primas lipídicas de <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 via catálise química.	140

LISTA DE SIGLAS

OGR	Óleos e gorduras residuais
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
AGL	Ácidos graxos livres
CG	Cromatografia de fase Gasosa
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
PCC	Pasteur Culture Collection
IC	Índice de cetano
IS	Índice de saponificação
II	Índice de iodo
GI	Grau de instauração
FCC	Fator de comprimento da cadeia
PEFF	Ponto de entupimento de filtro a frio
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
TGA	Análise Termogravimétrica
RMN¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1. Cenário energético atual	25
3.2. Biodiesel	26
3.2.1. Agente acilante da reação: álcool	32
3.2.2. Matérias-primas lipídicas para produção de biodiesel.....	34
3.3. Potencial de micro-organismos fotossintéticos como fonte de matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel	36
3.3.1. Microalgas	36
3.3.2. Cianobactérias.....	39
3.3.2.1. Aparato fotossintético das cianobactérias.....	41
3.3.2.2. Toxinas produzidas pelas cianobactérias (cianotoxinas).....	42
3.4. Produção de biomassa de microalgas e cianobactérias: efeito das condições de cultivo sobre a produtividade e acúmulo de óleo pelas células	44
3.4.1. Comparação de diferentes condições de cultivo	46
3.4.2. Cultivo e produção em larga escala	47
3.4.2.1. Sistemas de lagoas abertas	47
3.4.2.2. Fotobiorreatores	48
3.4.3. Fatores que influenciam o crescimento dos micro-organismos fotossintéticos	50
3.5. Colheita e recuperação da biomassa celular	52
3.6. Extração de lipídeos das microalgas e cianobactérias	54
3.7. Acúmulo de lipídeos em microalgas e cianobactérias	55
3.7.1. Lipídeos de microalgas.....	57
3.7.2. Lipídeos de cianobactérias	58
3.8. Propriedades do biodiesel	60
3.9. Perspectivas futuras do biodiesel a partir de biomassa microbiana.....	65
3.10. Exemplos de síntese de biodiesel utilizando matéria-prima lipídica produzida por micro-organismos fotossintéticos	68
4. MATERIAIS E MÉTODOS	76
4.1. Materiais	76
4.1.1. Linhagens de cianobactérias	76
4.1.2. Catalisadores	76
4.1.3. Matérias-primas.....	76
4.1.4. Outros reagentes.....	77
4.2. Equipamentos.....	77
4.2.1. Câmara de cultivo.....	77
4.2.2. Outros Equipamentos	78
4.3. Procedimento experimental	78
4.3.1. Cultivo das cianobactérias	78
4.3.2. Extração de lipídeos	79
4.3.2.1. Método de “Bligh and Dyer” modificado	80
4.3.2.2. Método de Folch empregando banho de ultrassom.....	80
4.3.2.3. Método de extração por micro-ondas.....	80

4.3.2.4. Método de Folch empregando ultrassom de sonda	81
4.3.3. Otimização do meio de cultivo da cianobactéria <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1 empregando a metodologia de planejamento fatorial	81
4.3.4. Avaliação do crescimento das cianobactérias <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 cultivadas em meios com distintas concentrações de carbonato de sódio	82
4.3.5. Otimização da intensidade luminosa e fonte de carbono inorgânico no cultivo das cianobactérias <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 empregando a metodologia de planejamento fatorial	82
4.3.6. Síntese de Biodiesel	83
4.3.6.1. Síntese de biodiesel por catálise bioquímica	83
4.3.6.2. Síntese de biodiesel por catálise química	84
4.3.6.3. Recuperação e purificação do biodiesel obtido por catálise química	85
4.4. Metodologia Analítica	85
4.4.1. Caracterização das propriedades das matérias-primas lipídicas e biodiesel	85
4.4.1.1. Análise do perfil de ácidos graxos	85
4.4.1.2. Estudo reológico	85
4.4.1.3. Análise termogravimétrica (TGA)	86
4.4.1.4. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	86
4.4.2. Quantificação dos ésteres de etila	86
4.4.2.1. Ésteres obtidos por via química	86
4.4.2.2. Ésteres obtidos por via enzimática	88
4.4.3. Determinação das propriedades do biodiesel	89
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
5.1. Avaliação das linhagens de cianobactérias selecionadas	94
5.1.1. Produtividade de biomassa e do teor de lipídeo obtido	94
5.1.2. Perfil dos ácidos graxos dos óleos de cianobactérias	96
5.2. Cultivo das linhagens <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 sob maior intensidade de luz	99
5.3. Caracterização dos materiais lipídicos	101
5.3.1. Viscosidade dos materiais lipídicos obtidos das biomassas de: <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 e <i>Trichormus</i> sp. CENA77	101
5.3.2. Análise termogravimétrica (TGA)	103
5.3.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	104
5.4. Otimização do meio de cultivo da cianobactéria <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1 empregando a metodologia de planejamento fatorial	106
5.5. Comparação de diferentes métodos de extração de lipídeos oriundo do cultivo da linhagem de <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1	110
5.6. Avaliação do crescimento das cianobactérias <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 cultivadas em meios com distintas concentrações de carbonato de sódio	111
5.7. Influência da intensidade luminosa e fonte de carbono inorgânico no cultivo das linhagens de cianobactérias selecionadas empregando a metodologia de planejamento fatorial	112
5.7.1. Análise estatística dos resultados obtidos no cultivo das linhagens <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 considerando como variável resposta produtividade celular	114

5.7.2. Análise estatística dos resultados obtidos no cultivo das linhagens <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 considerando como variável resposta o teor de lipídeos.....	121
5.7.3. Condições estabelecidas de cultivo das linhagens <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1, <i>Trichormus</i> sp. CENA77 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.....	129
5.8. Síntese de biodiesel por catálise bioquímica	130
5.8.1. Etanólise do óleo de <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1	130
5.8.2. Etanólise do óleo de <i>Trichormus</i> sp. CENA77	132
5.8.3. Etanólise do óleo de <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	134
5.9. Síntese de biodiesel por catálise química	136
5.9.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	138
5.9.2. Análise termogravimétrica (TGA)	139
5.10. Comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos na síntese de biodiesel da biomassa de cianobactérias	141
5.11. Propriedades das amostras de biodiesel obtidas	142
5.12. Comparação das características gerais das linhagens de cianobactérias testadas neste trabalho como fonte de matéria-prima lipídica.....	146
6. CONCLUSÕES.....	149
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	151
REFERÊNCIAS.....	152
APÊNDICE.....	168
Apêndice A.1–Meio de cultivo ASM-1	168
Apêndice A.2–Meio de cultivo BG-11.....	168
Apêndice A.3–Meio de cultivo SWBG-11	168
Apêndice B.1–Análises de toxicidade das linhagens	169
Apêndice B.2–Análises moleculares	169
Apêndice B.3–Amplificação por PCR do domínio NMT do gene de microcistinas sintetase (<i>mcyA</i>).....	170
Apêndice B.4–Análises químicas	171
Apêndice B.5–Resultados obtidos e confirmação da atoxicidade das linhagens	171
Apêndice C–Índice de acidez da matéria-prima lipídica oriunda da biomassa <i>Trichormus</i> sp. CENA77.....	175

1. INTRODUÇÃO

A diminuição das reservas de combustível fóssil tem causado um aumento na demanda e preço do diesel (MUTANDA et al., 2011). Aliado ao alto consumo deste combustível deve-se considerar o impacto ambiental decorrente da emissão de materiais particulados e enxofre na atmosfera, sendo que aproximadamente 98% das emissões de carbono resultam da combustão do combustível fóssil. Desta forma, reduzindo o uso de combustível fóssil, as quantidades de gás carbônico e de outros poluentes emitidos diminuiriam consideravelmente (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

Nos últimos anos a busca por combustíveis alternativos ao diesel mineral tem se intensificado, implicando a proposição de uso de combustíveis a partir de fontes renováveis como: óleos vegetais, gorduras animais, gorduras residuais e lipídeos derivados de biomassa microbiana. Assim, a utilização dessas matérias-primas favorece os apelos atuais da química verde, diminuindo consideravelmente a emissão de gases poluentes ao meio ambiente (KNOTHE et al., 2006; VASUDEVAN; BRIGGS, 2008; BALASUBRAMANIAN et al., 2012). No âmbito de preservar as reservas de petróleo ainda existentes e com a criação da Rede Nacional de Biodiesel, a implementação desse novo biocombustível vem se tornando cada vez mais uma via alternativa a todos esses problemas existentes (CAMPBELL, 2008; SMITH et al., 2009).

No Brasil, o uso do biodiesel está autorizado atualmente na proporção de 5%, o que cria um mercado interno de aproximadamente 800 milhões de litros por ano para este combustível, possibilitando uma economia de até US\$ 160 milhões por ano com a redução das importações de petróleo. A proposta prevista para grandes metrópoles é a autorização da mistura de 20% de biodiesel ao diesel para 2018, passando a ser denominado de B20 (ROCHA; DE FREITAS, 2009).

Com relação ao custo global de produção do biodiesel os seguintes itens devem ser considerados: preço da matéria-prima (produção e processamento), catalisadores, processamento da reação (energia, consumíveis e mão de obra), transporte (matéria-prima e produto final). Entre esses, o preço advindo da matéria-prima e seu processamento representa aproximadamente 75% do custo total de produção do biodiesel (TEIXEIRA; MORALES, 2006; AHMAD et al., 2011).

As matérias-primas empregadas para a produção de biodiesel podem ser de diferentes origens: óleos vegetais, gorduras animais, óleos e gorduras residuais (OGR) e óleo de biomassa. Na categoria de óleos vegetais, podem se transformar em biodiesel,

todos os óleos fixos ou triglicerídeos extraídos de oleaginosas como: semente de soja, grão de amendoim, polpa do dendê, amêndoa do côco de dendê, caroço de algodão, amêndoa do côco de babaçu, semente de girassol, baga de mamona, semente de colza, semente de maracujá, polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça, semente de tomate, entre outros vegetais, em forma de sementes, amêndoas ou polpas, incluindo, pinhão manso, andiroba, pequi, moringa, tucumã, buriti (SQUIZATO, 2008). Entre as gorduras animais possíveis de serem transformadas em biodiesel, merecem destaque: sebo bovino, óleos de peixes, banha de porco, gordura de frango, entre outras matérias graxas. Os óleos e gorduras residuais (OGR) de processos de fritura de alimentos também representam uma matéria-prima atraente, na medida em que aproveita o óleo vegetal como combustível após sua utilização alimentar (WUST, 2004).

Uma nova tendência que vem sendo apoiada pelo mundo inteiro é a utilização do óleo extraído de biomassa microbiana, obtido pelo cultivo de micro-organismos fotossintéticos (microalgas ou cianobactérias) (RODRIGUES, 2008). As vantagens associadas à adoção desta matéria-prima lipídica são inúmeras, entre as quais se destacam: (1) rápida taxa de crescimento e elevado rendimento de biomassa; (2) não utiliza o solo como *habitat* de sustentação, podendo ser usadas águas residuárias para seu cultivo. Desta forma, os solos podem continuar produzindo sua agricultura tradicional, sem a necessidade de impactar biomas como o Cerrado e Amazônia no processo produtivo e não interferindo ou competindo com a cadeia alimentar; (3) o biocombustível gerado a partir de óleo de biomassa gera menos emissões e contaminantes ao combustível derivado do petróleo, portanto reduzem a emissão de gases poluentes; (4) podem utilizar gás carbônico emitido pelas indústrias como fonte de carbono para seu cultivo e, além disso, quando cultivadas em sistemas contínuos podem ser colhidas diariamente (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; MUTANDA et al., 2011; BALASUBRAMANIAN et al., 2012).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como proposta principal testar óleos extraídos de biomassa microbiana, em especial cianobactérias como fonte de matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel via catálise heterogênea. Os principais aspectos previstos para desenvolvimento deste trabalho compreendem a seleção de linhagens altamente produtoras de lipídeos, obtenção e extração do óleo das cianobactérias selecionadas e sua caracterização, e finalmente, a avaliação do óleo extraído como substrato na síntese de biodiesel. Esta abordagem permitirá minimizar os efeitos relacionados ao meio ambiente e sócio-econômico por não competir com a cadeia alimentícia das fontes oleaginosas e solo agrícola como fins de cultivo.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar a reação de transesterificação de óleos extraídos de biomassas de cianobactérias, para sua utilização como combustível alternativo ao diesel convencional, utilizando dois sistemas de catalisadores heterogêneos. Para alcançar o objetivo proposto, foram desenvolvidas as seguintes atividades:

- Identificação de linhagens de cianobactérias com potencial de produzir lipídeos, tomando por base a produtividade celular e lipídica.
- Extração e caracterização dos lipídeos obtidos das cianobactérias, permitindo a identificação de seus constituintes e determinação de suas propriedades: perfil de ácidos graxos, viscosidade e massa molecular.
- Otimização e estabelecimento das condições adequadas de cultivo das cianobactérias, visando maximizar a produtividade celular e teor de lipídeo obtido.
- Teste do desempenho dos óleos extraídos das biomassas de cianobactérias como fonte de matéria-prima lipídica na reação de biodiesel empregando a rota etílica e testando dois sistemas de catalisadores heterogêneos (bioquímico e químico).
- Análise do produto obtido quanto às características desejáveis para uso como biocombustível, de acordo com parâmetros estabelecidos por normas oficiais, como ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cenário energético atual

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém dos combustíveis fósseis (petróleo, carvão e gás natural). Essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento em um futuro próximo (RODOLFI et al., 2009; SMITH et al., 2009), portanto, a busca por combustíveis alternativos vem se intensificando cada vez mais (VASUDEVAN; BRIGGS, 2008; SHEEHAN, 2009; MUTANDA et al., 2011). Levando em consideração que a população dos Estados Unidos, que representa 5 % da população mundial, consome em média 25% do petróleo existente no mundo, 43 % de gasolina e 25% de gás natural, torna-se cada vez mais preocupante a situação energética atual. Relatos do ano de 2004 apontam que foram consumidos 1,27 trilhões de barris de óleo diesel e 172,7 trilhões de metros cúbicos de gás natural. A consumação diária encontrada nos dias de hoje é de aproximadamente 85 milhões de barril de óleo diesel e 7,36 bilhões de metros cúbicos de gás natural. Sendo assim, as reservas ainda existentes de petróleo representam 40 anos de óleo diesel e 64 anos de gás natural, o que torna a situação ainda mais agravante (VASUDEVAN; BRIGGS, 2008).

Neste contexto, os óleos vegetais e gorduras animais transesterificados aparecem como alternativa potencial para substituição do óleo diesel em motores de ignição por compressão, sendo o seu uso testado no final do século XX, produzindo resultados satisfatórios no próprio motor diesel (PINTO et al., 2005), no qual o combustível obtido nesse processo é denominado de Biodiesel. Esta possibilidade de emprego de combustíveis de origem agrícola em motores de ciclo diesel é bastante atrativa tendo em vista o aspecto ambiental, por ser uma fonte renovável de energia (SCOTT et al., 2010; HALIM et al., 2011) e na destinação de resíduos agrícolas e agroindustriais, além do fato do seu desenvolvimento permitir a redução da dependência de importação de petróleo (PINTO et al., 2005; KNOTHE et al., 2006).

O biodiesel permite que se estabeleça um ciclo fechado de carbono no qual o CO₂ é absorvido quando a planta cresce e é liberado quando o biodiesel é queimado na combustão do motor.

A Lei 11097, de 13 de janeiro de 2005, foi criada com intuito de introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira, de modo a estabelecer percentuais mínimos obrigatórios de adição do biodiesel ao óleo diesel comercializado em qualquer parte do território nacional. Desde então a busca e a produção desse novo biocombustível tem se

intensificado a cada ano. Sendo que, a partir de janeiro de 2010 foi homologada a inserção do B5, que reflete na mistura de 5% de biodiesel ao diesel comercial.

Atualmente a soja se destaca como a principal fonte de matéria-prima lipídica utilizada na produção de biodiesel no Brasil, correspondendo a aproximadamente 80% do biodiesel produzido e comercializado (ANP, 2012).

Entretanto, alguns problemas vêm sendo relatados quanto à utilização de fontes oleaginosas para a síntese de biodiesel. Um dos gargalos identificados é o uso do solo para a agroindústria das oleaginosas de modo a atender a demanda interna e de exportação de biocombustíveis. O outro é referente ao consumo de água doce, que já começa a preocupar, tendo em vista o desequilíbrio do ciclo hidrológico, sendo consumidas centenas de litros de água para cada quilo de grãos de culturas oleaginosas (BRANDINI, 2011). O custo elevado das matérias-primas, em especial dos óleos vegetais torna cada vez mais crítica a comercialização do biodiesel. Assim, a busca da matéria-prima ideal tem se tornado incessante e evoluído muito nos últimos anos. Os requisitos para tal escolha incluem fatores múltiplos e não facilmente conciliáveis, tais como: disponibilidade, preço, qualidade em relação ao processo de conversão e a sustentabilidade ambiental. Neste contexto, a substituição dos óleos vegetais por óleos derivados de biomassa microbiana, mais especificamente, de micro-organismos fotossintéticos (microalgas e cianobactérias) têm se tornado uma alternativa bastante promissora (TEIXEIRA; MORALES, 2006; CHISTI, 2007; LI et al., 2008; RODRIGUES, 2008; RODOLFI et al., 2009; CGEE, 2010).

Além disso, a utilização desses micro-organismos fotossintéticos pode contribuir significativamente para a diminuição do efeito estufa e aquecimento global, desde que possuem vantagens na eficiência fotossintética em relação às plantas, apresentando ótima capacidade da biofixação do dióxido de carbono (CO_2), resultando em rápidas taxas de crescimento, alta tolerância às condições extremas do meio ambiente e capacidade de serem cultivadas de maneira intensiva (MEINERZ, 2007; WILLIAMS; LAURENS, 2010; BALASUBRAMANIAN et al., 2012).

3.2. Biodiesel

O biodiesel pode ser definido como sendo uma mistura de mono-álquil ésteres de ácidos graxos derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais, gorduras animais e lipídeos de biomassa, obtidos pela reação de transesterificação, na qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos (SCHUCHARDT; SERCHEL; VARGAS, 1998; PINTO et al., 2005).

O produto resultante (biodiesel), além de ser totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, apresenta várias vantagens adicionais em comparação ao combustível fóssil: é biodegradável; gera redução nas principais emissões presentes nos gases de exaustão (com exceção dos óxidos de nitrogênio, NO_x); possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros; apresenta excelente lubricidade (KNOTHE et al., 2006; ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2011).

A reação de transesterificação tem sido o método mais utilizado para produzi-lo, melhorando as propriedades físicas do biocombustível para o motor diesel. As matérias-primas graxas, quando submetidas ao processo transesterificação, sofrem quedas bruscas nos valores do ponto de névoa e viscosidade, podendo assim o combustível obtido (biodiesel) ser queimado diretamente em motores diesel sem necessidade de adaptação (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007). Desta forma, os motores que foram projetados para combustíveis a diesel podem ser operados sem modificação nenhuma utilizando Biodiesel (MARTÍN; OTERO, 2008).

A equação geral da reação de transesterificação esta representada na Figura 3.1. Para que a reação ocorra de forma adequada é importante que as três etapas consecutivas sejam monitoradas, bem como a reversibilidade da reação, conforme mostrado na Figura 3.2. Na primeira etapa, os triglicerídeos são convertidos para diglicerídeos, os quais são convertidos a monoglicerídeos na etapa posterior. Por último, monoglicerídeos liberam glicerol como subproduto. Em cada etapa da reação, ocorre a liberação de uma molécula do éster de interesse (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006). O biodiesel formado deve ser purificado antes de sua utilização em motores e a glicerina reaproveitada, aumentando o lucro inerente ao processo (KNOTHE et al., 2006).

Figura 3.1. Representação esquemática da reação global de transesterificação.

Figura 3.2. Representação esquemática das etapas envolvidas na transesterificação.

Os catalisadores usados na reação de transesterificação podem ser homogêneos ou heterogêneos. A Figura 3.3 mostra a classificação dos diferentes sistemas da reação de transesterificação, bem como os tipos de catalisadores empregados (ATABANI et al., 2012). Embora a transesterificação química, empregando catálise homogênea alcalina, resulte em altas taxas de conversão de triglicerídeos em seus respectivos ésteres, existem alguns inconvenientes que devem ser considerados: elevados gastos energéticos, difícil recuperação do glicerol, necessidade de remoção do catalisador do meio reacional, além de requerer o tratamento da água alcalina residual e o emprego de substratos e reagentes com baixa concentração de água e ácidos graxos livres. Adicionalmente, o uso dos catalisadores alcalinos homogêneos gera problemas ao meio ambiente, exigindo inúmeras etapas de recuperação e purificação do produto final (VICENTE; MARTÍNEZ; ARACIL, 2004; AKOH et al., 2007; TAN et al., 2010; CHOUHAN; SARMA, 2011).

Assim, a substituição da catálise homogênea pela heterogênea surge como uma

opção tecnológica interessante, pois atende a demanda por processos menos poluentes e mais seletivos. Em função das inúmeras vantagens que os processos heterogêneos oferecem sobre os homogêneos clássicos, tais como pouca ou nenhuma corrosão; fácil separação; poucos problemas com rejeitos; fácil manuseio e possibilidade de reutilização. Além disso, o uso de catalisador heterogêneo minimiza os problemas relativos às etapas finais de purificação do biodiesel, reduzindo a ocorrência das reações indesejáveis de saponificação e permite uma simplificação e redução dos custos dos processos pela diminuição do número de operações associadas (ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2011; CHOUHAN; SARMA, 2011).

Figura 3.3. Classificação dos processos de transesterificação (Fonte: Adaptado ATABANI et al., 2012).

A Tabela 3.1 apresenta uma comparação entre alguns fatores essenciais da reação de transesterificação empregando catalisadores homogêneos e heterogêneos. Considerando essas vantagens, a catálise heterogênea foi selecionada como rota catalítica para mediar à síntese de biodiesel das matérias-primas lipídicas testadas neste trabalho. Na Tabela 3.2 são apresentados exemplos de catalisadores heterogêneos mais utilizados para catalisar a síntese de biodiesel, bem como as vantagens e desvantagens associadas ao emprego dos mesmos.

Tabela 3.1. Comparação entre catalisadores homogêneos e heterogêneos usados para produção de biodiesel.

Homogêneo	Heterogêneo
Catalisadores alcalinos são facilmente manipuláveis	Podem ser utilizados para transesterificar óleos que possuem altos teores de ácidos graxos livres
Requer maior número de etapas na produção de biodiesel	Redução significativa do número de etapas de purificação
Não podem ser reutilizados	Podem ser reutilizados
Maior produção de resíduos provenientes da neutralização do catalisador, da purificação do produto e recuperação da glicerina.	Evita a corrosão da planta Facilita a purificação do biodiesel

A potencialidade dos catalisadores heterogêneos químicos para a produção de biodiesel foi publicada numa ampla revisão bibliográfica por Cordeiro e colaboradores (2011), incluindo as seguintes classes: zeólitas, óxidos e sais inorgânicos, compostos de coordenação e líquidos iônicos, resinas trocadoras de íons, ácidos e bases orgânicos e materiais lamelares. Alguns exemplos listados como eficientes e bastante aceitáveis em nível ambiental destacados por Suarez et al. (2007), são as resinas de troca iônica (Amberlyst 15, Smopex- 101 e Purolite 35CT-175), zeólitas do tipo titanossilicato ou titano-aluminossilicado, como as comerciais ETS- 4 e ETS-10, óxidos de alumínio dopados com hidróxido de sódio (Na/NaOH/ γ -alumina57) ou óxidos de estanho e zinco ($(\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3)\text{X}(\text{SnO})\text{Y}(\text{ZnO})\text{Z}$), óxidos sulfatados e ácido nióbio ($\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$).

Alguns estudos listam várias aplicações de interesse industrial, nos quais catalisadores contendo nióbio demonstram melhor desempenho do que sistemas catalíticos tradicionais. Dessa forma, o nióbio apresenta-se como potencial substituto de catalisadores homogêneos não só devido à sua acentuada acidez, como também pelo fato de ser matéria-prima nacional (TANABE, 2003).

Na classe dos biocatalisadores, outro catalisador heterogêneo que vem sendo empregado com sucesso na síntese de biodiesel, são as lipases imobilizadas. A rota enzimática é bastante atrativa por se tratar de uma via eficiente e altamente seletiva, envolvendo menor consumo de energia (as reações podem ser realizadas em condições brandas de pressão e temperatura), e além do mais, facilita a etapa de recuperação do glicerol, subproduto formado na reação (AKOH et al., 2007; TAN et al., 2010).

Tabela 3.2 Exemplos de catalisadores heterogêneos usados na produção de biodiesel.

Tipo	Exemplo	Vantagem	Desvantagem
Alcalinos	CaO, CaTiO ₃ , KOH/NaY, zeólitas, alumina/sílica	Não são corrosivos, ambientalmente favoráveis; reutilizáveis; fácil separação; alta seletividade; maior tempo de vida útil do catalisador	Requerem baixos níveis de ácidos graxos livres (AGL), condições anidras; Requer alta proporção molar de álcool e óleo; Requer alta temperatura e pressão de reação; Limitação de difusão e alto custo
Ácidos	Nb ₂ O ₅ , ZnO/I ₂ , ZrO ₂ /SO ₄ ²⁻ , TiO ₂ /SO ₄ ²⁻ , zircônia sulfatada, fosfato de vanádio, ácido nióbico	Catalisa transesterificação e esterificação simultaneamente; reutilizável; ecofavoráveis	Baixas concentrações locais de ácido; Baixa microporosidade; Limitações de difusão e alto custo
Enzimas	Lipases microbianas na forma imobilizada	Evita a formação de sabão; fácil purificação; não poluente; especificidade; reutilizável	Custo elevado; Sensibilidade à desnaturação

Fonte: Adaptada de LEUNG; WU; LEUNG, 2010.

A classe de enzima indicada para esse processo, as lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3), compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílico de acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes com baixa concentração de água (DE CASTRO et al., 2004).

No presente trabalho utilizaram-se dois sistemas de catalisadores heterogêneos para conduzir as reações de transesterificação do material lipídico extraído das biomassas de cianobactérias com etanol: óxido de nióbio ($\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) impregnado com NaOH como catalisador químico e lipase imobilizada disponível comercialmente (Novozym® 435) como catalisador bioquímico.

3.2.1. Agente acilante da reação: álcool

Dentre os alcoóis que podem ser usados como agente acilante da reação de transesterificação destacam-se: metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e terc-butanol. O metanol e etanol são os mais utilizados, devido ao seu custo relativamente baixo em comparação com os demais (ATABANI et al., 2012). Ressalta-se, no entanto, que o metanol tem uma toxicidade muito elevada à saúde humana, podendo causar, inclusive, cegueira e câncer. Por outro lado, o etanol apresenta a vantagem de não ser tóxico, ser biodegradável e ser produzido a partir de fontes renováveis (CGEE, 2010). A Tabela 3.3 mostra as principais vantagens e desvantagens da utilização do etanol ou metanol como agente acilante na produção de biodiesel.

Tabela 3.3. Comparação das vantagens e desvantagens do etanol e metanol como agente acilante na obtenção de biodiesel.

Etanol	Metanol
Origem renovável	Derivado do petróleo
Produto nacional	O país é importador do produto
Não tóxico	Tóxico
Processo de separação da glicerina mais complexo	Processo de separação da glicerina mais simples

A transesterificação com metanol é tecnicamente mais viável do que com etanol, uma vez que a água presente no etanol retarda a reação. Isso ocorre principalmente porque o etanol, mesmo aquele que apresenta especificações como anidro, apresenta teores de água da ordem de 0,5 a 0,7%, níveis suficientes para prejudicar a separação do glicerol do meio reacional. Por outro lado, com uso do metanol como agente acilante, que contém

apenas cerca de 100 a 150 ppm de água, a separação é muito mais facilitada (SCHUCHARDT; SERCHEL; VARGAS, 1998; DOMINGOS, 2005).

A etanólise de óleos vegetais tem sido estudada com menor frequência em relação à metanólise. As diferenças nos processos de obtenção de biodiesel etílico e metílico podem chegar a ser bastante significativas dependendo da qualidade da matéria-prima, do teor de ácidos graxos livres, do teor de água e, inclusive, das condições experimentais empregadas. A falta de compreensão desses fatores pode afetar significativamente a reação (DABDOUB; BRONZEL, RAMPIN, 2009).

Alguns autores relatam que o biodiesel do óleo de mamona apresentou propriedades distintas quando se comparou as rotas etílica e metílica. Os rendimentos das reações foram semelhantes, no entanto a formação de ésteres metílicos foi muito mais rápida em comparação à rota etílica (MENEGETTI et al., 2006). Por outro lado, é importante ressaltar que o caráter renovável do biodiesel está apoiado no fato das matérias-primas utilizadas para sua produção serem oriundas de fontes renováveis, como por exemplo, derivados de práticas agrícolas, ao contrário dos derivados de petróleo. Uma exceção a essa regra diz respeito à utilização do metanol derivado do petróleo como agente acilante, sendo este a fonte de álcool mais abundantemente utilizada na Europa e nos Estados Unidos. Isso significa que a prática adotada no Brasil, baseada na utilização do etanol derivado de biomassa, torna o biodiesel um produto que pode ser considerado como verdadeiramente renovável (DOMINGOS, 2005; CGEE, 2010).

Desta forma, a opção de utilização de etanol no Brasil é bastante atrativa devido à grande capacidade agrícola e a já consolidada indústria alcoolquímica no país. Mesmo considerando algumas desvantagens técnicas existentes na produção do biodiesel pela rota etílica, o biodiesel etílico possui uma viscosidade maior que o biodiesel metílico promovendo uma maior lubricidade em relação ao biodiesel metílico. Destaca-se ainda que biodiesel etílico possa reduzir a opacidade na fumaça que o biodiesel metílico emite, sua temperatura de combustão é menor, significando, entre outras coisas, uma redução nas emissões de particulados (BRUNSCHWIG; MOUSSAVOU; BLIN, 2012).

Assim, a implementação do biodiesel de natureza etílica no mercado nacional abre oportunidades para grandes benefícios sociais decorrentes da geração de um grande número de empregos e a promoção de atividades rurais (DOMINGOS, 2005). Esta tendência vem se consolidando cada vez mais, devido ao interesse crescente das empresas em investirem em negócios sustentáveis do ponto de vista econômico, ambiental e social.

Além disso, existe uma grande valorização dos produtos químicos produzidos a partir de recursos renováveis e ao baixo custo do etanol brasileiro (CGEE, 2010).

3.2.2. Matérias-primas lipídicas para produção de biodiesel

Devido ao custo da matéria-prima ser aproximadamente 75% do custo total da produção do biodiesel, a seleção de uma matéria-prima apropriada é importante para assegurar uma produção economicamente viável deste biocombustível (AHMAD et al., 2011). Além disso, outros aspectos devem ser levados em consideração na escolha da matéria-prima ideal, tais como: viabilidade técnica e econômica para a produção do óleo ou gordura capaz de atender toda a demanda do produto resultante de sua transformação (biodiesel); viabilidade técnica e econômica para o processo de produção do biodiesel e finalmente, a qualidade do produto final obtido, adequando-se a utilização nos motores do ciclo diesel sem a necessidade de modificações.

Culturas como a soja, palma, colza e girassol são consideradas como matérias-primas de primeira geração visto terem sido as primeiras culturas oleaginosas utilizadas para produção de biodiesel (AHMAD et al., 2011). Essas matérias-primas não são consideradas sustentáveis, uma vez que estão competindo com a oferta de alimentos (GUI; LEE; BHATIA, 2008; BRENNAN; OWENDE, 2010). A produção de biodiesel a partir de óleos comestíveis também tem um impacto ambiental negativo, pois requer uma grande área de solo fértil para cultivo das plantações de oleaginosas, de modo a atender toda a demanda energética mundial, o que pode ocasionar sérios desequilíbrios ecológicos devido ao desmatamento das florestas (AHMAD et al., 2011).

O dilema ético de utilizar terras agrícolas exclusivamente para a produção de energia ao invés de produzir alimentos é uma questão sensível que tem repercussões distintas. Enquanto o Brasil e Estados Unidos incentivam a produção dos biocombustíveis chamados de primeira geração (álcool e biodiesel), outros países como Cuba e Venezuela preocupam-se com o aumento da crise mundial por alimentos, alegando que a crise tem se agravado desde que as áreas de cultivo passaram a competir com a produção de biocombustíveis (SUAREZ et al., 2009).

Nesse sentido, as pesquisas mais pertinentes hoje em dia no que dizem respeito à produção de biodiesel, estão relacionadas no desenvolvimento de novas tecnologias e a busca por matérias-primas alternativas, no intuito de deslocar a preocupação futura com o setor alimentício.

Na substituição das matérias-primas pertencentes à cadeia alimentar surgem aquelas que vêm se tornando compatíveis, sem preocupações pertinentes num futuro próximo, e que são designadas matérias-primas de segunda geração. Destaque especial vem sendo dado para a espécie de *Jatropha curcas*, conhecido popularmente como pinhão manso, o qual pode crescer em regiões semi-áridas, em que as outras fontes de oleaginosas não crescem, além de não competir com a cadeia alimentar. Outras matérias-primas que vem sendo bastante relatadas nessa categoria são os resíduos de materiais graxos, tanto de origem doméstica quanto industrial, nos quais se encontram: sebo bovino, óleos residuais de fritura, gordura de frango (SUAREZ et al., 2009).

Levando em consideração esses fatores, surgem alguns aspectos que merecem atenção para não comprometer o rendimento e a qualidade do processo. Com relação às matérias-primas de baixo impacto na cadeia alimentar, o pinhão manso, que hoje aparece como uma das mais estudadas relata como principal problema à elevada acidez do óleo, apresentando uma limitação ao processo tradicional da produção de biodiesel empregando catalisadores alcalinos (BECKER; MAKKAR, 2008). Além disso, o fato de ser uma cultura recente, sua condição de cultivo não está completamente estabelecida, o que dificulta operações do seu manejo, sendo que a colheita é ainda manual ou semi-mecanizada (DIAS et al., 2007).

Com respeito às matérias-primas de origem residual (sebo, óleo de fritura, gordura de frango), algumas desvantagens são de suma importância. No caso específico do sebo bovino pode ocorrer à formação de depósitos de carbono por combustão incompleta devido à redução da eficiência de lubrificação do óleo que é decorrente da polimerização de ácidos graxos poliinsaturados como, por exemplo, os ácidos linoleico e linolênico presentes em quantidades significativas. O decorrente valor de acidez apresentado pelos óleos de fritura ocasiona o mesmo problema encontrado para o pinhão manso, podendo ocorrer reações indesejáveis de saponificação, e conseqüentemente dificultarem o sistema de ignição no motor (KNOTHE et al., 2006; VASUDEVAN; BRIGGS, 2008).

Uma promissora alternativa que não apresenta comprometimento com a cadeia alimentar e pode atender a demanda necessária para o suprimento de biodiesel são as matérias-primas lipídicas derivadas do cultivo de micro-organismos fotossintéticos (microalgas e cianobactérias). Essa nova fonte de matéria-prima denominada de terceira geração apresenta como característica principal a elevada capacidade de acumular lipídeo nas suas células. A Tabela 3.4 mostra a comparação entre os principais aspectos

relacionados com a matéria-prima a ser usada como fonte de triglicerídeo na reação de obtenção do biodiesel.

Tabela 3.4. Comparação da produção do biodiesel a partir de óleos vegetais e microalgas e/ou cianobactérias.

Aspecto	Biodiesel produzido de microalgas e cianobactérias	Biodiesel produzido de óleos vegetais
Tecnologia	Cultivo biológico da célula	Agricultura
Período de produção	5-7 dias por batelada de cultivo	Vários meses ou anos
Conteúdo de óleo	Entre 30-50%	Inferior a 20%
Terra (solo) ocupada para produção	0,010-0,013 hectare para produzir 1 x 10 ³ L de óleo	2,24 hectare para produzir 1 x 10 ³ L de óleo
Potencial de desenvolvimento	Ilimitado (pesquisa iniciada recentemente)	Limitado (muitos trabalhos realizados)

A terceira geração de matéria-prima de biodiesel, microalgas e cianobactérias, têm emergido como uma das fontes alternativas mais promissoras de lipídeos, devido principalmente à elevada eficiência fotossintética de produção de biomassa, rápida taxa de crescimento e produtividade quando comparada a safras convencionais. Além da rápida reprodução elas são mais fáceis de cultivar do que muitos outros tipos de plantas superiores e podem produzir um alto rendimento de óleo para produção de biodiesel (AHMAD et al., 2011; DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011; AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011).

3.3. Potencial de micro-organismos fotossintéticos como fonte de matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel

3.3.1. Microalgas

As microalgas são organismos microscópicos fotossintéticos encontrados em ambientes marinhos e de água doce (DEMIRBAS, 2010). Pertencem a um grupo muito heterogêneo de organismos e geralmente são microscópicos unicelulares, podendo formar colônia, com pouca ou nenhuma diferenciação celular. As microalgas são caracterizadas pela presença de pigmentos de coloração variada, sendo responsável pelo mecanismo foto autotrófico (MEINERZ, 2007). Diversos biólogos têm classificado as microalgas em diversas classes, principalmente distinguindo pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura básica celular. As três classes mais importantes em termos de abundância são: diatomáceas (*Bacillariophyceae*); algas verdes (*Chlorophyceae*); e algas marrons douradas (*Chrysophyceae*) (DEMIRBAS, 2010).

Devido a sua grande diversidade, as microalgas pertencem a um grupo com ótima potencialidade, podendo ser utilizadas em diversos produtos químicos com aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica e atualmente na produção de biocombustíveis (OLAIZOLA, 2003; BALASUBRAMANIAN et al., 2012).

Microalgas são potencialmente adequadas para a produção de biodiesel e seu cultivo apresenta várias características que tornam esta estratégia bastante viável para produção em larga escala, incluindo: custo relativamente baixo de colheita e transporte, menor consumo de água no cultivo, maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores, além disso, podem ser cultivadas em meio salino simples e são eficientes fixadoras de CO₂ (TEIXEIRA; MORALES, 2006; LI et al., 2008; SAMORÌ et al., 2010).

As microalgas são seres vivos que têm uma estrutura celular considerada simples em relação a outros seres vivos como as plantas. Entretanto, o mecanismo de fotossíntese é semelhante, com a vantagem de serem mais eficientes na conversão da energia solar, devido à sua estrutura celular. Crescem em suspensão nos ambientes aquáticos, têm acesso à água, ao CO₂ e outros nutrientes. Em função disso, as algas são capazes de produzir aproximadamente 30 vezes mais a quantidade de óleo por unidade de superfície do que colheitas tradicionais de plantas usadas para a produção de óleos em solo. Com a aplicação de nutrientes favoráveis e estratégias adequadas de cultivo, como os fotobiorreatores, a capacidade de produção de lipídeo pode ser ainda ampliada (PULZ, 2001; WALTER et al., 2005; CHISTI, 2007; LI et al., 2008; CHISTI, 2008).

A concepção de usar microalgas como uma fonte de lipídeo para produção de biocombustível não é nova, mas somente recentemente que esforços tem sido retomados nesta direção em função da escalada do preço do petróleo e, mais significativamente, o interesse emergente sobre o aquecimento global que é associado com a queima de combustíveis fósseis (CHISTI, 2007; LI et al., 2008; SHEEHAN, 2009).

Estudos no país ainda estão em fase de aprimoramento para ampliar o conhecimento de novas tecnologias de produção e transformar a pesquisa de bancada numa produção em larga escala. Portanto, uma análise da viabilidade do processo ainda não foi efetuada.

Entretanto, nos Estados Unidos, esse grau de maturação está num estágio bem mais avançado e vários estudos já foram efetuados atestando o grande potencial de utilização dessa fonte de matéria-prima lipídica para produção de biodiesel. Especificamente para o caso daquele país, pesquisas relatam que para substituir todo o combustível consumido nos meios de transporte é necessária uma produção anual de 0,53 bilhões m³ (CHISTI, 2007).

Segundo esse mesmo estudo, a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais, óleos residuais e a gordura animal não satisfazem esta demanda. Por exemplo, a produção de apenas da metade do biodiesel requerido para o transporte, exigiria áreas extensas e insustentáveis de cultivo de diversos grãos para produção dos óleos principais, como demonstrado na Tabela 3.5. Nas colunas 3 e 4 desta mesma tabela são apresentados dois dados adicionais: a área de plantio necessária para satisfazer 50% da demanda de combustível para transporte, tomando por base o rendimento médio do óleo por hectare de diversos grãos oleaginosos e a área expressa em porcentagem da área de colheita total.

Tabela 3.5. Comparação de algumas fontes de matérias-primas lipídicas para produção de biodiesel.

Cultivo	Rendimento de óleo (L/ha)	Área de terra necessária (M ha)^a	Porcentagem da área de colheita existente (%)
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Pinhão manso	1892	140	77
Óleo de babaçu	2689	99	54
Óleo de palma	5950	45	24
Microalga ^b	136.900	2	1,1
Microalga ^c	58.700	4,5	2,5

^a Para satisfazer 50% de todas as necessidades do combustível utilizado no transporte dos Estados Unidos; ^{b,c} 70% óleo (massa seca) em biomassa.

Verifica-se pelos dados da Tabela 3.5 que certamente, as culturas de oleoginosas não podem contribuir significativamente para substituir os combustíveis líquidos derivados do petróleo no futuro próximo. Entretanto, este cenário pode ser alterado quando se considera a contribuição das microalgas para gerar matéria-prima a ser utilizada na produção de biodiesel. Entre 1 e 3% da área total de cultivo é suficiente para produzir a biomassa de algas que satisfaz 50% das necessidades do combustível requerido para o transporte (Tabela 3.5). Os rendimentos do óleo das microalgas dados na Tabela 3.5 são baseados na produtividade experimental demonstrada da biomassa nos fotobiorreatores. O rendimento atual do biodiesel por hectare é aproximadamente 80% do rendimento do óleo oriundo da colheita.

Desta forma, para o caso específico dos Estados Unidos, as microalgas parecem ser a única fonte de lipídeo utilizada para produção de biodiesel com potencial para substituir o diesel fóssil. Ao contrário de outras culturas oleaginosas, as microalgas crescem com extrema rapidez e na grande maioria, são excessivamente ricas em óleo.

3.3.2. Cianobactérias

A sistemática de cianobactérias tem sido notavelmente tumultuada, sendo um grupo de micro-organismos muito discutido pelos bacteriologistas e botânicos. A classificação dos organismos deve refletir as relações evolutivas entre eles (WILMOTTE; GOLUBIC, 1991; KOMÁREK, 2003), visando o seu arranjo em grupos taxonômicos, além de reger sua identificação e fornecer uma linguagem comum aos especialistas (BRENNER; STALEY; KRIEG, 2001).

Inicialmente as cianobactérias foram classificadas junto às algas, devido ao seu aparato fotossintético semelhante ao das plantas superiores. Eram denominadas de algas verde-azuladas ou cianofíceas (STANIER et al., 1971). Porém, a sistemática de cianobactérias passou a receber um enfoque bacteriológico proposto inicialmente por Stanier e colaboradores, 1978, após a confirmação da origem procariótica desses organismos, com base nos estudos ultraestruturais, bioquímicos e moleculares (STANIER et al., 1971; WOESE et al., 1975; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977; BONEN; DOOLITTLE, 1978). Por meio desses estudos foi constatada a semelhança do envoltório celular das cianobactérias com o das bactérias Gram negativas, a estrutura procariótica celular com ausência de organelas citoplasmáticas, bem como a natureza bacteriana do ribossomo. O filo *Cyanobacteria* atualmente pertence ao domínio Bactéria (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001).

As cianobactérias compreendem um dos maiores, mais diverso ecologicamente, bem sucedido e importante grupo de bactérias da Terra (WILMOTTE, 1994). Elas constituem um grupo filogeneticamente coerente de micro-organismos capaz de realizar fotossíntese com liberação de oxigênio, tendo como modo nutricional dominante o autotrófico (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989).

Evidências paleontológicas, geológicas e geoquímicas isotópicas indicam que as cianobactérias já existiam há aproximadamente 3.500 milhões de anos (SCHOPF, 1996). Esses organismos podem ser considerados a chave da evolução da vida no planeta Terra, pois provavelmente foram os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva (SCHOPF, 1994).

O modo nutricional dominante das cianobactérias é o autotrófico (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). Necessitam apenas de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para sua sobrevivência. Sua natureza é tipicamente fotossintética aeróbica, mas algumas espécies são heterotróficas facultativas, crescem no escuro e na

presença de certos substratos orgânicos (SMITH, 1983; STAL; MOEZELAAR, 1997). Outras espécies em condições anaeróbicas utilizam o sulfeto como doador de elétrons para a fotossíntese (COHEN et al., 1986). As cianobactérias desempenham importante papel no ciclo do carbono, oxigênio e nitrogênio e tem significância evolutiva em relação às plantas (CARR; WHITTON, 1973; FOGG et al., 1973). A fotossíntese oxigênica das cianobactérias ocorre em um aparato fotossintético contendo clorofila a, ficobiliproteínas e vários carotenóides como pigmentos da antena coletora de luz (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977), sendo a água o doador de elétrons. Além da capacidade de realizar fotossíntese, algumas espécies de cianobactérias possuem a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico contribuindo para a fertilidade dos solos e águas (RAI, 1990). Essa propriedade está associada à presença de células modificadas chamadas heterócitos, as quais contêm a enzima nitrogenase que fixa o N_2 do ar atmosférico e o transforma em amônia (STEWART, 1973), ou à presença de células especializadas, os diazocitos (BERMAN-FRANK et al., 2001). Os heterócitos possuem um envoltório celular espesso que evita a entrada de O_2 capaz de inativar a enzima nitrogenase. Em várias linhagens unicelulares, a fixação de nitrogênio ocorre no escuro e, em algumas linhagens filamentosas, a fixação de nitrogênio ocorre em células vegetativas em condições anóxicas (FAY, 1992; GALLON, 1992).

As cianobactérias podem desenvolver os acinetos, que são células especializadas, mais resistentes que desempenham o papel de “esporos”, auxiliando na adaptação em diversos ambientes (THIEL; WOLK, 1983). Além disso, outras características morfológicas estruturais representam vantagem adaptativa para as cianobactérias, como os hormogônios e os aerótopos. Como instrumento de colonização, o hormogônio, que são filamentos modificados, atua como elemento de dispersão e infecção no estabelecimento da associação cianobionte-hospedeiro (FIORE; HONDA, 2008). Os aerótopos, considerados vesículas de ar, são responsáveis pela flutuabilidade e pela habilidade de regular a movimentação ao longo da coluna d'água, conforme as condições ambientais (OLIVER; GANF, 2000). As cianobactérias apresentam grande variedade fenotípica, sendo encontradas diversas formas e arranjos, como as unicelulares (cocóides e bacilos) e filamentosas (ramificadas ou não) (WHITTON; POTTS, 2000).

A longa história evolutiva das cianobactérias é tida como resultado de sua abundante ocorrência nos mais diversos tipos de *habitat* (SCHOPF, 1994). A grande diversidade metabólica das cianobactérias propiciou a sua sobrevivência no ambiente inóspito da Terra primitiva e também favoreceu a sua colonização nos ambientes atuais.

Esses micro-organismos são encontrados em todos os tipos de ecossistemas bem iluminados, inclusive em ambientes extremos, como areia e rochas desérticas, águas termais (“hot springs”) e lagos do Ártico e da Antártica (CASTENHOLZ, 1976; SKULBERG, 1995; DOR; DANIN, 1996). Podem ser encontradas em vida livre no ambiente, como nas florações planctônicas ou turfás, ou em associação com outros organismos como plantas, fungos, algas e bactérias, formando líquens e mantos microbianos (STAL, 1995; OLIVER; GANF, 2000; STENROOS et al., 2006; FIORE; HONDA, 2008). Podem também ser encontradas em solos e ambientes aerofíticos, como troncos e folhas de árvores e rochas (WHITTON; POTTS, 2000; AGUIAR et al., 2008; BRANCO et al., 2009).

As cianobactérias propiciam também uma extraordinária e ampla faixa de contribuição para a vida dos humanos, apresentando inclusive importância econômica (MANN; CARR, 1992). Além da produção primária de matéria orgânica e da fixação biológica de nitrogênio por algumas espécies, o uso de cianobactérias na produção de alimentos com valores nutricionais elevados, conversão de energia solar e produtos farmacológicos apresentam um potencial promissor para o futuro (SKULBERG, 1995; KREITLOW; MUNDT; LINDEQUIST, 1999). A maioria das espécies de cianobactérias são produtoras de toxinas, que constituem um perigo em potencial para a saúde dos animais e humanos. Desta forma, dependendo da forma de aplicação ou produto que se deseja obter a partir dessa classe de micro-organismos, torna-se essencial conhecer o gênero e a linhagem que se irá trabalhar, visando evitar danos casuais para a saúde e meio ambiente.

3.3.2.1. Aparato fotossintético das cianobactérias

Em algas e plantas, a fotossíntese é realizada em cloroplastos e o aparato fotossintético localiza-se nas membranas do tilacóide dos cloroplastos. Nas cianobactérias e em bactérias fotossintetizantes, o aparato é localizado na membrana celular (GUPTA, 2008).

O aparato fotossintético das cianobactérias possui Chl *a*, ficobiliproteínas e vários carotenóides como pigmentos da antena coletora de luz (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977) (Figura 3.4). O principal pigmento da antena coletora de luz são as ficobiliproteínas que são organizadas em uma estrutura chamada ficobilissomas, as quais, por sua vez, são compostas de ficoeritrina (um pigmento vermelho que está ausente em algumas cianobactérias), ficocianina (PC – um pigmento azul), aloficocianina e aloficocianina B

(STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977). Dentro do domínio *Bacteria*, os genes codificadores de PC são encontrados em ambientes de água doce exclusivamente em cianobactérias (BRYANT, 1982; GLAZER, 1989; ERNEST, 1991). Alguns outros organismos do domínio *Eukarya*, tais como algas vermelhas (rodófitas) e criptófitas também possuem esses genes de PC (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995). As cianobactérias acumulam lipídeos nas membranas dos tilacóides, as quais estão associadas com altos níveis de fotossíntese e rápida taxa de crescimento.

Figura 3.4. Aparato fotossintético das cianobactérias
(fonte: STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977)

3.3.2.2. Toxinas produzidas pelas cianobactérias (cianotoxinas)

Cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com os órgãos ou sistemas que eles afetam, ou seja, com base nos seus efeitos biológicos (Codd; Morrison; Metcalf, 2005; Wiegand; Pflugmacher, 2005). De acordo com essa classificação, Funari e Testai, 2011, dividem as cianotoxinas nos seguintes tipos: Hepatotoxinas (mais de 70 variantes de microcistina, 6 variantes de nodularinas conhecidas); Neurotoxinas (anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a (S), 21 variantes de saxitoxinas conhecidas, também denominadas de toxinas paralisantes de moluscos); Citotoxinas (cilindropermopsinas); Toxinas irritantes e que atuam na região gastrointestinal (aplisiotoxina, debromoaplisiotoxina, lyngbyatoxina, endotoxinas lipopolissacarídicas - LPS); e outras cianotoxinas cujo perfil toxicológico e ecológico é ainda parcialmente desconhecido, como microviridina e β -N-metilamino-L-alanina (BMAA). Uma mesma cianotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de cianobactérias e uma mesma cianobactéria pode produzir mais de um tipo de toxina (Tabela 3.6).

Tabela 3.6. Toxinas produzidas por cianobactérias.

Cianotoxina	Gen envolvido	Efeito biológico	Linhagem produtora
Microcistina	Microcistina sintetase	Hepatotoxina. Inibidor das fostatasas PP1 e PP2A	<i>Microcystis</i> spp. <i>Planktothrix</i> spp., <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Cyanobium bacillare</i> , <i>Arthospora fusiformis</i> , <i>Limnothrix redekei</i> , <i>Phormidium formosum</i> , <i>Hapalosiphon hibernicus</i> , <i>Fischerella</i>
Nodularina	Nodularina sintetase	Hepatotoxina	<i>Nodularia spumigena</i>
Cilindrospermopsina	Cilindrospermopsina sintetase	Inibidor da biossíntese protéica, dano citogenético (DNA)	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Umezakia natans</i> , <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Rhaphidiopsis curvata</i> , <i>Anabaena lapponica</i> , <i>Anabaena bergii</i>
Anatoxina a-(S)		Neurotoxina. Liga-se aos receptores de acetilcolinesterase	<i>Anabaena flos-aquae</i> <i>A. lemmermanii</i>
Saxitoxina (PSP)	Saxitoxina sintase	Neurotoxina. Bloqueia os canais de sódio nas células neurais	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> <i>Cylindrospermopsis</i> spp.
Lipopolissacarídeos LPS	-	Dermatotoxina. Irritante efeito em qualquer tecido exposto	Todas cianobactérias
Lyngbyatoxina	NRPS com organização de domínios: A-NM- PCP-C-A-PCP- Redutase	Citotoxina	<i>Lyngbya majuscula</i> (águas marinhas), <i>Oscillatoria nigro-viridis</i>
β -N-metilamino-L- alanina (BMAA)	-	Neurotoxina	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> e <i>Planktothrix</i> spp. e a maioria de cianobactérias simbiontes testadas.

Fonte: Modificado de Funari; Testai, 2011.

Em 2002, Kurmayer e colaboradores demonstraram por meio das microcistinas (MCs) que dentro de uma mesma espécie ocorrem diferenças no genótipo, sendo que alguns deles possuem os genes para produção de determinada toxina e a outra não. Em 50-75% das florações de cianobactérias, a toxicidade é associada com a produção simultânea de diversas cianotoxinas (AN; CARMICHAEL, 1994), sendo que a toxicidade das florações é determinada pela composição de suas linhagens (FUNARI; TESTAI, 2011).

A quantidade de produção de MCs pela população de cianobactérias em cultura é diretamente proporcional à velocidade de crescimento da cultura, sendo que a maior produção de toxinas é observada no final da fase logarítmica de crescimento (VAN APELDOORN et al., 2007). A variabilidade na concentração de MCs em corpos d'água tem sido atribuída a variações nas condições ambientais, o que pode influenciar o seu índice de produção (SIVONEN; JONES, 1999).

Os fatores ambientais na produção de cianotoxinas não são muito conhecidos. Alguns estudos mostram que a variação de parâmetros como luz, idade da cultura, temperatura, pH e nutrientes trazem diferenças na produção de MC (SIVONEN; JONES, 1999). A produção das cianotoxinas pelas cianobactérias tem sido verificada por testes em laboratório usando isolados de culturas monoespecíficas. Contudo, há a possibilidade de que bactérias heterotróficas associadas podem ter uma função na produção da cianotoxina ou na sua modulação (CODD; MORRISON; METCALF, 2005).

3.4. Produção de biomassa de microalgas e cianobactérias: efeito das condições de cultivo sobre a produtividade e acúmulo de óleo pelas células

As características de crescimento e composição dos micro-organismos fotossintéticos dependem significativamente das condições de cultivo. A principal forma de produzir biomassa microbiana é o cultivo. Para produção de biomassa, os micro-organismos fotossintéticos devem ser cultivados em condições apropriadas, de acordo com os parâmetros necessários que favorecem o crescimento celular. O teor de lipídeos acumulado, a produtividade lipídica e a produtividade da biomassa podem variar consideravelmente dependendo das condições de cultivo empregadas. Existem quatro grandes tipos de condições de cultivo: fotoautotrófico (sistemas abertos-lagoas ou sistemas fechados-fotobiorreatores), heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico. Todos os métodos têm suas vantagens e desvantagens, portanto, pesquisadores discordam sobre qual dos métodos e sistemas é mais favorável, dependendo principalmente da linhagem a ser cultivada e as condições que favorece seu crescimento (TAHER et al., 2011; CHEN et al., 2011). Nesse aspecto, os principais sistemas de cultivo podem ser divididos em quatro tipos:

- *Fotoautotrófico*: Baseia-se no cultivo em que os micro-organismos fotossintéticos utilizam luz solar como fonte de energia e carbono inorgânico (por exemplo, dióxido de carbono) como fonte de carbono para formar energia química através da fotossíntese. Este é o método mais usado para cultivo e crescimento de microalgas (GOUVEIA et al., 2009;

GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; MANDAL; MALLICK, 2009; YOO et al., 2010). Tanques abertos são os sistemas mais utilizados nesse caso. Geralmente lagoas abertas são fechadas, com canais de recirculação e roda de pás, que operam continuamente para prevenir sedimentação e proporcionar a mistura do meio. Por outro lado, estes sistemas abertos podem conduzir a evaporação da água e contaminações por outras espécies indesejáveis. Fotobiorreatores correspondem a outro sistema de cultivo fotoautotrófico, os quais são fechados e dimensionados como placas, tubular (mais comum), dentre outros. Estes sistemas apresentam algumas vantagens: reduzem evaporação da água, diminuem consideravelmente as contaminações externas, e maior produtividade de biomassa. No entanto, fotobiorreatores são geralmente feitos de plástico, e pode ocorrer deterioração da superfície UV, que é a principal desvantagem. Espécies com alta capacidade de acumular óleo geralmente são cultivadas em fotobiorreatores, em condições apropriadas de nutriente e rica em CO₂, para promover a reprodução rápida dos micro-organismos. Nesse tipo de cultivo existe uma grande variação no teor de lipídeos dos micro-organismos, variando de 5% a 68%, dependendo da espécie. A principal vantagem de usar cultivo autotrófico é o consumo de CO₂ como fonte de carbono para o crescimento celular e produção de lipídeo. No entanto, quando o CO₂ é a única fonte de carbono, o cultivo de micro-organismos fotossintéticos deve ser localizado próximo de indústrias que podem fornecer uma grande quantidade de CO₂ para o crescimento dos micro-organismos. Em comparação com outros tipos de cultivo, o problema de contaminação é menos grave quando se utiliza o crescimento autotrófico. Portanto, os sistemas de cultivo ao ar livre (como lagoas abertas) são normalmente operados sob condições de cultivo fototróficos (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Além disso, outros parâmetros favorecem o cultivo e acúmulo de lipídeos, tais como: temperatura, intensidade de luz, pH, salinidade da água e nitrogênio (HUANG et al., 2010; TAHER et al., 2011; CHEN et al., 2011).

- Heterotrófico: Ao contrário dos sistemas fotoautotróficos, cultivos heterotróficos são conduzidos no escuro utilizando carbono orgânico como fonte de energia. Esse método depende da capacidade dos micro-organismos assimilar carbono orgânico como fonte de energia. Nem todos são capazes de assimilar o carbono orgânico. Assim, este método de cultivo tem sido estudado em um número limitado de espécies. Por outro lado, tem sido relatado que esse método proporciona alto teor de óleo e alta produtividade de biomassa. Este tipo de cultivo pode evitar os problemas associados com a luz limitada que dificultam alta densidade celular em fotobiorreatores de larga escala durante cultivo fototrófico. As

principais fontes de carbono orgânico avaliadas são: glicose, acetato, glicerol, frutose, sacarose, lactose, galactose, dentre outros. Maior produtividade de biomassa e aumento no teor de lipídeos pode ser obtido por meio do cultivo heterotrófico. Algumas espécies chegam a acumular 40% a mais de lipídeos e produtividade de até 20 vezes maior alterando a condição de cultivo de fototrófico para heterotrófico. No entanto, o principal problema encontrado na utilização de sistema heterotrófico é que pode ocorrer contaminação por outros micro-organismos (LIANG; SARKANY; CUI, 2009; HUANG et al., 2010; CHEN et al., 2011; TAHER et al., 2011).

- *Mixotrófico*: No cultivo mixotrófico são utilizados ambos os compostos orgânicos e inorgânicos (CO₂) como fonte de carbono para o crescimento dos micro-organismos fotossintéticos. Isto significa que os micro-organismos são capazes de viver em condições tanto fototróficas ou heterotróficas, ou ambos os sistemas. Cultivo mixotrófico raramente é usado na produção de lipídeos por microalgas e cianobactérias, sendo os mais utilizados: cultivos fototrófico e heterotrófico (CHEN et al., 2011).

- *Fotoheterotrófico*: No cultivo fotoheterotrófico os micro-organismos requerem luz e utilização de compostos orgânicos como fonte de carbono. A principal diferença entre cultivos mixotróficos e fotoheterotróficos é que o último requer luz como a fonte de energia, enquanto que o cultivo mixotrófico pode usar compostos orgânicos para esta finalidade. O cultivo fotoheterotrófico precisa de ambos os açúcares e de luz ao mesmo tempo. Embora a produção de alguns metabólitos úteis possa ser melhorada por meio do cultivo fotoheterotrófico, esse método é raramente utilizado para produzir biodiesel, bem como é o caso do cultivo mixotrófico (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; CHEN et al., 2011).

3.4.1. Comparação de diferentes condições de cultivo

Embora o crescimento heterotrófico possa fornecer maior produtividade de lipídeo do que outras condições de cultivo, atraindo assim um interesse considerável pelos pesquisadores, a cultura pode ficar contaminada com muita facilidade. Além disso, o custo de uma fonte de carbono orgânico é também uma preocupação do ponto de vista comercial. Cultivo fototrófico é mais frequentemente usado e mais fácil de ampliar a escala, como um sistema de lagoa, por exemplo, e é uma via promissora, uma vez que os micro-organismos fotossintéticos podem fazer a captura de CO₂ (gás de combustão de

fábricas) e convertê-lo em biomassa. No entanto, a produtividade de lipídeos deste método é geralmente menor do que a do cultivo heterotrófico, devido, principalmente, a baixa produtividade de biomassa. Por outro lado, o menor custo para a ampliação do cultivo fototrófico significa que este método é ainda muito atraente. Até o momento, são escassas as informações na literatura sobre o uso de cultivos mixotróficos e fotoheterotróficos de microalgas e cianobactérias para a produção de biodiesel e essas duas condições de cultivo são limitadas pelo risco de contaminação e os requisitos de luz. Além do mais podem requerer uma configuração especial de fotobiorreator para ampliar a escala, aumentando assim o custo operacional (CHEN et al., 2011).

Em estudos realizados na Califórnia, Havaí e Novo México, foram testados o cultivo de diversas espécies de microalgas e cianobactérias em lagoas abertas de aproximadamente 1000 m² como locais de cultivo. Os resultados obtidos comprovaram que as lagoas ao ar livre podem ser um ambiente adequado com alta eficiência para o cultivo e utilização de CO₂ como fonte de carbono inorgânico para o cultivo, sendo que os tanques projetados para o cultivo permitiram a utilização de mais de 90% de CO₂ injetado no sistema. Produtividades de até 50g de biomassa/m² foram alcançadas em um único dia de cultivo. Porém, o alcance de produtividades mais elevadas foi prejudicado pelas baixas condições de temperatura existentes no local. As condições do Novo México forneciam luz solar ampla, no entanto, as temperaturas atingiram muitas vezes níveis baixos (especialmente durante o período da noite). De fato, algumas espécies que pareciam muito promissoras quando testadas em escala de laboratório não apresentaram bons resultados em condições de cultivo em lagoas (SHEEHAN et al., 1998).

3.4.2. Cultivo e produção em larga escala

Para a produção de biodiesel tornar-se economicamente viável a partir do cultivo de microalgas e cianobactérias, a produtividade e acúmulo de biomassa deve atender toda a demanda de produção industrial. Para tal finalidade, a produção em escala comercial de biomassa microbiana pode ser alcançada por meio de dois métodos: (1) sistemas de lagoas abertas convencionais (2) sistemas fechados - fotobiorreatores (PULZ, 2001; VERMA et al., 2010).

3.4.2.1. Sistemas de lagoas abertas

Os sistemas de lagoas ou tanques abertos são talvez os mais adequados para o cultivo de micro-organismos fotossintéticos destinados para a produção de biodiesel

devido ao seu baixo custo de construção. Os sistemas mais utilizados são os tanques aerados com alta taxa de CO_2 . Estes são feitos tipicamente de canais com circulação, geralmente com 20-50 cm de profundidade e com agitação e circulação do meio de cultivo para estabilizar o crescimento e a produtividade dos micro-organismos. São freqüentemente construídos de concreto, mas tanques com revestimento de plástico também tem sido utilizados. Em um sistema de cultivo contínuo, os nutrientes são introduzidos na frente da pá de agitação e movidos por todo o tanque até o ponto de coleta. A agitação é contínua para evitar a sedimentação das células. A fonte de carbono pode ser obtida diretamente da atmosfera, na superfície, mas aeradores submersos podem ser instalados para aumentar a absorção do CO_2 . Adicionalmente, águas residuárias podem ser utilizadas para o cultivo em sistemas abertos ou fechados por conter nutrientes abundantes (fontes de nitrogênio, fósforo, carbono, entre outros), os quais são necessários para o crescimento desses micro-organismos (BRENNAN; OWENDE, 2010; CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

3.4.2.2. Fotobiorreatores

Fotobiorreatores mais amplamente utilizados são os que apresentam configurações tubulares, reatores de placas ou reatores de colunas, fermentador, dentre outros (VERMA et al., 2010; CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

A geometria dos fotobiorreatores fechados apresenta-se nas seguintes formas: reator tubular, o qual possui diferentes configurações como reator tubular vertical (tubo transparente vertical de polietileno ou vidro, no qual a agitação é atingida pelo borbulhamento feito a partir do fundo); reator tubular horizontal (o gás é introduzido pela conexão do tubo ou através de unidade de troca gasosa). Além do reator tubular, existe o reator em placas, sendo estas postas de forma vertical (lados transparentes frente para o leste-oeste), inclinada (norte-sul) ou horizontal. Na produção em larga escala, várias chapas estão dispostas paralelamente sobre uma área. Os reatores de placa plana são caracterizados por uma área aberta de transferência de gás, reduzindo assim a necessidade de um desgaseificador exclusivo para isso. Por fim, tem-se o reator tipo fermentador. Neste, a iluminação é fornecida internamente, quando utilizado grandes volumes, e a agitação é realizada com a ajuda de um rotor (impeller) tipo marinho (fluxo axial) ou helicoidal (ribbon type) ou agitação magnética (em unidades menores). Os sistemas de fotobiorreatores fechados apresentam-se como os mais adequados para espécies que podem ser rapidamente e facilmente contaminadas por outros micro-organismos, exceto para

aquelas que conseguem sobreviver em condições ambientais extremas como alto pH (*Spirulina*, por exemplo) e alta salinidade (*Dunaliella*, por exemplo) ou podem crescer muito rapidamente (*Chlorella*, por exemplo) em tanques abertos (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

No que diz respeito às vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo de micro-organismos fotossintéticos, pode-se observar que, embora eles possam utilizar eficientemente a luz solar, o cultivo autotrófico é lento por causa da limitação luminosa imposta pela elevada densidade celular em cultivos em larga escala ou devido a uma fotoinibição ocasionada pelo excesso de luz, especialmente em dias ensolarados, principalmente em sistemas abertos. Em virtude disso, o crescimento heterotrófico desses micro-organismos em fotobiorreatores fechados pode ser considerado favorável. Estes oferecem várias vantagens sobre os sistemas abertos, como a eliminação da variabilidade existente na fonte natural de luz, um bom controle do processo e um baixo custo para recuperar a biomassa devido a obtenção de uma elevada densidade celular (MIAO; WU, 2006, XU; MIAO; WU, 2006, HUANG et al., 2010). Porém, assim como os fotobiorreatores abertos, os fechados também apresentam algumas desvantagens que necessitam ser consideradas e resolvidas. Suas principais limitações incluem: sobreaquecimento, bio-incrustantes, acúmulo de oxigênio, dificuldade de ampliação, elevados custos de construção, operação e do cultivo dos micro-organismos, danos às células pelo estresse de cisalhamento (shear stress) e deterioração do material utilizado para a fase luminosa. O custo da produção de biomassa de microalgas em fotobiorreatores fechados pode ser maior que em tanques. Isto dependerá do destino que será dado às células microbianas (obtenção de produtos químicos de alto ou baixo valor agregado). Para a produção de biocombustíveis, que são produtos de baixo valor agregado e tendem a um baixo custo no mercado de modo a torná-los viável economicamente, a escolha do sistema ideal de cultivo é de fundamental importância. Uma alternativa que vem sendo estudada, nesse caso, é o aproveitamento de efluentes industriais ou domésticos (como fonte de nutrientes) e a própria infraestrutura de estação de tratamento de efluente, com sistema de lagoa de estabilização, para a obtenção de biomassa de micro-organismos fotossintéticos. Além disso, os sistemas utilizados para a obtenção de biocombustíveis (etanol, biodiesel, biogás, hidrogênio) devem ser integrados para um maior aproveitamento da biomassa e diminuição dos custos (BRENNAN; OWENDE, 2010; CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

3.4.3. Fatores que influenciam o crescimento dos micro-organismos fotossintéticos

Embora a capacidade de produzir lipídeos pelas células microbianas seja geneticamente controlada, a quantidade e qualidade de óleo produzido são diretamente relacionadas com os estímulos recebidos a partir do meio de cultivo, esses estímulos estão relacionados com os componentes que fazem parte dos meios de cultura e são responsáveis pelo crescimento da biomassa e teor de lipídeos, tais como: dióxido de carbono, água, intensidade da luz, pH, temperatura e salinidade. Uma vez que o meio de cultivo é otimizado especificamente para cada linhagem, a produção de lipídeo pelas células pode ser independente do sistema de cultivo. Alguns autores revelam que um quilograma de biodiesel poderia ser obtido a partir de aproximadamente 12 kg de biomassa de micro-organismos fotossintéticos (VERMA et al., 2010; PETKOV et al., 2012). Sendo assim, a produtividade de biomassa e o teor de lipídeos acumulado pelas células microbianas dependem de diversos fatores, tais como:

- *Gás carbônico (CO_2):* Os micro-organismos fotossintéticos (microalgas e cianobactérias) são dez vezes mais eficientes em relação à fixação do CO_2 atmosférico do que as plantas terrestres, no entanto, esta eficiência pode variar de acordo com a espécie. A fonte de carbono mais utilizada no cultivo de microalgas é o CO_2 . Assim, o custo de entrada do CO_2 no cultivo desempenha um papel vital na economia de produção de biodiesel. O fornecimento de CO_2 pode ser alcançada sob condições naturais. Existem áreas que têm elevada concentração de CO_2 e estes locais podem ser utilizados para a construção de tanques apropriados ou fotobiorreatores para o cultivo dos micro-organismos. A principal vantagem em utilizar CO_2 como fonte de carbono é o fato de que este pode ser proveniente da combustão dos gases das indústrias de aço, usinas térmicas e alcooleiras (Brasil é um dos maiores produtores de etanol), que pode contribuir de uma maneira significativa para a redução do efeito estufa e aquecimento global e além do mais é uma das melhores estratégias para melhorar a viabilidade prática do processo de ponto de vista econômico e ambiental (VERMA et al., 2010; CGEE, 2010; PETKOV et al., 2012).

- *Água e nutrientes:* A água e os nutrientes presentes no meio de cultivo dos micro-organismos são fundamentais para obter-se um bom crescimento e qualidade das células. Podem ser utilizadas águas residuárias ou salinas, o que contribui para reduzir o custo do meio de cultura. Muitas espécies de microalgas e cianobactérias não precisam competir com outros micro-organismos de água doce e, portanto, o cultivo realizado utilizando

águas residuárias pode ser considerado como fenômeno de remediação biológica. Diversos estudos têm sido realizados por meio de águas residuárias para o cultivo de microalgas e cianobactérias, especialmente para a remoção de nitrogênio, sais de fósforo de efluentes e metais. As células desses micro-organismos crescem de uma maneira eficaz em ambos os sistemas: água doce e salina com concentrações de até o dobro da água do mar pesados (HERNANDEZ; DE-BASHAN; BASHAN, 2006; SHI; PODOLA; MELKONIAN, 2007; MUNOZ; GUIEYSSE, 2006).

Geralmente, a deficiência de nitrogênio no meio de cultivo afeta a síntese e acúmulo de lipídeos e ácidos graxos, sendo constatada por diversos autores, comprovando-se a influência no metabolismo lipídico e alterações significativas em relação ao teor de ácido graxo obtido por diversas espécies de microalgas e cianobactérias. A deficiência de fósforo resultou em resultados controversos: aumento de lipídeos por algumas espécies e redução de lipídeos para outras. Escassez de enxofre também resultou no incremento do conteúdo de lipídeos totais (SAHA; UMA; SUBRAMANIAN, 2003; KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2006; VERMA et al., 2010).

- *Seleção de linhagens*: Para manter a viabilidade econômica da produção comercial de biodiesel, a seleção da linhagem apropriada de acordo com o local de cultivo é fundamental. Existem espécies que são tolerantes a elevadas concentrações de sal, altos níveis de CO₂ e ao mesmo tempo capazes de crescer e se reproduzir sob escassez nutricional, alterando suas vias metabólicas de forma a obterem-se os produtos de interesse. Sendo assim, um importante critério para selecionar a linhagem adequada para determinado objetivo é conhecer seus fatores de crescimento, taxa metabólica e eficiência sob diferentes condições ambientais (SHEEHAN et al., 1998; VERMA et al., 2010).

- *Intensidade da luz*: Micro-organismos fotossintéticos são capazes de crescer sob diferentes intensidades de luz. Elevadas intensidades de luz favorecem a produção de lipídeos neutros de armazenamento, principalmente os triglicerídeos. Em contraste, lipídeos polares são formados sob baixa intensidade de luz. A luz é absorvida pelos micro-organismos, de modo a realizar-se a fotossíntese. A luz solar está disponível em diferentes intensidades em diferentes localizações geográficas, sendo assim, sistemas de lagoas abertas devem ser colocados nas regiões onde a recepção de luz solar é abundante e intensa. Em fotobiorreatores, a intensidade da luz pode ser melhorada por meio da utilização de conectores solares, concentradores solares e de fibra óptica. No entanto, para reduzir o custo econômico da produção de biodiesel, os micro-organismos fotossintéticos

devem ser cultivados utilizando luz solar livremente acessível (CHISTI, 2007; VERMA et al., 2010).

- *Temperatura*: A temperatura empregada no cultivo tem um grande efeito sobre a produtividade da biomassa e a composição de ácidos graxos dos micro-organismos. Existe uma tendência geral para insaturação dos ácidos graxos com a diminuição da temperatura e formação de ácidos graxos saturados com o aumento da temperatura. Esse evento tem sido observado para muitas espécies. Em alguns casos observou-se também que o teor de lipídeos aumenta com o aumento da temperatura. Por outro lado, em algumas espécies crescidas sob diferentes condições de temperatura, nenhuma mudança significativa foi observada no teor de lipídeos. No entanto, pesquisas sobre o efeito da temperatura no teor de lipídeo produzido pelas células precisam ser mais exploradas (RENAUD et al., 2002; VERMA et al., 2010).

3.5. Colheita e recuperação da biomassa celular

Depois da etapa do cultivo, a biomassa precisa ser separada do meio de cultura usando um ou mais passos de separação sólido-líquido. Devido ao tamanho pequeno dos micro-organismos (3-30 μm) e culturas bem diluídas no meio, eles precisam ser concentrados para simplificar o processo de extração dos lipídeos. A recuperação e colheita da biomassa não é uma etapa simples e exige cautela na escolha do método adequado. Os custos de colheita podem contribuir com 20 a 30% do custo total de produção de biomassa lipídica usada para síntese de biodiesel. Dentre os principais métodos que podem ser aplicados para a colheita e remoção do conteúdo de água e separação da biomassa celular incluem: floculação; centrifugação e filtração. Muitas vezes o método de floculação é considerado um pré-tratamento para melhorar a eficiência de recuperação dos outros métodos. A sedimentação da biomassa também é uma técnica eficaz, mas não é tão adequada para produção de biodiesel, uma vez que envolve muito tempo e pode afetar gravemente o custo global do processo (GRIMA et al., 2003; VERMA et al., 2010; TAHER et al., 2011).

A Tabela 3.7 apresenta as principais vantagens e desvantagens desses métodos. Importante ressaltar que para escolha do método ideal de colheita da biomassa deve-se levar em conta o tipo de espécies (forma e tamanho), densidade, volume e tamanho do sistema e, principalmente o valor do produto alvo (SCHENK et al., 2008; VERMA et al., 2010; TAHER et al., 2011).

Tabela 3.7. Vantagens e desvantagens dos métodos de separação da biomassa.

Método	Vantagen	Desvantagen
Floculação	Rendimento de recuperação elevado	Floculantes podem ter custo elevado Pode ocorrer contaminação Ambiente marinho de alta salinidade pode inibir o processo
	Baixo gasto energético	Longo período de processo
Centrifugação	Confiável	Utilização intensiva de energia
	Resistente à corrosão Fácil para limpar Rápido	Custo elevado Alta velocidade pode deteriorar a célula Não pode ser usado para linhagens muito pequenas (inferiores a $<30\ \mu\text{m}$)
Filtração	Confiável	Os filtros podem precisar ser substituídos periodicamente
	Capaz de coletar espécies de baixa densidade	Entupimento da membrana Alto custo de manutenção Pode ser lenta Perda de biomassa

- Floculação: é um método aplicado para criar aglomerados de massa microbiana de modo que ele pode ser facilmente removido da água. A técnica pode ser floculação biológica, na qual as células começam a acumular-se devido à afinidade ou pode ser floculação química, na qual certos produtos químicos tais como: sulfato de alumínio, quitosana, cloreto férrico e sulfato férrico são usados para promover a formação de aglomerados celulares. Muitas vezes é considerado como estágio de pré-tratamento que antecede o processo de colheita principal. Os principais problemas enfrentados no processo de floculação são o alto custo e a toxicidade dos floculantes. Dentre diversos produtos químicos testados como floculantes de micro-organismos tem se destacado o sulfato de alumínio e certos polímeros catiônicos.

- Centrifugação: é bastante eficiente, e comumente usado para recuperar micro-organismos em grandes volumes. Quase todos os tipos de micro-organismos podem ser separados do meio de cultura por centrifugação. A centrífuga é considerada um tanque de sedimentação com um reforço da força gravitacional, que aumenta a taxa de sedimentação. Essa técnica depende do tamanho de cada célula, que irá definir o tempo de residência dentro da centrífuga, estabelecendo-se, a taxa e o tempo necessário. Trata-se de um método rápido, porém, requer um gasto elevado de energia. No entanto, este processo é o mais utilizado para recuperação das células dos micro-organismos. Atualmente, não há um método de colheita e separação das células de baixo custo para todas as espécies (GRIMA et al., 2003; UDUMAN et al., 2010; VERMA et al., 2010; TAHER et al., 2011).

- *Filtração*: faz uso de uma membrana permeável que tem capacidade de reter a biomassa e permitir a passagem do líquido. Pode ser realizada sob pressão ou vácuo se os tamanhos dos micro-organismos não forem muito pequenos, sendo mais comumente utilizados para espécies que são filamentosas. Esse método é bastante satisfatório para a recuperação de microalgas com tamanho grande, ao contrário daquelas que apresentam tamanho similar ao de bactérias, bem como as cianobactérias.

- *Sedimentação*: Sedimentação é uma técnica que separa suspensão dos micro-organismos em uma suspensão concentrada e o líquido do meio de cultivo torna-se claro, com base em ação da gravidade e diâmetro da partícula. Em muitos casos, quando o tamanho das células é muito pequeno, torna-se inevitável o emprego de flocculantes para facilitar a técnica. Este é um processo de baixo custo, no entanto, a sua confiabilidade é baixa.

3.6. Extração de lipídeos das microalgas e cianobactérias

A etapa que antecede a extração dos lipídeos é a secagem da biomassa, que muitas vezes merece atenção especial para a maioria dos métodos de extração dos lipídeos. A secagem ao sol é o método mais barato, porém, mais lento para a desidratação de biomassa microbiana. Alguns métodos de secagem mais eficientes, entretanto de custo mais elevado, envolvem as tecnologias de: secagem de tambor, secagem a jato, liofilização e tecnologia de desidratação. Existem vários métodos diferentes para extrair lipídeos a partir de biomassa microbiana previamente desidratada, incluindo prensas, extração de solvente convencional, enzimáticas e outros métodos utilizados apenas em escala de laboratório, tais como extração assistida por ultrassons, choque osmótico e extração com dióxido de carbono supercrítico (LI et al., 2008; GONG; JIANG, 2011; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Os principais processos de extração de lipídeos são:

- *Extração por prensas*: tem como princípio a utilização de força mecânica para fazer a ruptura das células e sua concepção deve ser adaptada para cada linhagem. Existem diversas prensas disponíveis no mercado, tais como: parafuso, pistão, dentre outras. Prensas de rosca são usadas para extrair óleo a partir de uma variedade de sementes oleaginosas. Apesar da aplicação deste método não ter sido relatada na literatura para extração de lipídeos de células microbianas, deve ser considerada como uma opção viável para a extração em escala comercial de óleos microbianos.

- **Extração por solvente:** A utilização de solventes, tais como: hexano e clorofórmio têm sido os métodos mais rápidos e eficientes para a extração de lipídeos a partir das células microbianas. No entanto, as desvantagens de usar método de extração por solvente em grande escala são referentes aos custos energéticos adicionais advindos da etapa de recuperação dos solventes (destilação). Adicionalmente, os riscos de incêndio e explosão devem ser considerados. Por outro lado, a extração com solvente é o método mais econômico disponível atualmente (GREENWELL et al., 2010; GONG; JIANG, 2011).

- **Choque osmótico:** ocorre por meio de uma redução brusca na pressão osmótica, fazendo com que as células em solução sofram ruptura e possam liberar o óleo intracelular e os demais componentes. Esse método é particularmente adequado para algumas espécies marinhas de microalgas, que apresentam parede celular mais espessa, como a *Dunaliella* sp.

- **Extração com CO₂ supercrítico:** é um método bastante eficiente para a extração completa de óleos. A baixa viscosidade e difusividade elevada de CO₂ supercrítico podem resultar em maior eficiência de extração, e CO₂ pode ser reciclado durante este processo.

- **Extração enzimática:** utiliza enzimas para degradar a parede celular na presença de água atuando como solvente.

O custo, a eficiência, toxicidade e a facilidade do processo de extração do óleo são os aspectos mais importantes a serem considerados quando o método de extração é escolhido. Devido aos altos custos operacionais, extrações com dióxido de carbono supercrítico e choque osmótico são utilizadas apenas em escala de laboratório, porém não são métodos adequados para produção em larga escala de óleos microbianos. Extração enzimática ainda não é comercialmente viável, mas o esforço é essencial para reduzir o custo do processo. Existem alguns métodos de extração de óleos que apresentam certa limitação para serem aplicados em larga escala e outros aspectos comercialmente viáveis ainda são necessárias, tendo em vista a produção de biodiesel e a redução do custo do processo (FAJARDO et al., 2007; HALIM et al., 2011; GONG; JIANG, 2011).

3.7. Acúmulo de lipídeos em microalgas e cianobactérias

A avaliação do potencial dos micro-organismos fotossintéticos oxigênicos como fonte alternativa de combustível fóssil teve início nos anos de 1970 durante a crise do gás natural (BARKLEY; LEWIN; CHENG, 1987), mas os custos de produção proibitivos e as

limitações desencorajaram o desenvolvimento comercial desses organismos para produção de combustível. Os estudos subsequentes, continuados nos anos de 1980 e ampliados nos últimos 15 anos, ilustram que o desenvolvimento de pesquisas está permitindo que o potencial comercial dos micro-organismos fotossintéticos como cultura aquática, produtos químicos finos, e alimentos saudáveis (DE LA NOUE; DE PAUW, 1988; BORGES, 2005; MEINERZ, 2007; OHSE et al., 2008), seja deslocado para a produção de biocombustível (WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011).

Atualmente o biodiesel obtido a partir de biomassa está atraindo muita atenção e investimentos. A comparação entre plantas e micro-organismos fotossintéticos como substitutos do petróleo mostram as vantagens significativas dos micro-organismos (RITTMAN, 2008), conforme pode ser visualizado na Tabela 3.8. A mais importante é a produção 100 vezes maior de lipídeos por hectare dos micro-organismos (CHISTI, 2007; CAMPBELL, 2008).

Tabela 3.8. Comparação entre plantas e micro-organismos fotossintetizantes como fonte de material de alto teor lipídico para geração de biodiesel.

Fator	Planta de alto teor lipídico^a	Micro-organismo fotossintetizante^b
Tempo de duplicação	Relativamente longo (semanas)	Relativamente curto (dias)
Necessidade de terra cultivável?	Sim	Não
Colheita	Sazonal, 1 ou 2 colheitas por ano	Contínua
Qualidade de biomassa – homogeneidade	Heterogênea, com folhas, caules, sementes, raízes etc.	Homogênea
Qualidade de biomassa – lignocelulose	Sim	Não
Uso de água	Alto devido à evapotranspiração	Baixo a moderado se controlado
Uso de fertilizante	Alta taxa de uso e sujeito a escoamento	Maleável na captura de nutriente e reciclagem
Rendimento lipídico por área ^c	Baixo $<1.000 \text{ L ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$	Alto, $\sim 100.000 \text{ L ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$

^aAs plantas de alto teor lipídico aqui consideradas são soja e girassol.

^bMicro-organismos fotossintetizantes incluem microalgas e cianobactérias.

Adicionalmente, outras características desses micro-organismos fotossintéticos, tais como, período muito menor de duplicação de biomassa, colheita contínua, estrutura física mais homogênea, somadas ao fato de que eles não requerem terras aráveis e, portanto, não

competem com a produção de alimentos, indicam o potencial para substituição de grandes quantidades de combustível fóssil.

As microalgas e cianobactérias podem acumular elevados teores de lipídeos, entretanto, esses dois tipos de micro-organismos fotossintéticos diferem em outros aspectos que podem ser importantes na produção de biodiesel.

As microalgas acumulam grande quantidade de lipídeos como material de reserva, mas elas fazem isso nas condições de estresse e crescimento lento (RITTMANN, 2008). Em contraste, as cianobactérias acumulam lipídeos nas membranas dos tilacóides, as quais estão associadas com altos níveis de fotossíntese e rápida taxa de crescimento. Assim, as cianobactérias têm uma vantagem natural para produzir lipídeos em altas taxas de crescimento. Além do mais, as cianobactérias por serem organismos procarióticos, podem ser melhoradas por meio de manipulações genéticas muito mais prontamente do que as microalgas eucarióticas (VERMAAS, 1988; NOBLES; BROWN, 2008). Por exemplo, os genes da síntese da celulose de uma proteobactéria foram transferidos para uma cianobactéria, e a celulose heteróloga produzida apresenta potencial para produção de biocombustível (NOBLES; BROWN, 2008). Outro exemplo, uma mutação em um gene de uma linhagem de *Synechocystis* propiciou o acúmulo de até 50% de lipídeos (RITTMANN, 2008).

Desta forma, a possibilidade econômica da produção de biodiesel de cianobactérias e microalgas pode ser significativamente aumentada devido as estratégias de co-produto de alto valor, como por exemplo, o emprego de abordagens integradas de biorrefinarias, que visa aumentar a rentabilidade econômica total da produção de biodiesel pelos micro-organismos fotossintéticos.

3.7.1. Lipídeos de microalgas

No que se referem às microalgas, os níveis de óleo mais comumente encontrados estão na faixa de 20-50% (BRENNAN; OWENDE, 2010). A Tabela 3.9 mostra a capacidade de acúmulo de lipídeos em diversas linhagens de microalgas, dentre as quais se destacam aquelas que apresentam produtividades elevadas de óleo por serem as mais adequadas para produzir biodiesel.

As microalgas usadas para produção de lipídeos podem ser divididas em duas categorias (LV et al., 2010): a primeira produz alto conteúdo de lipídeo, porém baixa produtividade celular, como a *Botryococcus braunii*, que pode produzir um teor de lipídeo de 50%, porém, com baixa produtividade de biomassa: 28 mg/L/dia (DAYANANDA et al.,

2007), e a segunda produz alto conteúdo de células, porém baixo teor de lipídeos, como a microalga *Chlorella vulgaris*, que requer um tempo menor de cultivo, entretanto produz quantidade inferior a 20% de óleo (GRIFFITHS; HARRISON, 2009).

Tabela 3.9. Teor de óleo de algumas microalgas.

Microalga	Teor de óleo (% massa seca)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Fonte: CHISTI, 2007.

Ambas as fontes de carbono: inorgânico (CO_2 e Na_2CO_3) e orgânico (glicose, acetato, entre outras) podem ser utilizados por microalgas para induzir a produção de lipídeos. Os componentes e conteúdo de lipídeos nas células de microalgas podem variar de espécie para espécie. As classes de lipídeos encontradas são: lipídeos neutros (triglicerídeos) e lipídeos polares (fosfolipídeos). Os triglicerídeos são os principais a serem utilizados na produção de biodiesel. A rota de síntese de triglicerídeos em microalgas pode ocorrer nas seguintes etapas: formação de acetil coenzima A no citoplasma; alongamento e insaturação da cadeia carbônica de ácidos graxos e biossíntese de triglicerídeos (HUANG et al., 2010).

3.7.2. Lipídeos de cianobactérias

Dependendo da linhagem e condições de cultivo, as cianobactérias podem sintetizar de 10 a 45% de lipídeos (MIAO; WU; YANG, 2004; SHARATHCHANDRA; RAJASHEKHAR, 2011; KARATAY; DÖNMEZ, 2011). A Tabela 3.10 mostra a produção de lipídeos de algumas linhagens de cianobactérias.

Tabela 3.10. Teor de lipídeos (%) produzido por diferentes linhagens de cianobactérias.

Linhagem	Teor de lipídeos (%)	Referência
<i>Microcystis aeruginosa</i>	12,50	MIAO; WU; YANG, 2004
<i>Oscillatoria calcutensis</i>	25,70	
<i>Oscillatoria acuminata</i>	24,65	
<i>Nostoc linckia</i>	18,45	
<i>Calothrix fusca</i>	22,60	
<i>Lyngbya limnetica</i>	18,10	
<i>Phormidium purpurescens</i>	26,45	
<i>Microcystis aeruginosa</i>	28,15	
<i>Lyngbya dendrobia</i>	10,55	
<i>Oscillatoria perornata</i>	14,10	
<i>Phormidium ambiguum</i>	10,48	
<i>Oscillatoria amoena</i>	18,63	
<i>Scytonema bohnerei</i>	22,22	
<i>Oscillatoria chlorina</i>	16,62	
<i>Synechococcus</i> sp.	42,80	SHARATHCHANDRA; RAJASHEKHAR, 2011
<i>Phormidium</i> sp.	38,20	
<i>Cyanobacterium aponinum</i>	45,00	

Os lipídeos produzidos pelas cianobactérias apresentam composição em ácidos graxos mais simples que algas. De acordo com a classificação original de Kenyon, Rippka e Stanier, 1972, as cianobactérias podem ser divididas em 4 grupos baseados na sua composição de ácidos graxos, conforme pode ser visualizado na Tabela 3.11.

Tabela 3.11. Exemplos representativos de composição de ácidos graxos de cianobactérias.

Grupo	Organismo	Composição de ácidos graxos (% total)						
		16:0	16:1	18:1	18:2	α-18:3	γ-18:3	18:4
1	<i>Anacystis nidulans</i>	46	46	3	0	0	0	0
2	<i>Anabaena variabilis</i>	32	22	11	17	16	0	0
3	<i>Synechocystis</i> 6714	28	4	5	17	0	31	0
4	<i>Tolypotrix tenuis</i>	22	3	16	15	6	13	14

Fonte: (MURATA; NISHIDA, 1987; GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTRA, 2007).

O grupo 1 sintetiza ácidos graxos saturados e monoinsaturados, enquanto os outros 3 grupos sintetizam linoleato poliinsaturados, acumulando γ -linolenato, α -linolenato e (*n*-3) octadecatetraenoato, respectivamente.

Entre os ácidos graxos tipicamente encontrados em cloroplastos, apenas alguns estão presentes em cianobactérias, como: monogalactosildiacilglicerol, diagalactosildiacilglicerol, sulfoquinovosildiacilglicerol e fosfatidilglicerol (MASLOVA et

al., 2004). Em heterócitos de cianobactérias fixadoras de nitrogênio, glicosídeos não usuais já foram encontrados (BRYCE et al., 1972; MURATA; NISCHIDA, 1987; GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTRA, 2007).

3.8. Propriedades do biodiesel

O biodiesel pode ser utilizado como combustível puro, na forma de mistura, como complemento ao diesel extraído de petróleo, ou em baixas proporções como aditivo. Uma das grandes vantagens do biodiesel é sua adaptabilidade aos motores do ciclo diesel. Enquanto o uso de outros combustíveis limpos, como o gás natural ou biogás, requer adaptação dos motores, a combustão de biodiesel pode dispensá-la, configurando-se em uma alternativa técnica capaz de atender a frota movida a diesel (RAMOS et al., 2003; PINTO et al., 2005).

As propriedades dos ésteres graxos que constituem o biodiesel determinam as propriedades finais do combustível. Estas propriedades são determinadas pelas características estruturais das moléculas de ácidos graxos e do agente acilante (álcool) que geram o éster. Algumas das características estruturais que influenciam nas propriedades do biocombustível são: o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações nas moléculas de ácidos graxos (KNOTHE et al., 2003). Sendo assim, para um bom funcionamento nos motores, é necessário analisar e conhecer as propriedades físicas e químicas do biodiesel. A padronização do biodiesel é estabelecida por normas, dentre as quais se destacam e são mais utilizadas: ASTM D6751 (American Society for Testing and Materials - Estados Unidos), EN 14214 (European Norm - Europa) e ANP255 (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - Brasil) (KNOTHE et al., 2006).

A análise destas características são fatores determinantes para a obtenção de um biocombustível de alta qualidade, sendo que as análises químicas e físicas são conduzidas por metodologias variadas, de modo a verificar a qualidade do biodiesel, tais como: número de cetano, calor de combustão, viscosidade, ponto de névoa, ponto de fluidez, entre outras (KNOTHE et al., 2006).

No Brasil, por meio da Portaria 255 de 15/09/03, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) estabeleceu as especificações iniciais para o biodiesel puro a ser adicionado no óleo diesel automotivo para testes em frotas cativas ou para uso em processo industrial específico nos termos da Portaria 240 de 25/08/03.

Posteriormente, a especificação definitiva para o biodiesel foi publicada na Portaria 42 (KNOTHE et al., 2006).

Em 2010 foi promulgada a resolução ANP nº 4, de 2 de fevereiro de 2010, que alterou o parágrafo único do art. 1º, o item 2.1 Métodos ABNT e a tabela do Regulamento Técnico ANP nº 1/2008, todos dispositivos da Resolução ANP nº 7/08, que dispõe sobre a especificação do biodiesel.

Neste ano de 2012 foi promulgada a resolução ANP nº 14, de 11 de maio de 2012, na qual está atualizado o Regulamento Técnico nº 4/2012 de acordo com a nova especificação do biodiesel (ANP, 2012).

A especificação brasileira é similar à européia e americana, com alguma flexibilização para atender às características de matérias-primas nacionais. Sendo que, para alguns itens, a ANP não estabeleceu um valor máximo ou mínimo de referência. Por outro lado, algumas propriedades são mais criteriosas, como a viscosidade (a mistura B20 deve atender a viscosidade especificada para diesel) e o índice de iodo (indicador de ligações duplas e, portanto do nível de insaturação do biodiesel). Isto visa não criar obstáculos à utilização de algumas matérias-primas, como a mamona (alta viscosidade) ou a soja e o girassol (alto teor de ácido linoleico, poli-insaturado e, portanto com alto índice de iodo).

- Número de cetano: O número de cetano é um indicativo adimensional da qualidade de ignição de um combustível diesel. Esta propriedade é similar a octanagem, termo mais conhecido e usado para a gasolina e álcool. Um combustível com alta octanagem tende a ter baixo número de cetano, em outras palavras, a octanagem por definição indica a dificuldade de explosão, enquanto a cetanagem indica a facilidade dela. O combustível de referência de alta qualidade para determinar o número de cetano é o hexadecano ($C_{16}H_{34}$), um hidrocarboneto longo de cadeia linear. O número de cetano de um combustível diesel é determinado pelo tempo de retardamento da ignição, isto é, pelo tempo que passa entre a injeção do combustível nos cilindros e a ocorrência da ignição. Valores fora de uma faixa adequada para combustíveis diesel ocasionam problemas no bom funcionamento do motor. Combustíveis com alto número de cetano, a combustão pode ocorrer antes do combustível e do ar estarem apropriadamente misturados, resultando na emissão de fumaça e uma combustão incompleta. Valores de número de cetano muito baixo podem ocasionar trepidações no motor, falhas no funcionamento, aumento excessivo na temperatura do ar, aquecimento lento do motor na partida fria (1ª partida do dia) (KNOTHE et al., 2003; KNOTHE et al., 2006).

É importante ressaltar que nem sempre é possível realizar testes para determinar o número de cetano devido ao alto custo dos combustíveis de referência e também por se tratar de uma análise que necessita de uma grande quantidade de amostra (o que dificulta pesquisas a nível laboratorial). Assim, alguns autores têm proposto métodos alternativos, visando estimar o número de cetano do biodiesel, a partir da mistura de ésteres alquílicos, tomando por base a utilização de equações empíricas (RAMOS et al., 2009). Sabe-se que o índice de cetano do biodiesel depende da matéria-prima utilizada para a sua produção. Quanto maior as cadeias carbônicas de ácidos graxos e mais saturados, maior será o número de cetano. É evidente que o número de cetano se encaixa de forma linear com o grau de insaturação. Portanto, existe uma faixa para o número de cetano de acordo com cada norma, que é recomendada para atender as especificações. Segundo a norma européia, o número de cetano deve ser no mínimo 51. Portanto, matérias-primas com elevado grau de insaturação não são capazes de atender o padrão Europeu para o índice de cetano. Índices de cetano baixo estão associados com os componentes altamente insaturados, tais como: ésteres de ácido linoleico (C18: 2) e linolenico (C18: 3). De acordo com Knothe et al. (2003), números de cetano elevados foram encontrados para os ésteres de ácidos graxos saturados, tais como: ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), como é o caso do biodiesel de óleo de palma (matéria-prima rica nestes ácidos graxos), que resultou em elevado número de cetano. Resultados similares foram encontrados por outros pesquisadores, observando um aumento do número de cetano com o aumento da percentagem de palmitato de metila em uma mistura (RAMOS et al., 2009).

A escala de cetano esclarece o porquê dos triacilgliceróis encontrados nos óleos e gorduras serem adequados para uma alternativa de combustível diesel. A cadeia longa, linear e não ramificada dos ácidos graxos, similar às existentes em *n*-alcanos dos combustíveis diesel tradicionais de boa qualidade, remetem a um alto número de cetano.

- Índice de iodo: O índice de iodo é uma medida da insaturação total dentro de uma mistura de ácidos graxos. É expressa em gramas de iodo que reagem com 100 g da amostra respectiva, refletindo na adição de iodo para as duplas ligações. O índice de iodo de um óleo vegetal ou gordura animal é quase idêntica à dos ésteres alquílicos correspondentes (KNOTHE, 2005). De acordo com a norma européia (EN 14214) o índice de iodo é limitado a 120g I₂/100g. Esse limite exigido pelos padrões europeus exclui o biodiesel de várias fontes promissoras, tais como: soja e girassol. Na Espanha, o Real Decreto 61/2006 exige a inclusão da norma européia para biodiesel, com exceção do valor de índice de iodo,

que muda de 120 para 140. De acordo com este Real Decreto Espanhol, todos os óleos vegetais apresentam limites satisfatórios para o índice de iodo. A limitação de ácidos graxos insaturados é necessária devido ao fato de que aquecimentos elevados desses ácidos graxos resultam em polimerização dos triacilgliceróis. Isto pode levar à formação de depósitos, ou a deterioração do lubrificante no motor. A correlação entre o índice de iodo e do grau de insaturação (GI) resulta em um aumento linear, conforme o esperado: quanto maior a insaturação presente no óleo, maior será o valor de iodo. Segundo a norma européia, a quantidade máxima de ácido linolenico (C18: 3) que deve conter a matéria-prima lipídica é 12,0%, visando atender as especificações para o índice de iodo. Acima desse valor, a matéria-prima pode resultar em maior grau de insaturação, e consequentemente fora da faixa estabelecida pela norma. Por outro lado, óleo de palma, rico em ésteres de ácidos graxos saturados, tais como palmítico (C16: 0) e esteárico (C18: 0), apresenta índice de iodo inferior (RAMOS et al., 2009).

- Estabilidade à oxidação: A estabilidade a oxidação do biodiesel é outro parâmetro importante para determinar por quanto tempo as características do produto final serão preservadas sob condições de armazenagem, calor, umidade, presença de traços de metais e a natureza do tanque de armazenamento. As razões para auto-oxidação do biodiesel estão relacionadas à presença de ligações duplas nas cadeias de várias substâncias graxas. Estas reações de oxidação ocorrem em diferentes velocidades, dependendo do número e da posição das duplas ligações (FREEDMAN; BAGBY, 1989). Estudos comprovaram que altas temperaturas, presença de metais, luz e ar facilitam o processo de oxidação, sendo a estrutura do ácido graxo o fator mais influente sobre a propriedade oxidativa do biodiesel.

Quanto maior o conteúdo de ésteres alquílicos poli-insaturados nas amostras de biodiesel, mais suscetível a sofrer oxidação (KNOTHE, 2005). Uma solução viável para a resistência do biodiesel contra autooxidação é tratá-los com inibidores de oxidação (antioxidantes). A oxidação de compostos graxos insaturados depende do número e posição das duplas ligações. As posições das duplas ligações nos ácidos graxos linoleico e linolenico são mais suscetíveis a autooxidação. Taxas relativas de oxidação apresentadas na literatura são 1 para oleato de metila, 41 para linoleato de metila e 98 para linolenato de metila (KNOTHE, 2005; KNOTHE et al., 2006). Assim, matérias-primas ricas em ácidos linoleico e linolenico, tais como: soja e girassol tendem a apresentar baixa estabilidade à oxidação, enquanto matérias-primas com baixo teor desses ácidos graxos, tais como:

palma, azeite e óleo de amêndoas, geralmente apresentam melhor estabilidade (RAMOS et al., 2009).

Para melhorar essa estabilidade oxidativa do biodiesel alguns autores investigaram a influência de antioxidantes como o alfa-tocoferol, o butilato de hidroxianisole (BHA), o butilato de hidroxitolueno (BHT) para aumentar a estabilidade oxidativa do biocombustível. Os resultados obtidos revelaram que o biodiesel produzido a partir de diferentes tipos de matérias-primas apresentam por sua vez, diferentes níveis de estabilidade oxidativa. Reportaram também que a ação do antioxidante aumenta em função de sua concentração. Além disso, o local reservado para armazenagem do biodiesel é de crucial importância na manutenção das suas propriedades combustíveis por um maior período de tempo (TANG et al., 2008).

Para a análise desta propriedade existem vários métodos que remetem à qualidade do material. O índice de acidez apresenta uma boa alternativa para o acompanhamento da qualidade do combustível durante a armazenagem. Este índice revela o grau de oxidação do material e é expresso em miligramas de hidróxido de potássio para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em um grama de amostra. O índice de peróxido e o índice de iodo também estão relacionados com a estabilidade oxidativa do biodiesel.

- *Ponto de obstrução do filtro a frio*: Biocombustíveis destilados tipicamente são capazes de desenvolver problemas de operabilidade, tais como: sedimentação de cera e entupimento de filtros e linhas de combustível, quando submetido a baixas temperaturas (-10 a -15 °C). Cada país pode especificar certos limites de temperatura para diferentes épocas do ano, dependendo das condições climáticas (KNOTHE et al., 2006). Os ésteres metílicos de ácido esteárico e palmítico são os primeiros a precipitar e causar entupimento, portanto, biodiesel que apresenta quantidades elevadas desses constituintes são desfavoráveis para esta propriedade. O biodiesel de palma, por exemplo, rico nestes compostos, apresenta uma das mais elevadas temperaturas de POFF (ponto de obstrução do filtro a frio). Biodiesel de amendoim é rico em ésteres derivados de ácidos graxos saturados de cadeia longa como C22:0 e C24:0, que resulta em valor ainda mais elevado de POFF (17 °C), ou seja, abaixo dessa temperatura pode causar problemas de entupimento e obstrução no motor. Quanto maior as cadeias carbônicas presentes no biodiesel, pior as propriedades a baixas temperaturas. Neste sentido, o POFF das amostras de biodiesel está diretamente relacionado com a quantidade dos ésteres de ácidos graxos saturados de cadeia longa. Os ésteres insaturados não estão incluídos neste parâmetro porque os pontos de

fusão destes compostos são muito mais baixos em comparação com a dos saturados (RAMOS et al., 2009).

- Viscosidade: A viscosidade pode ser definida como uma resistência à vazão, associada à fricção ou atrito interno de uma parte do fluido que escoar sobre a outra afetando com isso o funcionamento do motor. Quanto maior a viscosidade, maior a tendência de ocasionar tais problemas. Apesar de ser favorável do ponto de vista energético, o uso de óleos *in natura* como alternativa aos combustíveis foi relativamente abandonada principalmente devido ao problema da alta viscosidade dos óleos. Estudos efetuados em diversos óleos vegetais mostraram que a sua combustão direta conduz à carbonização na cabeça do injetor, resistência à injeção nos segmentos dos êmbolos, diluição do óleo do cárter, contaminação do óleo lubrificante, entre outros problemas. As causas destes problemas foram atribuídas à polimerização dos triacilgliceróis por meio de suas duplas ligações que conduzem à formação de depósitos, assim como à baixa volatilidade e a elevada viscosidade dos óleos vegetais que geram problemas na atomização do combustível. Desta forma, surge o processo de transesterificação, o qual reduz essa viscosidade tornando o óleo ou gordura transesterificados uma alternativa viável para a utilização em motores do ciclo diesel (COSTA NETO; ROSSI, 2000; RAMOS et al., 2003; KNOTHE, 2005).

3.9. Perspectivas futuras do biodiesel a partir de biomassa microbiana

As energias renováveis representam apenas 13% do suprimento mundial, sendo que somente a biomassa atinge 10,5%. No panorama nacional, a matriz energética contempla 44% de fontes renováveis de energia, bem acima dos 13% da matriz mundial. No Brasil, as principais fontes de energias renováveis são: a cana de açúcar (16%), a hidroeletricidade (15%) e o carvão vegetal/lenha (12%). As principais vantagens que impulsionam a sua utilização são: preocupações com aquecimento global, busca por segurança energética e o elevado preço do petróleo.

Neste contexto, as energias renováveis estão chegando com força total no cenário mundial, constituindo-se em opções reais para participar na expansão da oferta de energia. Merecem destaques especiais as energias: eólica, solar, biomassa e a própria indústria dos biocombustíveis. Segundo o IEA (International Energy Agency), a economia de energia é a forma mais rápida e barata para se reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) (CGEE, 2010).

O Brasil se encontra em uma posição privilegiada para assumir a liderança no aproveitamento integral das biomassas pelo fato de possuir a maior biodiversidade do planeta; intensa radiação solar; água em abundância; diversidade de clima e pioneirismo na produção de biocombustíveis da biomassa em larga escala. Os micro-organismos fotossintéticos (microalgas e cianobactérias) despontam como um novo recurso renovável com potencialidades diversas em termos de bioenergia e produtos químicos. O país reúne, ainda, condições para ser o principal receptor de recursos de investimentos provenientes do mercado de carbono, por ter no meio ambiente a sua maior riqueza e possuir enorme capacidade de absorção e regeneração atmosférica. Neste sentido, as biomassas assumem posição estratégica na era pós-petróleo, uma vez que elas representam a grande fonte de materiais renováveis a serem utilizadas (CGEE, 2010).

Ressaltando que, enquanto a soja chega a aproximadamente 20% do seu teor em óleo, algumas espécies de microalgas e cianobactérias chegam a alcançar cerca de 60%. No entanto, o teor de óleo não seria tão significativo se a produtividade fosse insignificante. Afinal de contas, de que adianta ter uma matéria-prima com 90 % de óleo, se ela apresenta a capacidade de produzir apenas 1 kg por ano. Porém este fato não se encontra cabível no caso dos micro-organismos fotossintéticos, que pelo contrário, se multiplicam de maneira espantosamente rápida. Algumas espécies em particular, tais como: *Monoraphidium* e *Chaetoceros*, chegam muito perto de triplicar sua massa dentro de poucos dias (RODRIGUES, 2008).

De acordo com a pesquisa realizada por Briggs (2004), a produção de óleo a partir desses micro-organismos pode alcançar entre 7,7 mil e 23 mil litros por hectare cultivado ao ano. Comparados aos cinco mil litros de um hectare de dendê, oleaginosa mais produtiva até o momento, ou aos 500 litros conseguidos com a mesma área plantada de soja, esses números representam uma grande expectativa de ampliar a escala na produção de biodiesel. Adicionalmente, pode também contribuir para minimizar um dos grandes problemas que o biodiesel vem enfrentando hoje no Brasil, que está relacionado ao uso das oleaginosas para fins energéticos, podendo acarretar pressão tanto na disponibilidade de terra quanto na produção de alimentos. Dessa forma, o biodiesel deixa de competir pelas escassas e valorizadas terras férteis e água doce. Além do mais abrir novas áreas de cultivo para fontes oleaginosas acarretaria em problemas ambientais devastadores e consequentemente emissões de gases do efeito estufa (RODRIGUES, 2008). As Figuras 3.5 e 3.6 mostram, respectivamente, o estado atual e a previsão futura de produção de biocombustíveis (SHEEHAN, 2009).

Na Figura 3.5 verifica-se o desempenho atual de produção de biocombustíveis. Com relação à produção de milho, foi feita uma média da colheita de 150 alqueires com um rendimento de 10 litros de etanol obtidos por alqueire. No caso da celulose, o cálculo foi baseado na produção de 5 toneladas de biomassa em uma vasta extensão de cultivo, com rendimento de 280 litros por tonelada de biomassa. No caso de lipídeo de algas foi considerado um rendimento de 15 g por m² por dia com uma quantidade de 20 % de teor de lipídeo.

Com relação à Figura 3.6, baseada em estimativas futuras para a produção de biocombustíveis, projeta-se para a cultura do milho um aumento significativo da colheita alcançando 200 alqueires, com rendimento de etanol de 11,2 litros por alqueire. Para a celulose, estima-se que ocorra uma triplicação da produtividade de sua biomassa, alcançando 15 toneladas e consequentemente um acréscimo na produção de etanol de 400 litros por tonelada. Para o cultivo de algas, um crescimento bastante satisfatório está sendo estimado, alcançando em média 25g por m² quadrado por dia com elevado acúmulo de lipídeo, 50 % aproximadamente.

Figura 3.5. Desempenho atual da produção de biocombustíveis.

Figura 3.6. Desempenho previsto para o futuro da produção de biocombustíveis.

A Figura 3.7 mostra um sistema integrado para produção de biodiesel em larga escala empregando micro-organismos fotossintéticos como fonte de matéria-prima lipídica. Conforme pode ser observado, diversas etapas estão envolvidas desde o seu cultivo até a etapa final, em que a biomassa pode ser destinada tanto para produção de biodiesel (lipídeos extraídos das células), como para biorrefinaria, em que outros derivados da biomassa (pigmentos, proteínas, dentre outros) podem ser utilizados nos setores de cosméticos, fármacos e aditivos alimentares.

Figura 3.7. Sistema integrado para produção de biodiesel em larga escala empregando micro-organismos fotossintéticos como fonte de matéria-prima. (Adaptado Fonte: GONG; JIANG, 2011).

3.10. Exemplos de síntese de biodiesel utilizando matéria-prima lipídica produzida por micro-organismos fotossintéticos

A Tabela 3.12 relaciona alguns processos de obtenção de biodiesel por transesterificação, esterificação ou pirólise empregando diversas espécies de microalgas como produtoras de óleo.

Nagle e Lemke (1990) avaliaram diferentes tipos de solvente para realizar a extração do óleo de duas espécies diferentes de algas: *Chaetoceros muelleri* e *Monoraphidium minutum*. O tipo de catalisador, a concentração de catalisador, o tempo de reação, a temperatura e a qualidade dos lipídeos produzidos pelas algas foram examinados como variáveis da reação de transesterificação. O solvente mais eficiente para a extração do óleo foi o *n*-butanol, demonstrando 90% de capacidade extratora. Quanto ao catalisador empregado na reação, o ácido clorídrico foi o que forneceu rendimentos mais elevados em função da grande concentração de ácidos graxos livres.

Miao e Wu (2004) utilizaram apenas um tipo de alga: *Chlorella protothecoides*, porém foram comparados dois tipos diferentes de cultivo: autotrófico e heterotrófico. Após o cultivo, foram extraídos e quantificados todos os componentes obtidos nas diferentes condições. Os valores mais elevados de lipídeos foram encontrados na biomassa de *Chlorella protothecoides* cultivada em meio heterotrófico (55%), e o conteúdo de hidrocarbonetos saturados foi 4,2 vezes maior que no cultivo autotrófico. O rendimento mais elevado de bio-óleo produzido pela reação de pirólise foi alcançado quando se utilizou essa mesma cultura. Ao final da reação o bio-óleo foi caracterizado e comparado ao óleo fóssil, e os valores encontrados foram considerados altamente satisfatórios.

O trabalho desenvolvido por Xu e colaboradores (2006), teve como objetivo obter um biodiesel de alta qualidade a partir da microalga de *Chlorella protothecoides* pela rota de transesterificação ácida. A técnica do controle metabólico com o crescimento heterotrófico de *Chlorella protothecoides* foi aplicada e o cultivo da alga forneceu 55,2% de lipídeo. Para aumentar a formação de biomassa, hidrolisado de milho foi utilizado em substituição a glicose como a fonte de carbono orgânica no meio de cultura. O resultado indicou que a densidade das células foi aumentada significativamente sob a condição heterotrófica, e a concentração de biomassa mais elevada da ordem de 15.5 g/L foi alcançada em 184 h de cultivo (produtividade celular = 2,02 g/L/dia). O óleo microalgal foi facilmente extraído com hexano e convertido em biodiesel por meio da transesterificação ácida. Os resultados obtidos demonstraram que o biodiesel estava apto para ser utilizado em motores do ciclo diesel, sugerindo que este novo processo apresenta baixo custo, é viável e eficiente para a produção de biodiesel da alta qualidade a partir de microalgas.

Miao e Wu (2006) estudaram um método de produção de biodiesel a partir do óleo oriundo do cultivo da microalga *Chlorella protothecoides*. A microalga foi cultivada em meio heterotrófico empregando glicose como fonte de carbono. O rendimento de lipídeo obtido pelas células foi 55% e o óleo foi facilmente extraído com hexano. Foram avaliados os parâmetros que influenciam de maneira significativa na reação de transesterificação: temperatura, razão molar óleo de biomassa/metanol e quantidade de catalisador (H_2SO_4). As melhores condições determinadas foram: razão molar 56:1 (metanol/óleo) sob temperatura de 30°C. O parâmetro mais significativo foi à quantidade de catalisador empregado na reação (25, 50, 60 ou 100% em relação à massa de óleo), sendo o melhor resultado obtido quando se utilizou a quantidade máxima de catalisador. As análises dos ésteres metílicos revelaram propriedades similares às do combustível fóssil, podendo ser utilizado sem problemas em motores do ciclo diesel.

A produção de biodiesel de *Chlorella protothecoides* heterotrófica foi estudada por Li e colaboradores (2007), visando viabilizar o aumento da escala da produção de óleo a partir dessa microalga. Neste estudo foi avaliado o cultivo da microalga em 3 diferentes escalas: cultivo em escala de laboratório, em que os biorreatores apresentavam capacidade de 5 L; cultivo em escala piloto, com capacidade de cultivo de 750 L e cultivo em escala comercial com elevada capacidade de 11000 L. A densidade da biomassa algal foi semelhante em todos os cultivos: 15,5 g/L em 5 L; 12,8 g/L em 750 L e 14,2 g/L em 11000 L, correspondendo a 46,1%, 48,7% e 44,3% de teor de lipídeos, respectivamente. A reação de transesterificação foi catalisada pela lipase imobilizada de *Candida* sp numa proporção

de 75% em relação à massa de lipídeo contida no meio, correspondendo a 12000 unidades de atividade g^{-1} e razão molar 3:1 metanol/óleo microalgal. Após 12 h de reação obteve-se uma conversão de 98,15% e a produtividade alcançada foi semelhante para todos os cultivos (Tabela 3.12).

O trabalho desenvolvido por Cheng e colaboradores (2009), teve como objetivo a síntese de biodiesel a partir do óleo *Chlorella protothecoides*. O cultivo da microalga foi efetuado em meio heterotrófico empregando tubérculos de alcachofra (*Helianthus tuberosus* L.) como fonte de carbono. Os valores de produtividade celular e acúmulo de lipídeos foram comparados ao meio heterotrófico tradicional para o cultivo de microalgas (glicose como fonte de carbono). Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios indicando similaridade em ambos os casos. As propriedades do biodiesel avaliadas, tais como viscosidade e densidade demonstram que o produto obtido encontrava-se apto a ser usado sem problemas como combustível. Desta forma, o meio de cultivo heterotrófico testado demonstrou grande viabilidade econômica, tendo em vista que a glicose representa 80% do custo total do meio de cultivo.

Chinnasamy e colaboradores (2010) relataram o grande potencial do uso de águas residuárias como meio de cultivo de diversas espécies de microalgas. Um estudo foi conduzido usando água residuária contendo 85-90% de efluentes industriais com 10-15% de água de esgoto municipal monitorando o crescimento de biomassa algal e posteriormente o uso da biomassa como fonte de matéria-prima na produção de biodiesel. Espécies de algas nativas foram isoladas e um estudo preliminar indicou que tanto algas de água doce como algas marinhas cresceram no meio de águas residuárias. Aproximadamente 15 linhagens diferentes foram isoladas, sendo na sequência analisado o perfil da composição de ácidos graxos de cada biomassa algal. Constatou-se que 63,9% do óleo de biomassa algal pode ser convertido em biodiesel. Entretanto, estudos futuros precisam ser aprimorados para tornar essa rota viável.

Tabela 3.11. Processos de obtenção de biodiesel empregando microalgas e cianobactérias como fonte de lipídeo

Microalga	Reação	Catalisador	Observação	Referência
<i>Chaetoceros muelleri</i> <i>Monoraphidium minutum</i>	Transesterificação	Hidróxido de sódio Ácido clorídrico	Três solventes foram avaliados na eficiência da extração dos lipídeos das microalgas: <i>n</i> -butanol, etanol e hexano/ 2-propanol. O solvente mais eficiente foi <i>n</i> -butanol (eficiência de 90%), seguido por hexano/ 2-propanol e etanol. O rendimento mais elevado em ésteres metílicos de ácidos graxos foi obtido usando o ácido clorídrico 0,6N como catalisador da reação em metanol por 0,1h a 70°C.	NAGLE; LEMKE, 1990
<i>Chlorella protothecoides</i>	Pirólise	-	O rendimento do bio-óleo (57,9%) produzido pela reação de pirólise foi 3,4 vezes maior quando se utilizou a alga <i>Chlorella protothecoides</i> heterotrófica. O bio-óleo apresentou um índice de oxigênio muito mais baixo, com um valor calorífico mais elevado (41 MJ kg ⁻¹), uma densidade mais baixa (0,92 kg L ⁻¹) e baixa viscosidade (0,02 Pas) comparada àquelas do bio-óleo da alga <i>Chlorella protothecoides</i> autotrófica.	MIAO; WU, 2004
<i>Chlorella protothecoides</i>	Transesterificação	Catálise ácida	O cultivo da alga <i>Chlorella protothecoides</i> forneceu 55,2% de lipídeo. A concentração mais elevada das algas alcançou 15,5 g L ⁻¹ de óleo microalgal, o qual foi facilmente extraído usando hexano como solvente, e convertido em biodiesel por transesterificação ácida. O biodiesel apresentou um valor calorífico de 41 MJ kg ⁻¹ , densidade de 0,864 kg L ⁻¹ , e viscosidade de 5,2 x 10 ⁻⁴ Pa s (40°C).	XU; MIAO; WU, 2006
<i>Chlorella protothecoides</i>	Transesterificação	Catálise ácida (H ₂ SO ₄)	O cultivo da alga <i>Chlorella protothecoides</i> foi feito em meio heterotrófico, resultando um elevado acúmulo de lipídeo (55%). Os lipídeos foram extraídos das células empregando hexano como solvente. O biodiesel foi preparado por transesterificação ácida na razão molar 56:1 (metanol/óleo) a 30°C. O produto final resultante (biodiesel) apresentou as seguintes características: 0,864 kg/L (densidade); 5,2 cSt (viscosidade a 40°C); -12 °C (ponto de névoa); 115°C (ponto de fulgor); 0,374 mg KOH/g (índice de acidez) e -11°C (ponto de obstrução de filtro a frio).	MIAO; WU, 2006

Tabela 3.11. (continuação) Processos de obtenção de biodiesel empregando microalgas e cianobactérias como fonte de lipídeo

Microalga	Reação	Catalisador	Observação	Referência
<i>Chlorella protothecoides</i>	Transesterificação	Lipase imobilizada	O cultivo da alga <i>Chlorella protothecoides</i> foi efetuado em 3 escalas. O índice de lipídeo alcançou 46,1%, 48,7%, e 44,3% de massa seca das algas nas amostras cultivadas em biorreatores de 5L, 750L e 11000L, respectivamente. A transesterificação do óleo microalgal foi catalisada pela lipase imobilizada de <i>Candida</i> sp. convertendo 98,15% do óleo em ésteres de monoalquila em 12 h. As taxas de produção do biodiesel foram 7,02 g L ⁻¹ , 6,12 g L ⁻¹ e 6,24 g L ⁻¹ em 5 L, 750 L e 11000 L, respectivamente. As propriedades do biodiesel foram comparáveis ao combustível diesel convencional e cumprem com o padrão dos Estados Unidos para o biodiesel (ASTM 6751).	LI; XU; WU, 2007
<i>Chlorella protothecoides</i>	Transesterificação	Catálise ácida	Neste estudo foi utilizado hidrolisado de tubérculos de alcachofra como fonte de carbono para o cultivo de <i>Chlorellaproteothecoides</i> . O conteúdo lipídico obtido foi de 44% em relação a biomassa seca. O biodiesel resultante apresentou em sua composição química 82% de ésteres metílicos de ácidos graxos insaturados, com predominância do oleato de metila e linoleato de metila. O valor de viscosidade foi de 5,2 cSt (a 40°C) e densidade de 0,864 kg/L.	CHENG et al., 2009
Culturas mistas de algas nativas	Transesterificação	Catálise ácida Catálise básica	O estudo foi realizado usando águas residuárias (efluentes industriais e esgoto municipal) para avaliar o cultivo da biomassa algal e produção de biodiesel. Quinze isolados foram obtidos e analisados quanto ao teor de lipídeos. Os isolados foram: espécies de algas verdes, tais como: <i>Chlorella</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>Scenedesmus</i> <i>Gloeocystis</i> e espécies de cianobactérias, como <i>Anabaena</i> <i>limnithrix</i> . O rendimento em biodiesel após a transesterificação alcalina foi 63,9%, devido às impurezas do óleo e formação de sabão. Portanto, a refinação do óleo para remover gomas, pigmentos e outras impurezas ainda permanece como um grande desafio, sendo essencial para obter um produto com as características desejáveis para uso como biocombustível.	CHINNASAMY et al., 2010

Tabela 3.11. (continuação) Processos de obtenção de biodiesel empregando microalgas e cianobactérias como fonte de lipídeo

Microalga	Reação	Catalisador	Observação	Referência
<i>Chlorella vulgaris</i>	Transesterificação	Catálise básica (NaOH)	Dentre seis linhagens testadas como fonte de matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel, a linhagem de <i>Chlorella vulgaris</i> foi a que apresentou os melhores resultados. A produtividade da biomassa foi da ordem de 20,1mg L ⁻¹ h ⁻¹ contendo 27,0% de fração lipídica, correspondendo uma produtividade de 5,3 mg lipídeos L ⁻¹ h ⁻¹ . As propriedades do biodiesel foram: 99,8% de conversão em ésteres metílicos; número de cetano de 56,7 e índice de iodo de 65,0 g I ₂ 100 g ⁻¹ ; 74,1% de grau de insaturação e ponto de obstrução de filtro a frio - 4,5°C.	FRANCISCO et al., 2010
<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Nannochloropsis oculata</i> Microalga selvagem de água doce Macroalga marinha	Transesterificação	Meio supercrítico	A síntese de biodiesel foi conduzida em regime contínuo, empregando micro esferas de dióxido de titânio poroso e metanol supercrítico no reator de leito fixo. Hexano foi utilizado como solvente para homogeneizar as matérias-primas. A solução era composta de 1-2 g de lipídeos de algas, metanol e hexano (1:3: 96 g/g/g, respectivamente). Os resultados obtidos em termos de conversão em ésteres foram: 85,5%, 84,4%, 82,3% e 11,4% para os lipídeos extraídos de: Macroalga marinha, Microalga selvagem de água doce, <i>Dunaliella tertiolecta</i> e <i>Nannochloropsis oculata</i> , respectivamente.	KROHN et al., 2011
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Transesterificação	Óxido de Estrôncio (SrO)	Duas técnicas diferentes foram avaliadas e comparadas para conduzir a síntese de biodiesel do óleo de <i>Nannochloropsis</i> sp. A primeira realizada em 2 etapas: extração do óleo e transesterificação. A segunda realizada em apenas 1 etapa: reação direta de transesterificação da biomassa bruta. Para ambos os casos foram comparados 2 sistemas operacionais: ultrassom e micro-ondas. A reação foi conduzida por 5 min, usando 1g de biomassa bruta ou óleo extraído, juntamente com uma mistura de metanol: clorofórmio (1:2 v/v) e 0,3g de catalisador (SrO). Os resultados obtidos indicaram que o maior rendimento de biodiesel foi obtido na reação conduzida em apenas uma etapa no reator de micro-ondas.	KOBERG et al., 2011

Tabela 3.11. (conclusão) Processos de obtenção de biodiesel empregando microalgas e cianobactérias como fonte de lipídeo

Microalga	Reação	Catalisador	Observação	Referência
<i>Chorella vulgaris</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Botryococcus braunii</i>	Transesterificação	Lipase imobilizada	As microalgas: <i>Botryococcus braunii</i> (duas linhagens, BB763 e BB764), <i>Chlorella vulgaris</i> (CV), e <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (CP) foram avaliadas como fonte de matérias-primas lipídicas para síntese de biodiesel. O teor mais elevado de lipídeo foi produzido por CV (40,7%). A síntese enzimática de biodiesel foi catalisada por duas lipases imobilizadas: <i>Penicillium expansum</i> lipase (PEL) e Novozym 435, em dois sistemas de solventes: líquido iônico ([BMIm] [PF6]) e terc-butanol. Nas condições otimizadas, rendimentos superiores foram obtidos nas reações com líquido iônico (90,7% e 86,2%) em relação ao obtido em terc-butanol (48,6% e 44,4%). As conversões catalisadas por PEL foram superiores em relação as obtidas pela Novozym 435.	LAI et al., 2012
<i>Oscillatoria annae</i> BDU6	Transesterificação	Lipase imobilizada Metóxido de sódio	A biomassa oriunda da cianobactéria <i>Oscillatoria annae</i> BDU6 contendo 50,9% de lipídeos foi testada na síntese de biodiesel. A conversão dos triglicerídeos forneceu melhor resultado quando catalisada pela via química (86%) em comparação com a catálise enzimática (76,5%). Um delineamento experimental foi proposto para otimizar o meio de cultivo da cianobactéria, indicando que um aumento de três vezes no rendimento de biomassa pode ser obtido quando o inóculo inicial é aumentado.	VIMALAR ASAN et al., 2011
<i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31	Transesterificação	Lipase imobilizada	A microalga <i>Chlorella vulgaris</i> ESP-31 forneceu um elevado teor de lipídeo (63,2%) ao final do cultivo em fotobiorreator com aeração de CO ₂ . O óleo foi convertido em biodiesel por metanólise enzimática utilizando <i>Burkholderia</i> sp. C20 imobilizada. A reação foi conduzida empregando óleo extraído (MI) e usando diretamente a biomassa microalgal (M-II). Os resultados mostraram que M-II alcançou maior conversão (97,3%) do que MI (72,1%). A lipase imobilizada apresentou tolerância ao metanol (quando se utilizou o M-II), podendo ser usada repetidamente por seis ciclos (288 h) sem perda significativa da atividade.	TRAN et al., 2012

Francisco e colaboradores (2010) estudaram seis diferentes linhagens produtoras de lipídeo, dentre as quais três cianobactérias, duas algas verdes e uma diatomácea. Foram avaliados parâmetros como: taxa de sequestro de CO₂, produtividade de biomassa, teor de lipídeo e perfil de ácidos graxos. Os resultados obtidos indicaram que linhagem de *Chlorella vulgaris* foi a que apresentou as características mais adequadas para ser usada como fonte de matéria-prima lipídica na síntese de biodiesel. Os lipídeos foram extraídos pela metodologia de Bligh and Dyer e empregados com sucesso na síntese de biodiesel. A reação de metanólise do óleo microalgal foi conduzida empregando hidróxido de sódio como catalisador. A análise qualitativa dos ésteres metílicos revelou a predominância dos ácidos graxos saturados (43,5%) e monoinsaturados (41,9%) e as propriedades obtidas do biocombustível estão de acordo com os padrões estabelecidos pela ANP 255 (Agência Nacional de Petróleo), ASTM 6751 (Norma Americana), EN 14214 (Norma Européia) e Norma Australiana.

Um estudo mais recente relatado por Krohn e colaboradores (2011), demonstrou a produção de biodiesel a partir dos lipídeos produzidos por algumas linhagens de algas como: *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, microalgas selvagens de água doce e macroalgas. Para tal finalidade foi utilizado um processo catalítico contínuo altamente eficiente. O processo catalítico heterogêneo (conhecido comercialmente como o processo McGyan®) baseia-se no uso de metanol supercrítico e micro esferas de dióxido de titânio poroso em um reator de leito fixo para catalisar a reação de transesterificação dos triglicerídeos em ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel). A conversão apresentou uma eficiência de 85%, confirmado pela análise de ressonância magnética nuclear (espectroscopia de 300 MHz, RMN ¹H). A composição lipídica das algas foi estudada por gravimetria e cromatografia gasosa. A análise mostrou que os lipídeos totais corresponderem a aproximadamente mais de 19% da massa seca de algas. Quando comparado ao sistema de produção tradicional para síntese de biodiesel, o McGyan® apresentou vantagens significativas, sendo que, o catalisador não se degrada com o tempo permitindo o uso por longo período e reciclagem do catalisador. Adicionalmente, o processo prevê a redução das etapas de purificação do produto, diminuindo significativamente o custo de produção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Linhagens de cianobactérias

Neste trabalho foram utilizadas 5 linhagens de cianobactérias mantidas na coleção de cultura do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP: 2 pertencentes à ordem Chroococcales: *Microcystis aeruginosa* NPCD-1 e *Chlorogloea* sp. CENA170; uma pertencente à ordem Synechococcales: *Synechococcus* sp. PCC7942; uma pertencente à ordem Pseudanabaenales: *Leptolyngbya* sp. CENA104; e uma representante da ordem Nostocales: *Trichormus* sp CENA77 (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Linhagens de cianobactérias selecionadas para desenvolvimento deste trabalho

Ordem	Linhagem	Natural habitat	Origem
Chroococcales	<i>Microcystis aeruginosa</i> NPCD-1	Estação de Tratamento de Esgoto da Cidade de Deus, RJ	Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, RJ.
	<i>Chlorogloea</i> sp CENA170	Solo de manguezal da Ilha do Cardoso, SP	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
Synechococcales	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	Água fresca, Califórnia, EUA	Instituto Pasteur, Paris, França
Pseudanabaenales	<i>Leptolyngbya</i> sp CENA104	Estação de Tratamento de Esgoto de Cajati, SP	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
Nostocales	<i>Trichormus</i> sp CENA77	Campo de arroz inundado, SC	Centro de Energia Nuclear na Agricultura

4.1.2. Catalisadores

As reações de síntese de biodiesel foram efetuadas empregando catalisador bioquímico: preparação comercial de lipase de *Candida antarctica* na forma imobilizada em suporte acrílico (Novozym 435®) manufaturada pela Novozymes e adquirida da Sigma –Aldrich e catalisador químico: óxido de nióbio impregnado com solução de NaOH – Nb₂O₅/Na, preparado de acordo com metodologia descrita por Carvalho, 2011.

4.1.3. Matérias-primas

Como matérias-primas lipídicas na síntese de biodiesel foram utilizadas: material lipídico extraído das biomassas de cianobactérias e óleo de palma refinado gentilmente fornecido pela Agropalma (Belém, Pará, Brasil). O óleo de palma foi previamente caracterizado apresentando as seguintes propriedades: índice de acidez: 0,33 mgKOH/g;

índice de peróxido: 2,05 meq/kg; índice de iodo: 98 I₂/g; índice de saponificação: 198 mgKOH/g e composição em ácidos graxos: 0,10% de ácido láurico, 1,20% de ácido mirístico, 46,80% de ácido palmítico, 3,8% de ácido esteárico, 37,80% de ácido oléico e 10,50% de ácido linoléico. Como agente acilante utilizou-se etanol anidro (99%, Cromoline).

4.1.4. Outros reagentes

Outros reagentes utilizados foram: solvente terc-butanol (Cromoline), iso-octano (Cromoline), clorofórmio (Cromoline), metanol anidro (Vetec), hexano (Cromoline). Todos os padrões cromatográficos foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados de acordo com metodologia previamente descrita por Urioste et al., 2008.

4.2. Equipamentos

4.2.1. Câmara de cultivo

Os cultivos foram efetuados em câmara de incubação confeccionada de forma artesanal e constituída por duas placas de alumínio de 55 cm de altura e 120 cm de largura contendo cada uma 6 lâmpadas fluorescentes (luz branca) (Empalux FT840W 6400K). As lâmpadas foram dispostas horizontalmente numa distância de 8 cm umas das outras (paralelamente dispostas). Cada lâmpada possuía interruptores individuais que permitiam regular a intensidade luminosa para cada experimento. Estas duas placas foram colocadas em frente umas às outras e os frascos contendo os cultivos colocados ao centro (entre as duas placas). Dessa forma os frascos contendo as culturas recebiam luz de ambos os lados (Figura 4.1).

Figura 4.1. Câmara de incubação

Figura 4.2. Frascos conectados por tubos de látex a membranas filtrantes: recebendo aeração

Os interruptores individuais permitiam o acendimento de cada lâmpada separadamente, de forma a regular a desejada intensidade luminosa para cada experimento. As 12 lâmpadas acesas emitem uma intensidade luminosa de até $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Disposição das lâmpadas e intensidade luminosa emitida na câmara de cultivo.

Lâmpadas de cada lado	Total de lâmpadas	$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
1	2	17
2	4	50
3	6	80
4	8	100
5	10	120
6	12	150

Para promover a aeração dos frascos foram utilizados compressores de ar, potência 5W, capacidade 2,5 L/min (Super II, Master) conectados por tubos de latex (AURIFLEX) a membranas filtrantes MILLEX-GP em polietersulfona assimétrica, $0,22 \mu\text{m}$ de poro, estéril, 33mm de diâmetro (MILLIPORE) utilizadas para esterilizar o ar injetado no meio de cultivo (Figura 4.2).

4.2.2. Outros Equipamentos

Outros equipamentos utilizados foram: cromatógrafo fase gasosa Varian (Modelo 3800), viscosímetro (Modelo Brookfield LV-DV-II), reator de micro-ondas (Modelo Discover/University-Wave, Cem Corporation), processador ultrasônico (Modelo UP2005 Hielscher), lavadora ultrassônica (Modelo USC 1800A UltraSonic Cleaner, Unique), rota evaporador (Modelo 801, Fisatom), centrífuga (Modelo 206 BL, Excelsa II, Fanem), agitador mecânico (Modelo RW20-digital, IKA), centrífuga de bancada refrigerada com capacidade de 2L (Modelo SP-701, SPLABOR), liofilizador (Modelo LT1000, Terroni), forno mufla (Modelo SP-1200, SPLABOR).

4.3. Procedimento experimental

4.3.1. Cultivo das cianobactérias

Nos testes de identificação de cianobactérias produtoras de lipídeos, as linhagens selecionadas do banco de cultura do CENA/USP foram cultivadas em frascos com capacidade de 9 L contendo 8 L de meio de cultura apropriado: ASM-1 para *M. aeruginosa* NPCD-1, BG-11 para *Synechococcus* sp. PCC7942, *Leptolyngbya* sp. CENA104 e *Trichormus* sp. CENA77 e SWBG-11 para *Chlorogloea* sp. CENA170, utilizando 10 v/v %

de inóculo. A composição desses meios de cultivo está descrita no Apêndice A. O cultivo foi mantido sob aeração constante, intensidade luminosa equivalente a $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura controlada de 25°C . A etapa de cultivo teve duração de 20 dias. As células foram recuperadas por centrifugação da cultura (6.000 g por 5 min) e, em seguida liofilizadas (Liofilizador LT1000, Terroni).

4.3.2. Extração de lipídeos

Para estabelecer o método mais adequado para extração dos lipídeos da biomassa microbiana foram testadas quatro metodologias. Os testes foram feitos com a linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1, cultivada sob aeração em frasco de 9L contendo 8L de meio ASM-1, durante 20 dias, sob iluminação de $32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após o período de crescimento, o sobrenadante foi separado das células por centrifugação a 6.000 g por 15 min , em seguida, as células foram congeladas e liofilizadas. Os lipídeos foram extraídos de $0,5\text{g}$ de células liofilizadas utilizando-se o método de “Bligh and Dyer” modificado, método de Folch (empregando banho de ultrassom ou ultrassom de sonda) e método de extração em reator de micro-ondas (Figuras 4.3 a 4.6).

Figura 4.3. Bligh and Dyer.

Figura 4.4. Folch empregando banho de ultrassom.

Figura 4.5. Extração por micro-ondas.

Figura 4.6. Folch empregando ultrassom de sonda.

Após o período de incubação, a biomassa foi filtrada e o extrato lipídico obtido foi seco em rota-evaporador para remoção do solvente e em seguida transferido para estufa (60°C) até obtenção de massa constante. A quantificação da massa total dos lipídeos foi determinada pelo percentual de lipídeos em $\text{g}/100\text{g}$ de biomassa, conforme descrito na Equação 4.1.

$$\% \text{ Lipídeos} = \frac{\text{Massa final lipídeos}}{\text{Massa da biomassa seca}} * 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

4.3.2.1. Método de “Bligh and Dyer” modificado

Os lipídeos foram extraídos das células previamente liofilizadas utilizando-se a metodologia modificada de Bligh and Dyer (1959). Inicialmente foi adicionado solvente à biomassa na seguinte ordem: clorofórmio, metanol, água 1:2:0,8 (v/v/v). As amostras foram agitadas por alguns minutos até completa homogeneização dos solventes. Na sequência, manteve-se em agitação branda por 18 h (Figura 4.3). A separação das fases foi realizada em funil de separação adicionando-se clorofórmio e água para obtenção de separação da fase apolar (lipídica) e polar.

4.3.2.2. Método de Folch empregando banho de ultrassom

Os lipídeos foram extraídos das células previamente liofilizadas adicionando-se uma mistura de clorofórmio-metanol (2:1) em relação a massa seca de células, juntamente com um terço do volume de clorofórmio. Um banho de ultrassom (Unique, Brasil), com capacidade de 3L, operando na frequência de 20kHz com potência de 120W foi utilizado para completa homogeneização da biomassa no solvente e rompimento das células (Figura 4.4). Na sequência, a amostra foi centrifugada por 5 minutos de modo a separar o conteúdo celular da parte extraída. O sobrenadante recolhido foi misturado a uma solução de KCl 0,88% (1/4 em relação ao volume da amostra). A fase inferior foi transferida a um funil de separação, adicionando-se uma mistura de metanol-água (2:1).

4.3.2.3. Método de extração por micro-ondas

Os lipídeos foram extraídos das células previamente liofilizadas utilizando-se um reator de micro-ondas comercial (modelo Discover/University-Wave, Cem Corporation), constituído por uma câmara cilíndrica interna com 75 mm de diâmetro e 100 mm de altura (Figura 4.5), baseando-se na metodologia descrita por Cravotto et al. (2008).

As células liofilizadas foram transferidas para um balão de fundo redondo com capacidade de 25 mL, no qual foi adicionado hexano como solvente extrator (o dobro da quantidade de solvente em relação à biomassa). O balão foi inserido na cavidade interna do reator, permanecendo durante 1h, sob uma irradiação de micro-ondas de 100W com o intuito de manter a temperatura constante em 60°C. Um condensador de refluxo foi acoplado ao sistema para evitar evaporação do solvente.

4.3.2.4. Método de Folch empregando ultrassom de sonda

Os lipídeos foram extraídos das células previamente liofilizadas empregando-se a metodologia de Folch e colaboradores (1957), com algumas modificações. As extrações foram realizadas em Ultrassom (Modelo-UP200S/UP400S, Hielscher-Ultrasound Technology) com processadores ultra-sônicos que emitem potência entre 200 W e 400 W (Figura 4.6). O procedimento teve início adicionando-se uma mistura de clorofórmio–metanol (2:1) em relação à massa seca das células, juntamente com um terço do volume de clorofórmio para completa homogeneização da biomassa no solvente. Na sequência, a amostra foi centrifugada por alguns minutos de modo a separar o conteúdo celular da parte extraída. O sobrenadante recolhido foi misturado a uma solução de KCl 0,88% (1/4 em relação ao volume da amostra). A fase inferior foi transferida a um funil de separação, adicionando-se uma mistura de metanol-água (2:1). Após a separação das fases, o extrato lipídico obtido foi seco em rota-evaporador para remoção do solvente e em seguida transferido para estufa (60°C) até obtenção de massa constante.

4.3.3. Otimização do meio de cultivo da cianobactéria *M. aeruginosa* NPCD-1 empregando a metodologia de planejamento fatorial

Visando determinar as condições adequadas de cultivo da cianobactéria *M. aeruginosa* NPCD-1 foi proposto um planejamento fatorial completo 2^2 , definindo como variáveis independentes a concentração de nitrogênio (X_1) e fósforo no meio de cultivo ASM-1 (X_2). Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 2 L contendo 600 mL de meio de cultivo ASM-1 com diferentes proporções de nitrogênio e fósforo (Tabela 4.3), inoculando-se 10% de inóculo, correspondendo a 9,15 mg de biomassa seca de acordo com leitura de absorbância no comprimento de onda 750 nm (espectrofotômetro Lambda Bio-Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os frascos foram incubados na câmara com temperatura controlada a 24°C e intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O pH inicial do meio de cultura era de 6,5. Os frascos contendo a cultura receberam aeração constante de 2,5L/min.

Tabela 4.3. Níveis reais e codificados para as variáveis: nitrogênio e fósforo avaliados segundo planejamento fatorial 2^2 .

Variável		Nível		
Reais	Codificadas	-1	0	1
Nitrogênio: NaNO_3 (mg/L)	X_1	85	170	255
Fósforo: $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mg/L)	X_2	22	44	66

A etapa de cultivo teve duração máxima de 13 dias. As células foram recuperadas por centrifugação da cultura (6.000 g por 5 min) e, em seguida liofilizadas. Nas amostras obtidas foram determinados a concentração de biomassa seca e teor de lipídeos. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa STATISTICA (versão 8.0), considerando como variável resposta a produtividade celular obtida ao final da etapa de cultivo. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativas de efeitos, erros-padrão (teste t de Student's), e ainda em tabelas de análise de variância com colunas de causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma de quadrática dos fatores (SQF), soma média quadrática (SMQF), teste F e nível de significância (*p*).

4.3.4. Avaliação do crescimento das cianobactérias *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 cultivadas em meios com distintas concentrações de carbonato de sódio

Visando determinar uma faixa de concentração adequada de carbonato de sódio (fonte de carbono utilizada no cultivo das cianobactérias), um experimento foi realizado variando as concentrações de Na₂CO₃ no meio de cultivo entre 0,02 a 14 g/L para cada linhagem estudada.

Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer com capacidade total de 1L contendo 600 mL de meio de cultura: BG-11 para *Synechococcus* sp. PCC 7942 e *Trichormus* sp. CENA77 e meio de cultivo ASM-1 para *M. aeruginosa* NPCD-1. Durante o preparo dos meios, adicionou-se carbonato de sódio (Fluka) para obter-se as seguintes concentrações finais (g/L): 0,02; 0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0 e 14,0. Após a adição do carbonato de sódio, adicionou-se 0,12 g de HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) (Sigma-Adrich) para ajustar o pH do meio em 7,4. Os meios foram autoclavados. Em cada frasco inoculou-se 60 mL de cultura (10% v/v). Todos os frascos foram mantidos sob condições constantes de aeração e iluminação (40 μmol m⁻² s⁻¹) durante 20 dias.

4.3.5. Otimização da intensidade luminosa e fonte de carbono inorgânico no cultivo das cianobactérias *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 empregando a metodologia de planejamento fatorial

Visando determinar as condições adequadas de intensidade luminosa e concentração de Na₂CO₃ no cultivo das cianobactérias *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 foi proposto um planejamento fatorial completo 2², definindo como variáveis independentes a intensidade de luz emitida

durante a etapa de cultivo (X_1) e concentração de carbonato de sódio (Na_2CO_3 - g/L) presente nos meios de cultivo de cada linhagem (X_2), conforme faixa selecionada no item 4.8. Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyers de 2 L contendo 600 mL de meio de cultivo com diferentes concentrações de Na_2CO_3 e intensidade de luz (Tabela 4.4). A concentração de inóculo inicial foi 10% v/v. Os frascos contendo a cultura receberam aeração constante de 2,5L/min.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se os programas: STATISTICA (versão 8.0) e DESIGN-EXPERT (versão 6.0), considerando como variáveis respostas a produtividade celular e teor de lipídeo obtido ao final da etapa de cultivo. Os resultados foram expressos em gráficos de pareto e em tabelas de análise de variância com colunas de causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma de quadrática dos fatores (SQF), soma média quadrática (SMQF), teste F e nível de significância (p).

Tabela 4.4. Níveis reais e codificados para as variáveis: intensidade luminosa e fonte de carbono inorgânico (Na_2CO_3) no cultivo das cianobactérias *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 avaliados segundo planejamento fatorial 2^2 .

Variável		Nível		
		-1	0	+1
Intensidade de luz ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	X_1	50	100	150
Concentração de Na_2CO_3 (g/L)	X_2	0,5	1	1,5

4.3.6. Síntese de Biodiesel

4.3.6.1. Síntese de biodiesel por catálise bioquímica

As reações de síntese de biodiesel a partir dos óleos extraídos das biomassas de cianobactérias foram realizadas em balão de fundo redondo (25 mL), utilizando-se agitação magnética, sob temperatura de 50°C e razão molar (1:12 óleo de biomassa/etanol). As reações foram incubadas com a preparação comercial da lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435), numa proporção fixa de 10% (m/m) em relação à massa total de reagentes. Terc-butanol e iso-octano foram avaliados como solventes das reações, numa proporção de 1:1 em relação ao meio reacional. As reações foram conduzidas por um período máximo de 96 h e monitoradas pela retirada de alíquotas do meio para dosagem dos ésteres etílicos formados (URIESTE et al., 2008). Com a finalidade de ter um parâmetro comparativo da reação, foi conduzida a reação de síntese de biodiesel do óleo de palma e etanol nas mesmas condições reacionais (reação controle), tendo em vista que o

óleo de palma é o que mais se assemelha ao perfil de ácidos graxos encontrado nos óleos microbianos testados neste trabalho (Figuras 4.7 e 4.8).

Figura 4.7. Esquema reacional das reações de síntese de biodiesel.

Figura 4.8. Reator de vidro utilizado para síntese de biodiesel.

4.3.6.2. Síntese de biodiesel por catálise química

As reações de síntese de biodiesel por catálise química foram conduzidas em reator esférico (125 mL) dotado de agitação mecânica. O catalisador da reação $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{Na}$ foi previamente ativado em mufla a 200°C por 24 h. Os experimentos foram efetuados na temperatura de $78,5^\circ\text{C}$, razão mássica de 4 g de material lipídico para 15 g de etanol, 10% de catalisador em relação à massa de material lipídico utilizado e rotação do motor fixada em 600 rpm (CARVALHO, 2011). O sistema foi mantido por um período máximo de 10 h. A montagem experimental utilizada pode ser visualizada na Figura 4.9.

Figura 4.9. Esquema reacional das reações de síntese de biodiesel por via química.

4.3.6.3. Recuperação e purificação do biodiesel obtido por catálise química

Ao término das reações, o meio reacional foi submetido a um resfriamento natural de aproximadamente uma hora. A separação do catalisador do meio foi efetuada por filtração a vácuo, seguida de lavagem com solvente (tert-butanol). O catalisador foi levado à secagem em estufa a 100°C por 24 h. O volume do filtrado recolhido foi medido e em seguida adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação, efetuando-se uma agitação e deixando a mistura em repouso por 30 min para a separação das fases. A fase inferior composta por glicerol e água de lavagem foi descartada e a fase superior composta pelos ésteres de etila (biodiesel) foi submetida à centrifugação (1570 g por 15 min) e em seguida a evaporação em rota-evaporador para a retirada de etanol e água remanescentes. Posteriormente, foram adicionadas pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro para finalizar a etapa de secagem. A amostra de biodiesel purificada foi submetida à análise dos parâmetros de interesse do trabalho.

4.4. Metodologia Analítica

4.4.1. Caracterização das propriedades das matérias-primas lipídicas e biodiesel

4.4.1.1. Análise do perfil de ácidos graxos

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia de fase gasosa, segundo metodologia da AOCS (2004), empregando cromatógrafo de fase gasosa (CGC Agilent 6850 Series GC System), equipado com coluna capilar do tipo DB-23 Agilent (50% cianopropil – metilpolisiloxano, dimensões 60 m, Ø int: 0,25 mm, 0,25 µm filme), operando com rampa de aquecimento de 110°C (5 min), 110 – 215°C (5°C/min) e 215°C – 24 min e hélio como gás de arraste. Os padrões de ácidos graxos utilizados foram os ácidos capróico (C6:0); caprílico (C8:0); cáprico (C10:0); láurico (C12:0); mirístico (C14:0); miristoléico (C14:1); pentadecanóico (C15:0); palmítico (C16:0); palmitoléico (C16:1); margárico (C17:0); cis-10-heptadecenoíco (C17:1); esteárico (C18:0); oleico (C18:1); linoleico (C18:2); α – linolênico (C18:3 n-3); araquídico (C20:0); eicosenóico (C20:1); beênico (C22:0); erúcico (C22:1); lignocérico (C24:0) e nervônico (C24:1).

4.4.1.2. Estudo reológico

Os valores de viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 52. As medidas foram feitas em duplicata a 50°C,

empregando 1mL de amostra. Os dados obtidos (viscosidade, taxa de deformação e tensão de cisalhamento) foram ajustados de acordo com a lei de potência (Equação 4.2), conforme descrito por Freitas et al. (1998), para verificação de possíveis desvios do comportamento Newtoniano.

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad \text{Equação 4.2}$$

Em que: τ é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de deformação aplicada, n é o valor do coeficiente angular e K é o índice de consistência.

4.4.1.3. *Análise termogravimétrica (TGA)*

As análises de TGA das amostras de óleo e biodiesel das cianobactérias foram realizadas empregando balança termogravimétrica (Shimadzu TGA 50), adotando as seguintes condições de análise: fluxo de 50 mL/ min de nitrogênio, taxa de aquecimento de 10°C/ min na faixa de aquecimento de 25 a 1000°C.

4.4.1.4. *Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)*

As amostras de óleo e biodiesel das cianobactérias: *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 foram submetidas à análise de espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm⁻¹. O Espectrômetro utilizado foi modelo Spectrum GX, Perkin Elmer. 4.7.

4.4.2. *Quantificação dos ésteres de etila*

4.4.2.1. *Ésteres obtidos por via química*

A conversão dos triglicerídeos em ésteres obtidos por via química foi determinada tomando por base os dados gerados por RMN utilizando metodologia descrita por Carvalho (2011). As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado e os espectros de RMN registrados em espectrômetro Varian, modelo Mercury-300 MHz.

A metodologia utilizada para determinação das conversões dos ésteres etílicos consiste basicamente na identificação das moléculas presentes, na região do 4,05-4,35 ppm, durante uma reação de transesterificação por RMN ¹H e certificação realizada por RMN-¹³C. A Figura 4.10 ilustra estas identificações e atribuições de sinais.

Figura 4.10. Região entre 4,35 a 4,05 ppm dos espectros simulados de RMN ^1H dos TAG, DAG, MAG e ésteres etílicos.

Conforme pode ser observado na Figura 4.10, no quarteto gerado pelos prótons do CH_2 etoxílico o desdobramento em menor deslocamento químico (4,08) é o único pico de ressonância que não apresenta sobreposição com nenhum outro sinal dos mono-, di- ou triglicerídeos. Por meio do fenômeno denominado desdobramento *spin-spin*, os picos de ressonância sofrem desdobramentos, que podem ser explicados empiricamente pela *regra do $n+1$* . Segundo esta regra, cada tipo de próton identifica o número de prótons equivalentes (n) do átomo de carbono vizinho ao átomo de carbono ao qual um dado próton está ligado. Assim, o pico de ressonância se desdobra em ($n+1$) componentes. Esses desdobramentos obedecem ao triângulo de Pascal, conforme indicado na Figura 4.11.

O pico de ressonância dos átomos de hidrogênio metilênicos dos ésteres etílicos é desdobrado em um quarteto, cuja área total é a somatória dos componentes externos do quarteto, que possuem uma área igual a $1/8$ da área total, mais os componentes internos, que têm áreas iguais a $3/8$ da área total do quarteto, conforme ilustra a Figura 4.12.

Figura 4.11. Desdobramento dos picos de ressonância segundo a regra do $n+1$.

Em que:

Ac_1 = área do componente 1;
 Ac_2 = área do componente 2;
 Ac_3 = área do componente 3;
 Ac_4 = área do componente 4

Figura 4.12. Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio metilênicos do grupo etoxílico dos ésteres etílicos.

Desta forma, a metodologia de cálculo pode ser expressa pela Equação 4.3.

$$\%EE = [(Ac_4 \times 8) / (Add + ee)] \times 100 \quad \text{Equação 4.3}$$

Em que: Ac_4 = área do componente 4; $Add + ee$ = área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05 ppm; % EE = percentual de conversão em ésteres etílicos.

4.4.2.2. Ésteres obtidos por via enzimática

Para quantificar os ésteres de etila formados na reação de transesterificação enzimática empregou-se cromatografia de fase gasosa (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de chama ionizante e coluna empacotada de aço inoxidável do tipo 5% DEGS CHR-WHP 80/100 mesh 6ft 2.0mm ID e 1/8''OD (Restek, Frankel Commerce of Analytic Instruments Ltda, SP, Brasil). Nitrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo de 25mL/min. A coluna foi

submetida a uma rampa de temperatura de 90°C (3 min), 120°C (10 min) e 170°C (15 min), numa taxa de aquecimento de 25°C/min. A coleta de dados foi realizada utilizando o software Galaxie Chromatography Data System version 1.9. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL contendo hexanol como padrão interno (URIESTE et al., 2008).

O rendimento das reações de síntese de biodiesel por via enzimática foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (Mt) em relação à massa total teórica esperada de ésteres de etila (Σme). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial da matéria-prima lipídica (M_0), da massa molecular correspondente a cada ácido (M_{ma}) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela equação 4.4 (a), em que M_0 corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (Ca), com a massa inicial de óleo utilizada (M_i) equação 4.4 (b). O rendimento foi calculado dividindo a massa total de ésteres determinada pela análise de cromatografia gasosa (Mt) pela massa total teórica de ésteres de etila (Me), conforme mostrado na equação 4.4 (c).

$$(a) Me = \frac{(Mo.MMe)}{MMa} \quad (b) Mo = Ca.Mi \quad (c) R = \frac{Mt}{\sum Me} \times 100 \quad \text{Equação 4.4}$$

4.4.3. Determinação das propriedades do biodiesel

Os índices de cetano (IC), saponificação (IS) e iodo (II) foram determinados por meio de equações empíricas (RAMOS et al., 2009), tomando por base as equações propostas por Krisnangkura (1986). O número de cetano do biodiesel foi estimado pela Equação 4.5, em que os índices de saponificação e iodo foram determinados pelas Equações 4.6 e 4.7, respectivamente.

$$IC = 46,3 + \frac{5458}{IS} - 0,225 \cdot II \quad \text{Equação 4.5}$$

$$IS = \Sigma \frac{(560 \cdot N)}{M} \quad \text{Equação 4.6}$$

$$II = \Sigma \frac{(254 \cdot D \cdot N)}{M} \quad \text{Equação 4.7}$$

Em que, para cada ácido graxo: N = porcentagem mássica; M = massa molar; D = número de duplas ligações.

O parâmetro grau de insaturação foi calculado a partir da equação empírica (Equação 4.8), na qual se considera a soma da quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados contidos nos componentes do biodiesel (RAMOS et al., 2009).

$$GI = (\% \text{ monoinsaturados}) + 2 \cdot (\% \text{ poli-insaturados}) \quad \text{Equação 4.8}$$

Em que: GI = grau de insaturação do biodiesel (%).

O fator do comprimento da cadeia (FCC) foi calculado a partir da Equação 4.9, utilizando a composição dos ácidos graxos saturados de cadeia longa que constituem o biodiesel. Este parâmetro está correlacionado com o ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF) descrito pela Equação 4.10 (RAMOS et al., 2009).

$$FCC = (0,1 \cdot C16) + (0,5 \cdot C18) + (1 \cdot C20) + (1,5 \cdot C22) + (2 \cdot C24) \quad \text{Equação 4.9}$$

$$PEFF = 3,1417 \cdot FCC - 16,477 \quad \text{Equação 4.10}$$

Em que: FCC = fator do comprimento da cadeia; PEFF = ponto de entupimento de filtro a frio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e analisados os resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho. Os experimentos foram realizados de acordo com o esquema da Figura 5.1. As linhagens de cianobactérias previamente selecionadas e testadas como fonte de matéria-prima lipídica na síntese de biodiesel são apresentadas na Tabela 5.1.

Figura 5.1. Esquema das etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho experimental.

Tabela 5.1. Descrição das linhagens previamente selecionadas a serem testadas como fonte de matéria-prima na síntese de biodiesel.

Ordem	Linhagem	Classe	Família	Micrografia Barra de escala: 20 µm Foto: Diego B. Genuário	Descrição*
Chroococcales	<i>M. aeruginosa</i> <i>NPCD-1</i>	Cyanophyceae	Microcystaceae		Unicelular, forma colônias gelatinosas. Microscópicas, esféricas. Diversas linhagens são tóxicas. Mucilagem fina, incolor. Livre flutuação em placton de água doce, em reservatórios de água eutrofizada. Várias espécies podem ser bentônicas ou epifíticas.
Chroococcales	<i>Chlorogloea</i> <i>sp. CENA170</i>	Cyanophyceae	Entophysalidaceae		Colônias mucilaginosas, multicelular, mais ou menos esféricas, hemisféricas, achatado ou granular irregular. Algumas espécies são marinhas, mas as maiores são descritas de água doce.
Synechococcales	<i>Synechococcus</i> <i>sp. PCC7942</i>	Cyanophyceae	Synechococcaceae		Células solitárias ou agrupadas, não forma colônias mucilaginosas. Mucilagem ausente ou muito fina. Células longas ovais ou cilíndricas, às vezes mais comprida que larga, reta, arqueada ou sigmoide. Comprimento de 15 ou até mais de 20 µm e 0,4-6 µm de largura.

Tabela 5.1. (conclusão) Descrição das linhagens previamente selecionadas a serem testadas como fonte de matéria-prima na síntese de biodiesel.

Ordem	Linhagem	Classe	Família	Micrografia Barra de escala: 20 µm Foto: Diego B. Genuário	Descrição*
Pseudanabaenales	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA	Cyanophyceae	Pseudanabaenaceae		Filamentosa, filamento longo, solitário ou em espiral. Fina, 0,5-3,2 µm de largura. Tricomas finos, cilíndrico, geralmente não atenuado nas extremidades ou ligeiramente atenuado, com células arredondadas ou cônicas. Células mais compridas que larga, sem aerotopos. Heterocitos e acinetos são ausentes. Espécies muito comuns em solos e perifitons e metafitons de água doce e biotopos marinhos halófilos.
Nostocales	<i>Trichormus</i> sp. CENA77	Cyanophyceae	Nostocaceae		Filamentos solitários, camadas perifíticas, tricomas enrolados envolvidos por mucilagem incolor. Acinetos se desenvolvem a partir de células vegetativas entre dois heterocitos. A maioria das espécies vive em solo, poucas são perifíticas (espécies de arroz inundado que são fixadores de nitrogênio), poucas espécies são conhecidas do litoral marinho.

* KOMÁREK, 1992.

5.1. Avaliação das linhagens de cianobactérias selecionadas

5.1.1. Produtividade de biomassa e do teor de lipídeo obtido

Para avaliar a produtividade de biomassa celular obtida para cada linhagem de cianobactéria, bem como o teor de lipídeo e produtividade lipídica, os cultivos foram mantidos sob aeração constante, temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação constante de $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante um período de 20 a 30 dias de acordo com a curva de crescimento microbiano pré-estabelecida para cada linhagem estudada.

A Tabela 5.2 apresenta os valores obtidos em produtividade de biomassa celular (mg/L/dia), teor de lipídeo (%) e produtividade lipídica (mg/L/dia), para cada linhagem avaliada. Os resultados obtidos mostraram que a produtividade celular de biomassa variou entre 3,71 a 18,00 mg/L/dia. Dentre as espécies testadas, observou-se que a linhagem de *Trichormus* sp. CENA77 foi a que apresentou maior produtividade celular de biomassa (18,00 mg/L/dia), seguida pela linhagem de *Microcystis aeruginosa* NPCD-1, que apresentou uma produtividade de 17,12mg/L/dia. As demais linhagens apresentaram produtividades inferiores a 7,50 mg/L/dia, sendo a linhagem de *Leptolyngbya* sp CENA104 a que apresentou menor produtividade (3,71mg/L/dia).

Tabela 5.2. Produtividade de biomassa, teor de lipídeos e produtividade lipídica das linhagens de cianobactérias selecionadas.

Linhagem	Produtividade celular (mg/L/dia)	Teor de lipídeos (%)	Produtividade lipídica (mg/L/dia)
<i>Microcystis aeruginosa</i> NPCD-1	17,12	28,10	5,25
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	7,50	37,36	2,80
<i>Chlorogloea</i> sp CENA 170	6,80	13,50	0,92
<i>Trichormus</i> sp CENA77	18,00	23,54	4,24
<i>Leptolyngbya</i> sp CENA104	3,71	21,30	0,79

*Cultivo sob iluminação constante de $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

O teor de lipídeos obtido pelas linhagens estudadas variou entre 13,50 a 37,36% em relação à biomassa seca, correspondendo a produtividades lipídicas da ordem de 0,79 a 5,25 mg/L/dia. A linhagem de *Synechococcus* sp. PCC7942 foi a que apresentou maior teor lipídico (37,36%), enquanto que a menor fração lipídica foi obtida pela linhagem de *Chlorogloea* sp CENA 170, correspondente a 13,50% em relação à biomassa seca. No

entanto, as linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Trichormus* sp. CENA77 forneceram as produtividades lipídicas mais elevadas, respectivamente da ordem de 5,25 e 4,24 mg/L/dia. A linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 apresentou uma produtividade lipídica significativa (2,80 mg/L/dia) apesar da baixa produtividade celular. Por outro lado, as demais linhagens: *Leptolyngbya* sp. CENA104 e *Chlorogloea* sp. CENA170 revelaram produtividades lipídicas inferiores a 1,00 mg/L/dia, sendo portanto desfavoráveis para serem utilizadas como fonte de matéria-prima na síntese de biodiesel.

Os teores de lipídeos obtidos neste trabalho são similares aos descritos por Sharathchandra e Rajashekhar (2011), que reportaram valores de percentagem lipídica entre 10,48 a 28,15% para 13 espécies de cianobactérias isoladas de diferentes habitats aquáticos. Dentre as espécies estudadas, o maior teor de lipídeos ($28,15 \pm 0,21\%$) foi obtido pela linhagem de *M. aeruginosa* seguido por *Phormidium purpurascens* ($26,45 \pm 0,21\%$), enquanto que *Phormidium ambiguum* foi a que resultou em valor mais baixo ($10,48 \pm 0,10\%$). Estudos realizados por Francisco et al. (2010), mostraram que a produtividade celular de biomassa alcançada por *Aphanotece microscopic* Nägeli foi 753,6 mg/L/dia, no entanto, seu conteúdo lipídico foi inferior a 8,0%. *Scenedesmus obliquus* sp. resultou em uma produtividade de biomassa de 60 mg/L/dia e 12,7% de lipídeos (MANDAL; MALLICK, 2009). O cultivo de *Scenedesmus* sp. revelou uma produtividade celular de 220 mg/L.dia e 9,5% de lipídeos (RODOLFI et al., 2009) e *Spirulina maxima* LB 2342 revelou produtividade de 210 mg/L.dia e 4,1% de teor de lipídeos (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009). Segundo Griffiths e Harrison (2009), o teor de lipídeos de cianobactérias pode se situar na faixa entre 5 a 13%. Por outro lado, outros autores revelam que o teor de lipídeos acumulado pelas cianobactérias pode variar de 38,2 a 45%, dependendo da espécie e condições do meio de cultivo, tais como: nutrientes, intensidade luminosa e outros (KARATAY; DÖNMEZ, 2011). Desta forma, os resultados apresentados neste trabalho mostram-se favoráveis quando comparados aos obtidos para o cultivo de outras espécies e gêneros de cianobactérias relatadas na literatura.

De acordo com Karatay e Donmez (2011), a produção de ácidos graxos pela cianobactéria de *Synechococcus* sp. pode chegar a 42,8%, nas condições ótimas de cultivo. Enquanto que, a linhagem de *Microcystis* pode variar entre 12,5 % (MIAO; WU; YANG, 2004), 23,4 % (PIORRECK; POHL, 1984) e 28,15% (SHARATHCHANDRA;

RAJASHEKHAR, 2011). Desta forma, pode se observar que os valores mostrados na Tabela 5.2 estão dentro da faixa relatada na literatura para as linhagens em questão.

O material lipídico obtido foi submetido à análise cromatográfica para determinação da composição em ácidos graxos, visando selecionar as linhagens que apresentam além de uma favorável produtividade lipídica, um perfil de ácidos graxos que favoreça a síntese de biodiesel, permitindo que suas propriedades físico-químicas atendam os requisitos das normas vigentes.

5.1.2. Perfil dos ácidos graxos dos óleos de cianobactérias

O material lipídico resultante em cada cultivo foi caracterizado quanto ao perfil de ácidos graxos, apresentando a composição descrita na Tabela 5.3. De uma maneira geral foram identificados 21 ácidos graxos com tamanho de cadeia variando entre C8 a C22 com diferentes graus de insaturação. A porcentagem de ácidos graxos não identificados foi da ordem de 1%, com exceção da biomassa derivada do cultivo de *M. aeruginosa* NPCD-1 que apresentou em sua composição 4% de ácidos graxos não identificados. Para facilitar a análise da composição dos lipídeos nas biomassas, os ácidos graxos foram agrupados em saturados (S), monoinsaturados (MS) e poli-insaturados (PS).

A biomassa lipídica de *M. aeruginosa* NPCD-1 apresentou em sua composição química aproximadamente 50% de ácidos graxos saturados, dentre os quais se destacam em maior quantidade o ácido palmítico (24,34%) e ácido láurico (13,21%). Os demais 50% são constituídos por 46% de ácidos graxos insaturados, com destaque para o ácido oleico (26,88%) e linoleico (12,53%).

A biomassa lipídica de *Synechococcus* sp. PCC 7942 apresentou em sua composição química aproximadamente 30% de ácidos graxos saturados e 70% de ácidos graxos insaturados, dentre os quais se destacam em maior quantidade o ácido oleico (31,51%), linoleico (30,88%) e palmítico (23,50%).

A biomassa lipídica de *Chlorogloea* sp CENA 170 apresentou em sua composição química aproximadamente 33% de ácidos graxos saturados e 66% de ácidos graxos insaturados, dentre os quais se destacam em maior quantidade os ácidos graxos insaturados: linoleico (29,41%) e oleico (28,77 %) seguidos pelos ácidos graxos saturados: palmítico (15,37%) e láurico (8,73%).

A biomassa lipídica de *Trichormus* sp. CENA77 apresentou em sua composição química aproximadamente 44% de ácidos graxos saturados e 55% de ácidos graxos

insaturados, dentre os quais se destaca em quantidade bem significativa o ácido graxo oleico (36,88 %). Na sequência, seguidos pelos ácidos graxos: palmítico (24,92%), linoleico (10,67%), láurico (9,72%) e linolênico (5,15%).

A biomassa lipídica de *Leptolyngbya* sp. CENA104 apresentou em sua composição química aproximadamente 24% de ácidos graxos saturados e 74% de ácidos graxos insaturados, dentre os quais se destacam em maior quantidade os ácidos graxos insaturados: oleico (38,78%) e linoleico (26,38%), seguido pelo ácido graxo palmítico (14,55%). Quantidades menores foram encontradas para os ácidos graxos: linolênico (4,34%) e láurico (3,89%).

Segundo Gunstone e colaboradores (2007), as cianobactérias apresentam uma composição em ácidos graxos muito mais simples que as microalgas. A espécie de *Anacystis nidulans*, por exemplo, sintetiza somente ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Enquanto que, outras espécies sintetizam também os ácidos graxos poli-insaturados, tais como: linoleico (C18:2), linolênico (C18:3), e estearidônico (C18:4). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a classificação de Gunstone e colaboradores (2007), pois, pode-se observar que todas as linhagens produziram em maior quantidade o ácido graxo palmítico (C16-saturado), ácido graxo oleico (C18:1-monoinsaturado) e ácido graxo linoleico (C18:2-poli-insaturado), como pode ser melhor visualizado na Figura 5.2.

Figura 5.2. Composição em ácidos graxos (%) dos óleos de: *M. aeruginosa* NPCD-1; *Synechococcus* sp. PCC7942; *Chlorogloea* sp. CENA 170; *Trichormus* sp. CENA77; *Leptolyngbya* sp CENA104.

Tabela 5.3. Perfil de ácidos graxos (%) presente nas biomassas lipídicas produzidas pelo cultivo das linhagens de cianobactérias

Ácido graxo		<i>Microcystis aeruginosa</i> NPCD-1	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA170	<i>Trichormus</i> sp. CENA77	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA104
Saturado						
C6:0	capróico	0,08	0,06	0,05	0,08	0,09
C8:0	caprílico	0,63	0,06	0,42	0,63	0,16
C10:0	Cáprico	0,89	0,06	0,55	0,65	0,22
C12:0	Láurico	13,21	0,68	8,73	9,72	3,89
C14:0	mirístico	5,17	0,73	3,37	3,89	1,66
C15:0	pentadecanóico	0,12	0,06	0,06	0,06	0,08
C16:0	palmitico	24,34	23,50	15,37	24,92	14,55
C17:0	margárico	0,17	0,12	0,13	0,16	0,15
C18:0	esteárico	4,88	3,55	3,76	3,36	2,83
C20:0	araquídico	0,29	0,31	0,21	0,37	0,39
C22:0	behênico	0,24	0,26	0,15	0,15	0,28
C24:0	lignocérico	0,09	0,20	0,11	0,10	0,15
Total		50,11	29,59	32,91	44,09	24,45
Monoinsaturado						
C16:1	palmitoléico	1,11	3,34	5,42	1,48	3,90
C17:1	cis-10-heptadecenóico	0,07	0,12	0,11	0,10	0,17
C18:1	Oleico	26,88	31,51	28,77	36,88	38,78
C20:1	eicosenóico	0,36	0,17	0,11	0,34	0,42
C22:1	Erúcico	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:1	nervônico	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
Total		30,99	35,14	34,41	38,80	43,27
Poli-insaturado						
C18:2	linoléico	12,53	30,88	29,41	10,67	26,38
C18:3	t-linolênico	0,79	0,54	0,27	0,00	0,41
C18:3	linolênico	1,56	2,86	1,63	5,15	4,34
Total		14,88	34,28	31,31	15,82	31,13
N.I.	Não identificado	4,02	0,77	1,26	1,29	1,15

Verifica-se na Figura 5.2, que as linhagens de *M. aeruginosa* e *Trichormus* sp. apresentaram um perfil de ácidos graxos semelhante, com aproximadamente 50% de ácidos graxos saturados e 50% monoinsaturados. As demais linhagens apresentaram maiores quantidades de ácidos graxos insaturados (acima de 65%).

De acordo com os resultados relatados por Sharathchandra e Rajashekhar (2011), os ácidos graxos insaturados estão presentes em maiores quantidades nas biomassas lipídicas de cianobactérias (50 a 65%), embora ácidos graxos saturados também foram encontrados na maioria dos isolados, com teores de 20 a 40% dependendo da espécie. Dentre os quais, apresentaram-se em maiores quantidades: ácido palmítico (C16: 0) variando de 5 a 45%, ácido oleico (C18: 1) e ácido linoleico (C18: 2) que apresentaram uma percentagem de 5 a 50%. Ressaltando que, o percentual de cada ácido graxo variou de acordo com a espécie estudada (SHARATHCHANDRA; RAJASHEKHAR, 2011).

Com base nos resultados obtidos de: produtividade de biomassa, produtividade lipídica e análise do perfil de ácidos graxos, as linhagens que apresentaram os melhores resultados e potencial para serem usadas como fonte de matéria-prima na síntese de biodiesel foram: *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942. Essas linhagens foram anteriormente classificadas como não produtoras de toxinas (SILVA-STENICO et al., 2011), entretanto para as linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Trichormus* sp. CENA77 testes complementares foram efetuados, conforme descrito no Apêndice B.

5.2. Cultivo das linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 sob maior intensidade de luz

Após terem sido selecionadas por apresentar os melhores parâmetros como fonte de matéria-prima na síntese de biodiesel, as linhagens de *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 foram cultivadas em uma câmara de iluminação com intensidade de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, visando verificar a influência do aumento da intensidade luminosa em relação aos valores de produtividades celular e lipídica para cada linhagem. Os cultivos foram mantidos por apenas 15 dias, uma vez que a maior luminosidade permite um crescimento mais rápido das cianobactérias.

A Tabela 5.4 mostra os valores de produtividade celular e respectiva produtividade lipídica obtida ao final da etapa de cultivo para cada linhagem.

Conforme pode ser observado, o aumento da intensidade luminosa de 32 para 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ forneceu um incremento na produtividade celular e, conseqüentemente na produtividade lipídica para todas as linhagens. Os valores de produtividade celular variaram de 19,78 a 46,92 mg/L/dia. As linhagens de *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Synechococcus* sp. PCC7942 apresentaram um incremento de quase três vezes tanto no valor de produtividade celular quanto na produtividade lipídica em comparação ao cultivo realizado sob menor intensidade de luz (dados descritos no item 5.1.1). No entanto, a linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 forneceu o valor mais elevado (46,92 mg/L/dia). A linhagem de *Trichormus* sp. CENA77 revelou um incremento de quase duas vezes para ambos os valores de produtividade: celular e lipídica, da ordem de 30,83 e 7,26 mg/L/dia, respectivamente.

Tabela 5.4. Desempenho das linhagens de cianobactérias: *M. aeruginosa* NPCD-1, *Synechococcus* sp. e *Trichormus* sp CENA77 cultivadas sob maior intensidade luminosa

Linhagem	Produtividade celular (mg/L/dia)	Produtividade lipídica (mg/L/dia)
<i>M. aeruginosa</i> NPCD-1	46,92	13,18
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	19,78	7,39
<i>Trichormus</i> sp. CENA77	30,83	7,26

*Cultivo sob iluminação constante de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

É importante ressaltar que, as condições de cultivo para aumentar a biomassa obtida de cada linhagem podem ser diferentes para cada gênero. O crescimento de cianobactérias é influenciado pelo inóculo (idade), meio de cultura e condições de incubação (temperatura, irradiância, agitação). Sabe-se que o crescimento de cianobactérias filamentosas é mais lento que da maioria das unicelulares.

A luz é o elemento mais importante para a fotossíntese, sendo essencial para o crescimento autotrófico. As diferentes intensidades de luz utilizadas no crescimento de microalgas e cianobactérias refletem em mudanças notáveis em sua composição química, produtividade celular, pigmentos e atividade fotossintética. Além disso, diferentes intensidades de luz e comprimentos de onda podem alterar o metabolismo dos lípideos nos micro-organismos fotossintéticos e muitas vezes alterar o perfil lipídico. A composição de pigmentos produzidos durante a fotossíntese também é um fator muito influenciado pela intensidade da luz empregada durante o cultivo (SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012).

No cultivo da linhagem *Parietochloris incise*, realizado sob baixa irradiância luminosa, as culturas exibiram crescimento lento e uma produção baixa de pigmentos. Por outro lado, sob

irradiâncias mais altas, a linhagem mostrou uma maior taxa de crescimento e um aumento no teor de pigmentos (carotenóides). Além disso, a irradiação de luz é um fator essencial para a formação dos triacilgliceróis (TAG), lipídeos de interesse na produção de biodiesel. No entanto, a irradiação de luz associada com o fator de crescimento e produtividade celular é diferente para cada espécie, sendo que cada micro-organismo resulta em um tipo de resposta à exposição de diferentes intensidades de luz. Consequentemente, a luz é um fator imprescindível, estimulante e limitante para o crescimento dos micro-organismos fotossintéticos e que pode refletir em alterações morfológicas pelas células (SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012). Alguns autores relatam que o aumento a intensidade de luz aumenta a taxa de crescimento de células, independentemente da fonte de luz (TAHER et al., 2011).

5.3. Caracterização dos materiais lipídicos

5.3.1. Viscosidade dos materiais lipídicos obtidos das biomassas de: *M. aeruginosa* NPCD-1, *Synechococcus* sp. PCC7942 e *Trichormus* sp. CENA77

O estudo reológico de óleos e gorduras usados como fonte de matéria-prima na produção de biodiesel é um dos parâmetros mais relevantes para avaliar as características do biocombustível obtido em relação à matéria-prima precursora.

Um determinado fluido que possui a relação entre tensão e taxa de deformação igual a uma constante, independentemente do tempo e da deformação, é classificado como Newtoniano. Para líquidos viscosos essa constante de proporcionalidade é chamada de viscosidade Newtoniana. Contrariamente, fluidos que apresentam uma curva de fluxo não linear, ou seja, fluidos nos quais a viscosidade é dependente do tempo ou da deformação, são denominados de não-Newtonianos (BRETAS; D'ÁVILA, 2005; FERREIRA et al., 2005).

As análises de viscosidade dos materiais lipídicos oriundo das biomassas de: *M. aeruginosa* NPCD-1, *Synechococcus* sp. e *Trichormus* sp. CENA77 foram avaliadas em um viscosímetro cone-placa sob temperatura de 50°C. A Figura 5.3 mostra a variação da viscosidade em função da taxa de deformação para o comportamento da viscosidade absoluta das matérias-primas lipídicas avaliadas.

Conforme pode ser observado, o valor da viscosidade (cp) diminuiu com o aumento da taxa de deformação, caracterizando o comportamento dos óleos como líquido não newtoniano. A análise do comportamento da curva permitiu o ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação de acordo com a lei de potência.

Figura 5.3. Viscosidade absoluta em função da taxa de deformação dos materiais lipídicos das biomassas de *M. aeruginosa* NPCD-1 (a), *Trichormus* sp. CENA77 (b) e *Synechococcus* sp. PCC7942 (c).

Na Tabela 5.5 são apresentados os coeficientes de ajuste dos dados $\log \tau$ em função do $\log \gamma$. Para todas as matérias-primas lipídicas analisadas, o valor dos coeficientes angular foi menor que 1, o que caracteriza os fluidos como pseudoplástico, em que a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento (DANTAS et al., 2006).

Dentro da faixa de deformação aplicada (70 a 300 s^{-1}) o material lipídico da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1 apresentou viscosidade absoluta média de 52,7 cp medida à 50°C. O material lipídico da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77 apresentou viscosidade absoluta média de 59,1 cp dentro dessa mesma faixa aplicada. Para o material lipídico resultante da biomassa de *Synechococcus* sp. PCC7942 a viscosidade obtida foi 62,3 na faixa de deformação entre 70 a 150 s^{-1} . Ao comparar esses valores com os valores de viscosidade das matérias-primas lipídicas tradicionais, tais como: óleo de palma (31,12 cp) e sebo bovino (43,82 cp), pode-se observar que são mais elevados, apresentando um comportamento reológico diferente, uma vez que óleos vegetais e gorduras residuais geralmente apresentam comportamento de fluido Newtoniano (MOREIRA et al., 2007; DA RÓS et al., 2010).

Tabela 5.5. Valores de viscosidade e coeficiente de ajuste dos dados a lei de potência

Linhagem	Viscosidade (Cp)	N
<i>M. aeruginosa</i> NPCD-1	52,7	0,84
<i>Trichormus</i> sp. CENA77	59,1	0,97
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	62,3	0,37

T= 50 °C.

Considerando que reações de síntese de biodiesel a partir de matérias-primas lipídicas com viscosidade elevada, como o sebo bovino, por exemplo, resultam em ésteres de etila com valores de viscosidade que atendem as normas da ANP para uso como combustível (SILVA et al., 2012) pode-se prever que a elevada viscosidade da biomassa lipídica não seja um parâmetro restritivo para dimensionamento de reatores para obtenção de biodiesel. Entretanto, é uma limitação que deve ser considerada e que torna necessário o uso de solventes no meio reacional, principalmente pelo comportamento não newtoniano do fluido.

5.3.2. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) gera como resultado uma curva de decomposição térmica que informa as etapas de degradação das amostras em função da temperatura. Por meio da análise desses dados, é possível estabelecer parâmetros de estabilidade térmica dos óleos e gorduras *in-natura* e posteriormente poder compará-la a estabilidade do biodiesel. Além disso, a TGA vem sendo utilizada como uma ferramenta para estudar o comportamento de combustão da biomassa. A combustão pode ser descrita como uma volatilização inicial e combustão volátil seguida por uma queima vagarosa do carvão (ROSS et al., 2008). A Figura 5.4 mostra as curvas de decomposição térmica (TGA) dos materiais lipídicos das biomassas de *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942, que fornece os percentuais de perda de massa em função da temperatura.

Figura 5.4. Análise termogravimétrica (TGA) dos materiais lipídicos das biomassas de *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942.

De acordo com a Figura 5.4, verifica-se que ocorreu apenas uma etapa de perda de massa durante o aquecimento dos materiais lipídicos das biomassas de *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 em atmosfera inerte.

A etapa de perda de massa da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1 iniciou-se em 280°C e se estendeu até aproximadamente 500°C. Essa etapa está relacionada com a decomposição e ou volatilização do material lipídico presente na amostra (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres). Durante essa etapa, a temperatura de máxima perda de massa constatada pela derivada da curva DTG ocorreu a 497°C.

A etapa de perda de massa da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77 iniciou-se a aproximadamente 200°C e se estendeu até 400°C. Durante essa etapa, a temperatura de máxima perda de massa constatada pela derivada da curva DTG ocorreu a 380°C.

A etapa de perda de massa da biomassa de *Synechococcus* sp. PCC7942 teve início em 250°C, estendendo-se até 430°C aproximadamente. Durante essa etapa, a temperatura de máxima perda de massa ocorreu a 405°C.

Os resultados obtidos foram similares ao estudo realizado por Carvalho (2011), no qual diversas matérias-primas lipídicas tradicionais, tais como: óleos de andiroba, babaçu, pinhão manso e sebo bovino foram submetidas à análise de TGA para avaliar sua decomposição térmica. Os resultados obtidos indicaram uma similaridade entre os intervalos em que ocorre a perda de massa para os óleos de babaçu, andiroba e sebo bovino: 200 a 321°C, 321 a 442°C e 210 a 560°C, respectivamente. No entanto, para o óleo de andiroba a temperatura inicial de perda de massa foi bem menor, apresentando um intervalo de perda de massa entre 97 a 376°C (CARVALHO, 2011).

Marcilla e colaboradores (2009) avaliaram as etapas de decomposição térmica dos produtos voláteis da biomassa de *Nannochloropsis* sp. por meio da técnica de análise termogravimétrica. A etapa de volatilização ocorreu entre 290 a 460°C, que está relacionada com a decomposição de proteínas, carboidratos e lipídeos. A decomposição térmica dos resíduos sólidos ocorreu na temperatura de 740°C.

5.3.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) tem sido um método bem aplicado para estudar e caracterizar a natureza dos compostos químicos presentes na biomassa lipídica oriunda de microalgas e cianobactérias. Esta metodologia é baseada nas diferenças dos espectros

em $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, sendo muito empregada na identificação dos grupos funcionais e bandas correspondentes as vibrações dos estiramentos e flexões nas amostras das matérias-primas lipídicas.

A Figura 5.5 mostra os espectros dos materiais lipídicos extraídos das linhagens de: *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942.

Todas as matérias-primas lipídicas apresentaram espectro com bandas de vibração relacionadas à presença de grupamento alceno em 2809 e 2986 cm^{-1} , relacionada ao estiramento dos grupos CH. Os espectros apresentaram também duas bandas médias relacionadas à deformação axial do grupamento éster (C-O) em 1180 e 1200 cm^{-1} , bem como a presença de uma banda atribuída ao grupo $(\text{CH}_2)_n$, a qual pode ser observada em $723,3\text{ cm}^{-1}$. As vibrações de estiramento da ligação referente à carbonila (C=O) de ésteres, que ocorrem entre 1750 e 1730 cm^{-1} também foram observadas com picos bastante acentuados, confirmando a presença de triglicerídeos nas amostras lipídicas. De 1290 a 1040 cm^{-1} , bandas relacionadas à vibração da ligação C=C-C-O foram observadas (referente a duas vibrações assimétricas acopladas). Outra característica importante nos espectros foi à presença de bandas intensas na região na região $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, relacionado às características de deformação axial dos grupamentos OH.

Figura 5.5. Espectro na região do infravermelho das matérias-primas lipídicas das linhagens: *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942.

5.4. Otimização do meio de cultivo da cianobactéria *M. aeruginosa* NPCD-1 empregando a metodologia de planejamento fatorial

Visando otimizar as condições de cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 foi proposto um planejamento fatorial completo 2^2 , definindo como variáveis independentes a concentração de nitrogênio (X_1) e fósforo (X_2) no meio de cultivo ASM-1 e como variável dependente a produtividade celular (mg/L/dia) obtida ao final da etapa de cultivo. A matriz experimental juntamente com os resultados obtidos é mostrada na Tabela 5.6, para os diferentes tempos de cultivo: 8 e 13 dias. Conforme pode ser observado, a produtividade celular variou entre 29,16 a 79,16 mg/L/dia para o cultivo de 8 dias e 16,66 a 52,56 mg/L/dia para o cultivo de 13 dias, sugerindo que na intensidade luminosa utilizada ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) um período de cultivo 8 dias foi suficiente para atingir a concentração máxima de células. As concentrações de nitrogênio e fósforo no nível alto (ensaio 4) forneceram os valores mais elevados de concentração de biomassa. Os resultados obtidos mostraram uma tendência de redução desses valores quando a concentração desses nutrientes foi diminuída (ensaios 1, 2 e 3).

Tabela 5.6. Matriz experimental e resultados obtidos pelo planejamento fatorial 2^2 utilizado para otimizar as variáveis: nitrogênio e fósforo no meio de cultivo ASM-1.

Ensaio	Variável		Produtividade celular (mg/L/dia)	
	Nitrogênio	Fósforo	8 dias	13 dias
	X_1	X_2		
1	- 1	- 1	29,16	20,51
2	- 1	+1	33,33	16,66
3	+1	- 1	37,50	17,95
4	+1	+1	79,16	52,56
5	0	0	38,75	26,92
6	0	0	43,75	23,07
7	0	0	37,50	28,20

A análise estatística foi efetuada para os valores alcançados de produtividade celular nos cultivos efetuados por um período de 8 dias. A significância estatística dos coeficientes da equação foi determinada pelo teste t de Student, que fornece o parâmetro p -valor. Para considerar que uma variável independente tem um efeito significativo sobre uma variável resposta, o resultado do p -valor obtido deve ser menor do que o nível de significância pré-determinado para o teste (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Com o auxílio do programa STATISTICA 8.0, analisou-se os dados obtidos para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). A Tabela 5.7 reúne os dados da análise dos efeitos, estimativa de erro padrão e o teste t de Student's. Dentro da região analisada, verifica-se que a

produtividade celular (mg/L/dia) foi dependente de ambas as variáveis: nitrogênio (X_1) e fósforo (X_2), sendo estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Um efeito altamente significativo também foi constatado pela interação entre essas variáveis ($p = 0,0297$).

Tabela 5.7. Estimativas dos efeitos das variáveis, erros padrão, valores de t e p para a produtividade celular obtida em 8 dias de cultivo.

Variável	Efeito	Erro Padrão	p	t
Média	42,73	1,25	0,0008*	34,1885*
(x_1) Nitrogênio	27,08	3,31	0,0146*	8,1897*
(x_2) Fósforo	22,92	3,31	0,0202*	6,9288*
(X_1 , X_2) Interação	18,75	3,31	0,0297*	5,6679*

*significativo ao nível de 95% de confiança.

A partir desses dados, foi possível compor o modelo estatístico incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos, como apresentado na Equação 5.1, em que Y: representa a produtividade celular (mg/L/dia); X_1 é o valor codificado da variável nitrogênio e X_2 o valor codificado da variável fósforo. A análise de variância do modelo matemático obtido está disposta na Tabela 5.8.

$$Y = 42,73 + 13,54.X_1 + 11,45.X_2 + 9,37.X_1.X_2 \quad \text{Equação 5.1}$$

Tabela 5.8. Análise de variância (ANOVA) para os resultados de produtividade celular obtida em 8 dias de cultivo.

Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	
				Valores	Prob > F
Modelo	1610,07	3	536,69	49,07	0,0200
X_1	733,60	1	733,60	67,07	0,0146
X_2	525,10	1	525,10	48,01	0,0202
X_1X_2	351,38	1	351,38	32,13	0,0297
Curvatura	39,29	1	39,29	3,59	0,1985
Erro puro	21,87	2	10,94		
Cor Total	1671,24	6			
R^2	0,9866				

X_1 = Nitrogênio, X_2 = Fósforo, **F**: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

Os dados da análise de variância descritos na Tabela 5.8 mostram que o modelo matemático se ajustou bem aos dados experimentais, indicando significância estatística ao nível

de 95% de confiança, não sendo constatada falta de ajuste ($p=0,1985$). Desta forma, a equação obtida pode ser utilizada para estimar valores das variáveis independentes que mostrem resultados confiáveis para a variável resposta, obtendo-se a superfície de resposta apresentada na Figura 5.6.

Os valores preditos pelo modelo representado na superfície de resposta indicam que a produtividade celular foi maximizada nos níveis mais elevados para ambas as variáveis: Nitrogênio- NaNO_3 (255 mg/L) e Fósforo- $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (66 mg/L).

Para confirmar o modelo matemático obtido, um experimento adicional foi efetuado nas condições preditas pelo modelo (+N e +P), e os resultados obtidos em termos de produtividade celular e teor de lipídeos obtidos são apresentados na Tabela 5.9.

Figura 5.6. Superfície de resposta para a produtividade celular (mg/L/dia) para um tempo de cultivo de 8 dias mostrando o efeito das variáveis: nitrogênio e fósforo.

Tabela 5.9. Confirmação do modelo estatístico obtido (+N e +P): produtividade celular e teor de lipídeos obtidos ao final de 8 dias de cultivo.

Ensaio	Produtividade celular (mg/L.d)	Teor de lipídeos (%)
1	100,00	13,77
2	62,50	13,38
3	83,25	16,32
4	106,25	15,39
5	93,75	12,82
6	54,12	9,12
Valores médios	83,31±8,56	13,46±1,02

O percentual de lipídeos obtido nos ensaios de confirmação do modelo estatístico (níveis altos (+) de N e P) teve uma variação da ordem de 9,12 a 16,32 %. É importante ressaltar que, as concentrações mais elevadas de nitrogênio e fósforo no meio de cultivo forneceram maior produtividade celular, porém menores valores de percentual lipídico (ensaio 4) quando comparado as outras condições do planejamento. Por outro lado, os valores mais elevados para o percentual de lipídeos foram obtidos no ponto central (ensaios 5, 6 e 7), como pode ser verificado na Figura 5.7.

Figura 5.7. Produtividade de biomassa e teor de lipídeo obtido pela linhagem de *M. aeruginosa* NPCD-1 cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo no meio ASM-1.

De acordo com a literatura, se o suprimento de nitrogênio e fósforo for abundante nos meios de cultivo, um aumento na concentração de proteínas pode ser verificado, ocasionado pela presença de nitrogênio (PENTEADO, 2010) e tendência de formação de fosfolipídeos (lipídeos polares), ocasionado pela concentração de fósforo. Contrariamente, a limitação de nitrogênio ou fósforo no meio de cultivo pode gerar um estresse fisiológico que aumenta na medida em que a concentração dos nutrientes diminui. Esse estresse altera o metabolismo das microalgas e cianobactérias, direcionando os processos metabólicos para a produção de lipídeos de reserva para preparar a célula para o período de privação (MENG et al., 2009; BEARDALL; YOUNG; ROBERTS, 2001; ALONSO et al., 2000). Além disso, uma limitação de fósforo tende a direcionar o metabolismo das microalgas e cianobactérias para a produção de triglicerídeos

saturados e lipídeos neutros (SIRÓN; GIUSTI; BERLAND, 1989), que são os lipídeos de interesse para utilização como fonte de matéria-prima na síntese de biodiesel.

Alguns autores relatam que o teor de lipídeos de várias espécies de microalgas e cianobactérias aumenta quando o cultivo é realizado em meios com baixa concentração. No entanto, para esta mesma condição, uma redução na taxa de crescimento foi observada. Resultados similares foram também descritos por Widjaja e colaboradores (2009). Outros fatores como a intensidade de luz, CO₂ e temperatura também podem afetar significativamente o teor de lipídeos dos micro-organismos fotossintéticos e sua composição (TAHER et al., 2011).

5.5. Comparação de diferentes métodos de extração de lipídeos oriundo do cultivo da linhagem de *M. aeruginosa* NPCD-1

Tendo estabelecido as condições de cultivo da linhagem de *M. aeruginosa* NPCD-1, foi realizado um teste para avaliar quatro diferentes métodos de extração de lipídeos: “Bligh and Dyer” modificado, método de Folch (empregando banho de ultrassom e ultrassom de sonda) e método de extração em reator de micro-ondas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.10.

De acordo com os resultados dispostos na Tabela 5.10, observa-se que o método de Bligh and Dyer foi o mais eficiente na extração de lipídeos da cianobactéria estudada, fornecendo valores da ordem de $25,70 \pm 4,2\%$. A eficiência deste método foi seguida pelo método Folch conduzido no ultrassom de sonda, o qual resultou na extração de $22,30 \pm 2,9\%$ de lipídeos. Por outro lado, quando se empregou a metodologia de Folch, porém conduzida no ultrassom de banho, um menor teor de lipídeos foi obtido, da ordem de $14,69 \pm 3,5\%$. O método empregando irradiação de micro-ondas resultou em menor teor de lipídeo, resultando em apenas $5,64 \pm 1,7\%$ em relação à biomassa seca.

Tabela 5.10. Comparação de diferentes métodos de extração de lipídeos empregando a biomassa celular de *M. aeruginosa* NPCD-1.

Método	Teor de lipídeo (%)
“Bligh and Dyer”	$25,70 \pm 4,2$
Folch ¹	$14,69 \pm 3,5$
Folch ²	$22,30 \pm 2,9$
Irradiação de micro-ondas	$5,64 \pm 1,7$

¹conduzido no banho de ultrassom; ²conduzido no ultrassom de sonda.

O método de Bligh and Dyer, apesar de ter sido o mais eficiente para extração dos lipídeos, utiliza uma grande quantidade de solvente, dentre os quais: clorofórmio e metanol que são extremamente tóxicos e nocivos à saúde e ao meio ambiente. Entretanto, o método Folch conduzido no ultrassom de sonda apresentou uma eficiência similar ao Bligh and Dyer. Além disso, esse método apresenta simplicidade de execução é mais rápido e utiliza menor volume de solvente, sendo, portanto selecionado para efetuar as extrações de lipídeos nas demais biomassas de cianobactérias.

5.6. Avaliação do crescimento das cianobactérias *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 cultivadas em meios com distintas concentrações de carbonato de sódio

Visando selecionar uma faixa de concentração de carbonato de sódio (fonte de carbono inorgânico) no meio de cultivo de cada linhagem estudada, um experimento foi realizado variando as concentrações de Na_2CO_3 entre 0,02 a 14 g/L, conforme pode ser visualizado na Figura 5.8 (representado pela linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942).

Figura 5.8. Testes de concentração de carbonato de sódio (g/L) no meio de cultura BG-11 com inóculo de *Synechococcus* sp. PCC7942 para selecionar melhor faixa de crescimento: A-0,02; B-0,1; C-0,2; D-1,0; E-2,0; F-4,0; G-8,0; H-10,0; I-14,0.

Após 20 dias de cultivo foi possível observar que a linhagem de *Synechococcus* sp. PCC7942 manteve suas características de coloração e integridade das células quando cultivada em meio contendo 0,02 até 1g/L de carbonato de sódio (Figura 5.8A a D). Concentrações superiores a 1g/L de Na_2CO_3 influenciaram negativamente o crescimento de biomassa e formação de pigmentos (Figura 5.8 E a I).

Por outro lado, as linhagens de *Trichormus* sp. CENA77 e *M. aeruginosa* NPCD-1 não apresentaram inibição de crescimento nas condições extremas testadas, sendo que, desenvolveram-se bem sob concentrações mais elevadas de carbonato de sódio (8,0 a 14,0 g/L).

Porém, observou-se pela coloração da cultura, que a linhagem *Trichormus* sp. CENA77, quando cultivada na concentração de até 2,0 g/L, apresentou-se mais próxima à coloração da cultura controle. O mesmo evento foi observado pela cultura de *M. aeruginosa* NPCD-1.

Sendo assim, embora *Trichormus* sp. CENA77 e *M. aeruginosa* NPCD-1 tenham apresentado tolerância à concentração superior a 2 g/L de carbonato de sódio, uma maior produção de biomassa foi alcançada em concentrações abaixo desse valor. Desta forma, para manter as características originais das linhagens, favorecer seu crescimento e aumentar sua taxa de produtividade, torna-se necessário utilizar concentrações inferiores a 2 g/L para o cultivo dessas linhagens.

5.7. Influência da intensidade luminosa e fonte de carbono inorgânico no cultivo das linhagens de cianobactérias selecionadas empregando a metodologia de planejamento fatorial

Visando otimizar as condições de cultivo das linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 foi proposto um planejamento fatorial 2^2 , definindo como variáveis independentes a intensidade de luz (X_1) e concentração da fonte de carbono inorgânico (Na_2CO_3) (X_2) no meio de cultivo. Como variáveis dependentes foram consideradas: produtividade celular (mg/L/dia) e teor de lipídeos determinados ao final da etapa de cultivo de cada linhagem (10 dias). A matriz experimental juntamente com os resultados obtidos é mostrada na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial 2^2 utilizado para otimizar as variáveis independentes: intensidade de luz (X_1) e concentração de Na_2CO_3 (X_2) no meio de cultivo.

Ensaio	Variável				Produtividade celular (mg/L/dia)			Teor de lipídeo (%)			Produtividade lipídica (mg/L/dia)		
	Codificada		Real										
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	NPCD-1	CENA77	PCC7942	NPCD-1	CENA77	PCC7942	NPCD-1	CENA77	PCC7942
1	-1	-1	50	0,5	48,5	223,5	94,0	12,0	3,1	19,2	5,8	7,0	18,1
2	-1	+1	50	1,5	37,5	230,0	98,5	13,9	6,8	17,4	5,2	15,7	17,1
3	+1	-1	150	0,5	51,0	269,0	194,0	14,2	11,8	16,2	7,2	31,8	31,5
4	+1	+1	150	1,5	42,5	286,5	124,0	17,7	14,5	29,5	7,5	41,5	36,5
5	0	0	100	1,0	57,5	236,5	93,0	15,7	8,6	19,7	9,1	20,3	14,6
6	0	0	100	1,0	54,0	229,0	100,0	12,9	9,3	18,5	6,9	21,3	15,1
7	0	0	100	1,0	52,5	245,0	105,0	18,6	7,5	21,3	9,8	17,9	22,4

* *M. aeruginosa* NPCD-1; *Trichormus* sp. CENA77; *Synechococcus* sp. PCC7942; X_1 =Intensidade de luz ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); X_2 = Concentração de Na_2CO_3 (g/L).

5.7.1. Análise estatística dos resultados obtidos no cultivo das linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 considerando como variável resposta produtividade celular

Verifica-se na Tabela 5.11 que a produtividade celular obtida ao final de 10 dias de cultivo variou entre 37,5 a 57,5 mg/L/dia para a linhagem de *M. aeruginosa* NPCD-1, 223,5 a 286,5 mg/L/dia para a linhagem de *Trichormus* sp. CENA77 e 81,5 a 194,0 mg/L.dia para a linhagem de *Synechococcus* sp. PCC7942.

Para a linhagem de *M. aeruginosa* NPCD-1 os valores mais elevados foram obtidos no ponto central (intensidade de luz equivalente a $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e concentração de Na_2CO_3 de 1,0 g/L). A linhagem de *Trichormus* sp. CENA77 apresentou os valores mais elevados de produtividade celular nos níveis altos de ambas as variáveis (ensaio 4), da ordem de 286,5mg/L/dia. Por outro lado, os ensaios conduzidos nos níveis baixos, em especial para variável intensidade de luz (X_1), forneceram uma redução nos valores de produtividade celular (ensaios 1 e 2).

A linhagem de *Synechococcus* sp. PCC7942 forneceu valores de produtividade celular da ordem de 81,5 a 194,0 mg/L/dia, demonstrando forte influência da variável intensidade de luz (X_1) para se alcançar os melhores resultados (ensaios 3 e 4). Na Figura 5.9 está apresentada na forma de gráfico de Pareto, a análise estatística para a resposta produtividade celular (mg/L/d) obtida ao final do cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1. Neste gráfico, as barras representam os efeitos padronizados (t calculado) relacionados às variáveis respostas. Desta forma as variáveis representadas pelas barras que ultrapassam a linha vertical (t tabelado) são consideradas estatisticamente significativas ao nível de confiança de 90%.

Figura 5.9. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre a produtividade celular (mg/L/dia), produzida pelo cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1, para um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$).

Conforme pode ser observado, o único efeito significativo foi a variável concentração de Na_2CO_3 (X_2), apresentando efeito principal negativo (-3,79) sobre o fator de produtividade celular (mg/L/dia) da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1. Esta análise mostrou que a redução da concentração de Na_2CO_3 no meio de cultivo contribuiu para o aumento da produtividade. A variável intensidade de luz (X_1) indicou ter um efeito positivo (+1,46) sobre a produtividade celular da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 (variável resposta analisada), entretanto, não apresentou significância estatística ao nível de confiança de 90% dentro da faixa estudada, assim como a interação entre ambas variáveis.

A análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais e suas interações sobre a produtividade celular da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 indica pelo valor da curvatura ($p = 0,0378$) que o modelo linear não se adapta aos valores experimentais obtidos dentro da faixa estudada (Tabela 5.12).

Tabela 5.12. Análise de variância (ANOVA) usando o programa Design expert para a variável resposta produtividade celular (mg/L/dia) obtida ao final do cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1, ao nível de confiança de 90 %.

Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,100
Modelo	110,69	3	36,90	5,60	0,1551
X ₁	14,06	1	14,06	2,14	0,2814
X ₂	95,06	1	95,06	14,44	0,0628
X ₁ X ₂	1,56	1	1,56	0,24	0,6743
Curvatura	164,36	1	164,36	24,97	0,0378
Erro puro	13,17	2	6,58		
Cor total	288,21	6			

X₁ = Intensidade de luz, X₂ = Concentração de Na_2CO_3 , F: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

Empregando-se o programa Design-Expert 6.0 foi possível estimar as condições experimentais nas quais as variáveis estudadas fornecem os valores máximos de produtividade celular dentro da faixa analisada pelo planejamento. Desta forma, a Figura 5.10 mostra a região na qual valores de produtividade celular superiores a 49 mg/L/dia podem ser obtidos: intensidade de luz entre o ponto central e ponto alto (0, +), que se estende entre 100 a 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e níveis baixos de concentração de carbonato de sódio (valores abaixo de 0,5 mg/L).

Figura 5.10. Curvas de nível apresentada para a produtividade celular (mg/L/dia) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1.

Conforme constatado pela análise estatística, a única variável que apresentou significância sobre a produtividade celular da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 foi a concentração de Na_2CO_3 , o que indica que essa linhagem foi fortemente influenciada (negativamente) por essa variável e que provavelmente outra fonte de carbono inorgânico, em especial CO_2 , poderia resultar em melhores resultados. É importante ressaltar que o CO_2 é a fonte de carbono inorgânico mais utilizada no cultivo de microalgas e cianobactérias de modo a favorecer o aumento da produtividade, bem como do teor de lipídeos.

No estudo realizado por Yoo et al. (2010), duas microalgas (*Botryococcus braunii* e *Chlorella vulgaris*) e uma cianobactéria (*Scenedesmus* sp.) foram cultivadas com um ar ambiente que continha 10% de gás de combustão CO_2 visando estudar a produtividade celular e teor de lipídeos. Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios e os melhores resultados de produtividade celular foram obtidos pela cianobactéria *Scenedesmus* sp. (217,50 mg/L/dia), enquanto que para *C. vulgaris* e *B. braunii* foram obtidas produtividades inferiores: 104,76 e 26,55 mg/L/dia, respectivamente. Portanto, os resultados reportados por esses autores sugerem que, dentre as linhagens avaliadas, *Scenedesmus* sp. é a mais apropriada para ser cultivada em elevadas concentrações de CO_2 , devido a sua produtividade de biomassa elevada e alta capacidade de fixação desse gás de combustão (característica comum em cianobactérias).

A análise estatística para a resposta produtividade celular (mg/L/dia) obtida ao final do cultivo da linhagem *Trichormus* sp. CENA77 está apresentada na forma de gráfico de Pareto, conforme pode ser visualizada na Figura 5.11.

Figura 5.11. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre a produtividade celular (mg/L/dia), produzida durante 10 dias de cultivo da linhagem *Trichormus* sp. CENA77, para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Nota-se que o efeito principal da variável intensidade de luz (+6,37) foi positivo e significativo ao nível de 95% de confiança. Esta análise mostrou que o aumento da intensidade de luz contribuiu para aumentar a produtividade celular (mg/L/dia) da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77. A variável concentração de Na₂CO₃ (X_2) não apresentou efeito sobre a variável resposta analisada, o que significa que esta fonte de carbono não tem influência sobre a produtividade celular. A interação entre as variáveis estudadas também não apresentou significância estatística ao nível de 95% de confiança.

A partir desses dados, foi possível compor o modelo estatístico incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos, como apresentado na Equação 5.2, em que Y: representa a produtividade celular (mg/L/dia); X_1 é o valor codificado da variável intensidade luminosa e X_2 o valor codificado da variável concentração de Na₂CO₃. A análise de variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95% dos efeitos principais e suas interações sobre a variável resposta produtividade celular (mg/L/dia) está apresentada na Tabela 5.13.

$$Y = 245,25 + 25,5.X_1 + 6,0.X_2 + 2,75.X_1.X_2 \quad \text{Equação 5.2}$$

O valor do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9777$) obtido para esta análise revelou a qualidade do ajuste deste modelo matemático. Fato que também foi comprovado pela análise do teste F, uma vez que o valor de p (0,0332) foi menor que 0,05. Segundo alguns autores, se o valor de F calculado for maior que o tabelado para o nível de confiança adotado, há

evidência estatística suficiente para supor a existência de uma relação entre as variáveis (JUSTO et al., 2009).

Tabela 5.13. Análise de variância (ANOVA) usando o programa Design expert para a variável resposta produtividade celular (mg/L/dia) obtida ao final do cultivo da linhagem *Trichormus* sp. CENA77, ao nível de confiança de 95%.

Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,050
Modelo	2775,25	3	925,08	29,29	0,0332
X ₁	2601,00	1	2601,00	82,35	0,0119
X ₂	144,00	1	144,00	4,56	0,1663
X ₁ X ₂	30,25	1	30,25	0,96	0,4309
Curvatura	500,30	1	500,30	15,84	0,0577
Erro puro	63,17	2	31,58		
Cor total	3338,71	6			
R² = 0,9777					

X₁=Intensidade de luz, X₂ = Fonte de C, F: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

Levando em consideração que a curvatura não foi significativa ($p = 0,0577$), os dados da análise de variância descritos na Tabela 5.13 mostram que o modelo matemático se ajustou bem aos dados experimentais, indicando significância estatística ao nível de 95% de confiança. Uma vez que a curvatura não seja estatisticamente significativa, isso não implica na confiabilidade da equação obtida, podendo ser utilizada para estimar valores das variáveis independentes que mostrem resultados confiáveis para a variável resposta. A Figura 5.12 mostra o gráfico de superfície de resposta obtido.

Figura 5.12. Superfície de resposta para a produtividade celular (mg/L/dia) mostrando o efeito das variáveis: intensidade luminosa e concentração de Na₂CO₃ no meio de cultivo da linhagem *Trichormus* sp. CENA77.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 5.12) mostrou que para otimizar a produtividade celular da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77 produzida durante 10 dias de cultivo seria conveniente aumentar tanto a intensidade de luz quanto a concentração de carbonato de sódio no meio de cultivo, indicando que ambas as variáveis independentes tendem a um efeito positivo sobre a variável resposta.

Empregando-se o programa Design-Expert 6.0, procedeu-se à busca dos valores máximos de produtividade celular da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77 dentro da faixa estudada. Desta forma, as condições experimentais ótimas para se obter valores mais elevados de produtividade encontram-se nos níveis altos de intensidade de luz (próximo a $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e entre o ponto central e nível máximo para a variável concentração de carbonato de sódio (valores de 1,0 a 1,5 mg/L). Nessa região podem ser obtidos valores de produtividade celular acima de 275 mg/L/dia.

Figura 5.13. Curvas de nível apresentada para a produtividade celular (mg/L/dia) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem *Trichormus* sp. CENA77.

A análise estatística para a resposta produtividade celular (mg/L/dia) obtida ao final do cultivo da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 está apresentada na forma de gráfico de Pareto, conforme pode ser visualizada na Figura 5.14.

A análise da significância dos efeitos das variáveis independentes estudadas revelou que todas as variáveis foram significativas ao nível de 95% de confiança, inclusive a interação entre as variáveis. Analisando-se o efeito de cada variável independente sobre a resposta, nota-se que o principal efeito foi da variável intensidade de luz (+10,41), apresentando efeito

positivo e significativo ao nível de 95% de confiança. O que indica que, o aumento dessa variável provavelmente levaria à obtenção de maiores valores de produtividade celular (mg/L/dia) da biomassa de *Synechococcus* sp. PCC7942. A variável concentração de Na_2CO_3 (X_2), bem como a interação entre as variáveis apresentaram efeitos negativos sobre a variável resposta analisada (-5,43) e (-6,17) respectivamente, ao nível de 95% de confiança.

Figura 5.14. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre a produtividade celular (mg/L/dia), produzida pelo cultivo da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942, para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

A partir desses dados, foi possível gerar o gráfico *square* (Figura 5.15), que mostra o efeito das variáveis dentro da faixa analisada pelo planejamento (-1 a +1) sobre a variável resposta analisada: produtividade celular (mg/L/dia).

Figura 5.15. Gráfico *square* para a produtividade celular (mg/L/dia) mostrando o efeito das variáveis: intensidade luminosa e concentração de Na_2CO_3 no meio de cultivo da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942.

O gráfico *square* mostra que para otimizar a produtividade celular da biomassa de *Synechococcus* sp. PCC7942 produzida durante 10 dias de cultivo seria conveniente aumentar a intensidade de luz e reduzir a concentração de carbonato de sódio no meio de cultivo, indicando que as variáveis tendem a um efeito positivo e negativo respectivamente, sobre a variável resposta analisada.

Empregando-se o programa Design-Expert 6.0, procedeu-se à busca dos valores máximos de produtividade celular da biomassa de *Synechococcus* sp. PCC7942 dentro da faixa estudada. Desta forma, as condições experimentais ótimas para se obter valores mais elevados de produtividade encontram-se nos níveis altos de intensidade de luz (acima de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e nos níveis baixos de carbonato de sódio (valores abaixo de 1,0mg/L). Nessa região podem ser obtidos valores de produtividade celular acima de 170mg/L/dia.

Figura 5.16. Curvas de nível apresentada para a produtividade celular (mg/L/dia) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942.

5.7.2. Análise estatística dos resultados obtidos no cultivo das linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 considerando como variável resposta o teor de lipídeos

Com relação aos teores de lipídeos obtidos para cada condição estudada, a linhagem de *Synechococcus* sp. PCC7942 apresentou os melhores resultados de fração lipídica em relação às demais linhagens, resultando em valores da ordem de 15,7 a 29,5%. O valor mais elevado foi obtido no ensaio 4, em que ambas as variáveis: intensidade de luz e concentração de Na_2CO_3 foram empregadas no nível máximo.

A linhagem de *M. aeruginosa* NPCD-1 forneceu teores de lipídeo da ordem de 12 a 18,6%, apresentando similaridade nos valores obtidos para os ensaios conduzidos no ponto central e níveis altos (+, +) para ambas as variáveis (ensaios 4, 5 e 7). Por outro lado, a

linhagem de *Trichormus* sp. CENA77 forneceu os menores valores de teor lipídico, da ordem de 3,1 a 14,5%. Conforme pode ser observado, o valor mais elevado foi obtido no ensaio em que ambas variáveis foram usadas em seus níveis altos (ensaio 4), o que indica um forte indício de ambas variáveis influenciarem no teor de lipídeos alcançado para essa linhagem. Em contraste, uma queda brusca da fração lipídica foi obtida quando o experimento foi conduzido na presença dos níveis baixos de ambas variáveis (ensaio 1). Na Figura 5.17 está apresentada na forma de gráfico de Pareto, a análise estatística para a resposta teor de lipídeo (%) obtido ao final da etapa de cultivo pela linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1.

Figura 5.17. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre o teor de lipídeo (%) obtido ao final do cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1, para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Conforme pode ser observado, nenhuma variável independente teve efeito estatístico significativo sobre o teor de lipídeo (%) obtido ao final do cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1. Esta análise mostrou que dentro da faixa estudada, ambas as variáveis não contribuem para o aumento do teor de lipídeo dessa específica linhagem. A interação entre intensidade de luz (X_1) e concentração de Na₂CO₃ (X_2) também não apresentou efeito sobre o teor de lipídeo resultante da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1 ao nível de confiança de 95%. Os teores de lipídeos obtidos para esta linhagem (12 a 18,6%), dentro das condições avaliadas pelo planejamento estão muito próximos, justificando a não significância estatística dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta.

A análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais e suas interações sobre os valores de teor de lipídeos (%) obtidos pelo cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 confirmou a não significância do modelo estatístico, conforme visualizado na Tabela 5.14. Nota-se que o modelo não foi estatisticamente significativo ($p = 0,6355$), ressaltando que o modelo linear não foi adequado aos valores experimentais obtidos dentro da faixa estudada.

Adicionalmente, o valor do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,5103$) obtido para esta análise revelou a falta de ajuste deste modelo matemático.

Com auxílio do programa Design-Expert 6.0 foi possível determinar as condições experimentais nas quais as variáveis estudadas fornecem os valores máximos de teor de lipídeos (%) dentro da faixa analisada pelo planejamento. Desta forma, a Figura 5.18 mostra a região em que pode se obter teores de lipídeo acima de 16%: intensidade de luz entre o ponto central e ponto alto (0, +), que se estende entre 100 a 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e concentração de carbonato de sódio também entre o ponto central e ponto alto (valores acima de 1,0 mg/L).

Tabela 5.14. Análise de variância (ANOVA) usando o programa Design expert para a variável resposta teor de lipídeo (%) obtida ao final do cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1, ao nível de confiança de 95%.

Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,100
Modelo	16,93	3	5,64	0,69	0,6355
X ₁	9,00	1	9,00	1,11	0,4029
X ₂	7,29	1	7,29	0,90	0,4435
X ₁ X ₂	0,64	1	0,64	0,08	0,8053
Curvatura	2,82	1	2,82	0,35	0,6152
Erro puro	16,25	2	8,12		
Cor total	36,00	6			
R² =	0,5103				

X₁ = Intensidade de luz, X₂ = Concentração de Na₂CO₃, F: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

Figura 5.18. Curvas de nível apresentada para o teor de lipídeo obtido (%) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1.

Na Figura 5.19 está apresentada na forma de gráfico de Pareto, a análise estatística para a resposta teor de lipídeo (%) obtido ao final da etapa de cultivo pela linhagem *Trichormus* sp. CENA77.

Figura 5.19. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre o teor de lipídeo (%) obtido ao final do cultivo da linhagem *Trichormus* sp. CENA77, para um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$).

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 5.19), resultante do processamento estatístico dos dados experimentais dispostos na Tabela 5.11, a análise da significância dos efeitos das variáveis independentes revelou que ambas as variáveis foram significativas ao nível de 90% de confiança. Por outro lado, a interação entre as variáveis não apresentou significância estatística. Analisando-se o efeito de cada variável independente sobre a resposta, nota-se que o principal efeito foi da variável intensidade de luz (+9,03), apresentando efeito positivo e significativo, indicando que, o aumento dessa variável permite obter valores mais elevados do teor de lipídeo (%) na biomassa de *Trichormus* sp. CENA77. A variável concentração de Na₂CO₃ também apresentou efeito positivo (+3,52) ao nível de 90% de confiança, evidenciando que o aumento da concentração de carbonato de sódio no meio de cultivo dessa linhagem pode resultar em maiores valores de teor de lipídeo.

A partir desses dados, foi possível compor o modelo estatístico incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos, como apresentado na Equação 5.3, em que Y: representa o teor de lipídeo (%); X₁ é o valor codificado da variável intensidade luminosa e X₂ o valor codificado da variável fonte de carbono inorgânico.

$$Y = 8,8 + 4,10.X_1 + 1,60.X_2 \quad \text{Equação 5.3}$$

Conforme pode ser observado, o valor do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9793$) obtido para esta análise revelou a qualidade do ajuste deste modelo matemático. Fato que

também foi comprovado pela análise do teste F, uma vez que o valor de p (0,0310) foi menor que 0,05, indicando que a equação ajustada foi capaz de explicar 97,9% da variabilidade dos valores experimentais.

Tabela 5.15. Análise de variância (ANOVA) usando o programa Design expert para a variável resposta teor de lipídeo (%) obtida ao final do cultivo da linhagem *Trichormus* sp. CENA77, ao nível de confiança de 90%.

Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,100
Modelo	77,73	3	25,91	31,47	0,0310
X ₁	67,24	1	67,24	81,67	0,0120
X ₂	10,24	1	10,24	12,44	0,0718
X ₁ X ₂	0,25	1	0,25	0,30	0,6369
Curvatura	0,58	1	0,58	0,71	0,4885
Erro puro	1,65	2	0,82		
Cor total	79,96	6			
R² =	0,9793				

X₁ = Intensidade de luz, X₂ = Concentração de Na₂CO₃, F: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

Levando em consideração que a curvatura não foi significativa ($p = 0,4885$), os dados da análise de variância descritos na Tabela 5.15 mostram que o modelo matemático se ajustou bem aos dados experimentais, indicando significância estatística ao nível de 95% de confiança. O gráfico de superfície de resposta (Figura 5.20) mostrou que para otimizar o teor de lipídeo (%) resultante da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77 produzido ao final de 10 dias de cultivo seria conveniente aumentar tanto a intensidade de luz quanto a concentração de carbonato de sódio no meio de cultivo, indicando que ambas as variáveis independentes tendem a um efeito positivo sobre a variável resposta.

Figura 5.20. Superfície de resposta para o teor de lipídeo (%) mostrando o efeito das variáveis: intensidade luminosa e concentração de Na₂CO₃ no meio de cultivo da linhagem *Trichormus* sp. CENA77.

Empregando-se o programa Design-Expert 6.0, procedeu-se à busca dos valores máximos de teor de lipídeo produzido pela linhagem *Trichormus* sp. CENA77 dentro da faixa estudada. Desta forma, as condições experimentais ótimas para se obter valores mais elevados de lipídeos encontram-se nos níveis altos de intensidade de luz (próximo a $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e entre o ponto central e nível máximo para a variável concentração de carbonato de sódio (valores de 1,0 a 1,5 mg/L). Nessa região podem ser obtidos teores de lipídeos superiores a 13% em relação a biomassa seca.

Figura 5.21. Curvas de nível apresentadas para o teor de lipídeo obtido (%) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem *Trichormus* sp. CENA77.

A seguir são apresentadas na forma de gráfico de Pareto, a análise estatística para a variável resposta teor de lipídeo (%) obtido ao final do cultivo da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942, conforme pode ser visualizada na Figura 5.22.

Figura 5.22. Efeitos das variáveis independentes estudadas, bem como sua interação sobre o teor de lipídeo (%) obtido ao final do cultivo da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942, para um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$).

Nota-se que todas as variáveis foram significativas ao nível de 90% de confiança, incluindo a interação entre ambas, que inclusive teve o principal efeito sobre a variável resposta analisada (+5,37). As variáveis independentes analisadas também apresentaram efeito positivo e significativo: concentração de Na_2CO_3 (+4,09) e intensidade de luz (+3,24) ao nível de 90% de confiança. O que indica que, o aumento de todas as variáveis leva a obtenção de maiores teores de lipídeos (%) ao final do cultivo da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942.

A partir desses dados, foi possível compor o modelo estatístico incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos, como apresentado na Equação 5.4, em que Y: representa o teor de lipídeo (%); X_1 é o valor codificado da variável intensidade luminosa e X_2 o valor codificado da variável fonte de carbono inorgânico.

$$Y = 20,57 + 2,27.X_1 + 2,87.X_2 + 3,77.X_1.X_2 \quad \text{Equação 5.4}$$

Conforme pode ser observado, o valor do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9656$) obtido na análise de variância revelou a qualidade do ajuste deste modelo matemático. Fato que também foi comprovado pela análise do teste F, uma vez que o valor de p (0,0512) foi menor que 0,1, indicando que a equação ajustada pode explicar 96,56% da variabilidade dos valores experimentais.

Tabela 5.16. Análise de variância (ANOVA) usando o programa Design expert para a variável resposta teor de lipídeo (%) obtida ao final do cultivo da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942, ao nível de confiança de 90%.

Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,100
Modelo	110,77	3	36,92	18,71	0,0512
X_1	20,70	1	20,70	10,49	0,0835
X_2	33,06	1	33,06	16,75	0,0548
X_1X_2	57,00	1	57,00	28,89	0,0329
Curvatura	0,94	1	0,94	0,48	0,5609
Erro puro	3,95	2	1,97		
Cor total	115,66	6			
$R^2 =$	0,9656				

X_1 =Intensidade de luz, X_2 = Concentração de Na_2CO_3 , **F**: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 5.23) mostrou que para otimizar o teor de lipídeo (%) resultante da biomassa de *Synechococcus* sp. PCC7942 produzido ao final de 10 dias de cultivo seria conveniente aumentar tanto a intensidade de luz quanto a concentração de carbonato de sódio no meio de cultivo, indicando que ambas variáveis independentes, incluindo sua interação tendem a um efeito positivo sobre a variável resposta.

Figura 5.23. Superfície de resposta para o teor de lipídeo (%) mostrando o efeito das variáveis: intensidade de luz e concentração de Na_2CO_3 no meio de cultivo da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942.

Empregando-se o programa Design-Expert 6.0, procedeu-se à busca dos valores máximos de teor de lipídeo produzido pela linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 dentro da faixa estudada. Desta forma, as condições experimentais ótimas para se obter valores mais elevados de lipídeos encontram-se nos níveis altos de intensidade de luz (próximo a $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentração de carbonato de sódio (próximo a 1,5 mg/L). Nessa região podem ser obtidos teores de lipídeos superiores a 25% em relação à biomassa seca.

Figura 5.24. Curvas de nível apresentada para o teor de lipídeo obtido (%) em função das variáveis estudadas no cultivo da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942.

5.7.3. Condições estabelecidas de cultivo das linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942

A produtividade celular e lipídica das linhagens de cianobactérias em função das variáveis intensidade luminosa (50 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (X_1) e concentração de Na_2CO_3 (0,5 a 1,5 g/L) (X_2), conforme resultados discutidos detalhadamente nos itens 5.7.1 e 5.7.2, indicou efeitos diferenciados para as três linhagens testadas.

No caso da produtividade celular foi constatado que no cultivo da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 somente a variável X_2 teve significância estatística, enquanto que a variável X_1 foi estatisticamente significativa para *Trichormus* sp. CENA77. Por outro lado, tanto X_1 como X_2 bem como a interação entre elas, foram estatisticamente significativas para a produtividade celular da *Synechococcus* sp. PCC7942. De um modo geral, foi verificado que produtividades celular mais elevadas foram obtidas nos níveis máximos de intensidade luminosa e mínimos de concentração de Na_2CO_3 , com exceção da linhagem *Trichormus* sp. CENA77, em que ambas as variáveis devem ser empregadas nos níveis altos (+,+).

A otimização do teor de lipídeos (%) obtido por cada linhagem em função das variáveis intensidade luminosa (50 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (X_1) e concentração de Na_2CO_3 (0,5 a 1,5 g/L) (X_2), indicou que com exceção da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 que não sofreu influência estatisticamente significativa dentro da faixa estudada, o teor de lipídeo para as outras duas linhagens foi favorecido pela presença de meio de cultivo suplementado com Na_2CO_3 , sendo que, dentro da faixa estudada, os valores mais elevados de teor de lipídeos (%) foram obtidos quando ambas as variáveis encontram-se nos níveis máximos.

Desta forma, este estudo permitiu estabelecer as condições que favorecem o aumento da produtividade lipídica das linhagens *Synechococcus* sp. PCC7942 e *Trichormus* sp. CENA77. Conforme pode ser observado na Tabela 5.17, nas condições otimizadas de cultivo preditas pelos modelos estatísticos foram constatados incrementos da ordem de 5 a 6 vezes na produtividade lipídica, ou seja, quando a intensidade luminosa aumentou de 100 para 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 1,5 g/L de Na_2CO_3 foi adicionado no meio de cultivo.

Para linhagem de *M. aeruginosa* NPCD-1, em função do efeito negativo exercido pela presença de Na_2CO_3 no meio de cultivo, estudos complementares são ainda necessários visando aumentar os parâmetros de produtividades, provavelmente usando outra fonte de carbono inorgânico, como por exemplo, CO_2 .

Tabela 5.17. Comparação do desempenho das linhagens de cianobactérias: *M. aeruginosa* NPCD-1, *Synechococcus* sp. e *Trichormus* sp. CENA77 cultivadas sob diferentes condições

Linhagem	Meio	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Fonte de carbono (Na_2CO_3)	Produtividade celular (mg/L/dia)	Produtividade lipídica (mg/L/dia)
<i>M. aeruginosa</i>	ASM-1	100*	Ausente	46,92	13,18
NPCD-1		100	1,0 g/L	54,66	5,16
<i>Synechococcus</i> sp.	BG11	100*	Ausente	19,78	7,39
PCC7942		150	1,5 g/L	124,0	36,50
<i>Trichormus</i> sp.	BG 11	100*	Ausente	30,83	7,26
CENA77		150	1,5 g/L	286,5	41,50

*Dados descritos anteriormente na Tabela 5.3

5.8. Síntese de biodiesel por catálise bioquímica

5.8.1. Etanólise do óleo de *M. aeruginosa* NPCD-1

Os resultados obtidos, nas reações de etanólise do óleo de *M. aeruginosa* NPCD-1 e óleo de palma em função da concentração em monoésteres etílicos são mostrados nas Figuras 5.25 a 5.28. As Figuras 5.25 e 5.26 correspondem às reações conduzidas na presença de terc-butanol como solvente e as Figuras 5.27 e 5.28 correspondem as reações conduzidas na presença de iso-octano.

Figura 5.25. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação a partir do óleo de *M. aeruginosa* em presença de terc-butanol.

Figura 5.26. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação a partir do óleo de palma em presença de terc-butanol.

Figura 5.27. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação a partir do óleo de *M. aeruginosa* em presença de iso-octano.

Figura 5.28. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação a partir do óleo de palma em presença de iso-octano.

Com base nos resultados obtidos, nesta série de experimentos, verifica-se que o material lipídico extraído da linhagem de *M. aeruginosa* NPCD-1 apresenta um bom potencial como fonte de matéria-prima para síntese de biodiesel. Conforme pode ser verificado, independente do tipo de solvente, as reações apresentaram o mesmo perfil cinético com relação à formação dos principais ésteres de ácidos graxos presentes nos óleos empregados, com destaque para os ésteres de oleato e palmitato de etila, que são os ácidos graxos presentes em maior proporção nas matérias-primas lipídicas usadas.

Entretanto, tanto para a velocidade de reação como para os rendimentos de reação, foi constatada uma influencia marcante do solvente utilizado. Quando se utilizou terc-butanol como solvente para condução da etanólise do óleo da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1 (Figura 5.25) o valor máximo em concentração mássica de ésteres de etila (44,24%) foi obtido em 24 h, correspondendo a 80,20% de rendimento de transesterificação. Na reação controle (Figura 5.26), para o mesmo tempo reacional foi obtida uma concentração mássica de ésteres de etila da ordem de 57,46%, correspondendo a rendimento de 85,27%. Entretanto, nesse caso verifica-se que a partir de 12h de reação, já tinha sido alcançado o equilíbrio estequiométrico.

Nas reações conduzidas na presença de iso-octano (Figuras 5.27 e 5.28) conversões mais elevadas foram obtidas tanto para o óleo de *M. aeruginosa* como para o óleo de palma. No teste referente à etanólise do óleo da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1 o valor máximo obtido em concentração mássica de ésteres de etila foi da ordem de 67,84%, correspondendo a

um rendimento de 98,09% em 48h (Figura 5.27). Para reação controle, a conversão total do óleo de palma nos ésteres correspondentes foi alcançada em 12 h (Figura 5.28).

Essa diferença de comportamento pode ser creditada a influencia do solvente no meio reacional, principalmente quando a enzima Novozym 435® é utilizada como catalisador. Dados descritos na literatura revelam que a lipase Novozym 435® pode utilizar terc-butanol como agente acilante e transformar os ácidos graxos presentes na matéria-prima lipídica em derivados de ésteres butílicos terciários (FU; VASUDEVAN, 2010). Desta forma, para evitar desvios da rota desejada os autores recomendam o uso de iso-octano ou alternativamente um mistura contendo 95% de iso-octano e 5% de terc-butanol.

Essa hipótese foi confirmada nos resultados reportados no presente trabalho, apesar de não ter sido quantificado por método analítico a formação desses ésteres. Entretanto, pelos resultados obtidos, principalmente com relação à reação controle (óleo de palma), fica claro que atenção especial deve ser dada a escolha do tipo solvente para condução de reações de transesterificação catalisadas pela lipase Novozym 435®, conforme ilustrado na Figura 5.29.

Figura 5.29. Influência do tipo de solvente na síntese de biodiesel a partir do óleo de palma e etanol.

5.8.2. Etanólise do óleo de *Trichormus* sp. CENA77

A reação de etanólise do material lipídico da linhagem de *Trichormus* sp. CENA77 foi conduzida nas mesmas condições reacionais utilizadas na etanólise da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1. Os ensaios foram efetuados na presença de iso-octano como solvente da

reação, após ter sido selecionado como melhor solvente a ser usado devido ao fato de não influenciar na formação dos ésteres etílicos. Os resultados obtidos, em função da concentração em monoésteres etílicos são mostrados nas Figuras 5.30 e 5.31 para etanólise do material lipídico de *Trichormus sp.* CENA77 e etanólise do óleo de palma, respectivamente.

Verifica-se que ambas as reações apresentaram o mesmo perfil cinético com relação à formação dos principais ésteres de ácidos graxos presentes nos óleos empregados, com destaque para os ésteres de oleato e palmitato de etila, que são os ácidos graxos presentes em maior proporção nas matérias-primas lipídicas usadas. Entretanto, somente a reação controle (Figura 5.31) alcançou conversão total dos ácidos graxos em seus respectivos ésteres, sendo obtido um rendimento de 97,69 % em apenas 6h de reação.

Figura 5.30. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação de etanólise do óleo de *Trichormus* CENA77.

Figura 5.31. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação de etanólise do óleo de palma.

Para etanólise do óleo da biomassa de *Trichormus sp.* CENA77 (Figura 5.30), o valor máximo em concentração mássica de ésteres de etila obtido em 48 h foi da ordem de 24,50 m/m%, correspondendo a 43,21% de rendimento de transesterificação. Esse resultado apresentou uma acentuada redução de velocidade de reação em relação ao controle (óleo de palma) e também aos testes efetuados com óleo extraído da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1. Esses resultados não são imediatamente compreendidos se apenas a composição em ácidos graxos for considerada, tendo em vista que a composição da biomassa de *Trichormus sp.* é bastante similar a da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1, conforme discutido e

apresentado no item 5.8.1.

Entretanto, é oportuno esclarecer que foi observada uma mudança bastante significativa na coloração do biocatalisador ao final da reação. Fato que talvez justifique que nessas reações, o biocatalisador possa ter adsorvido pigmentos ou corantes presentes em maior quantidade no material lipídico resultante dessa biomassa, conforme observado durante as etapas de extração, que pode ter contribuído para redução da atividade catalítica da enzima.

5.8.3. Etanólise do óleo de *Synechococcus* sp. PCC7942

A reação de etanólise do material lipídico da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 foi conduzida nas mesmas condições reacionais testadas anteriores para outras matérias-primas lipídicas de cianobactérias. A reação foi efetuada na presença de iso-octano como solvente e os resultados obtidos, em função da concentração em monoésteres de etila são mostrados na Figura 5.32.

Figura 5.32. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo de reação de etanólise do óleo de *Synechococcus* sp. PCC7942.

O perfil de formação dos ésteres de etila (Figura 5.32) indica que foram formados os principais ésteres de ácidos graxos presentes no material lipídico da biomassa testada, com destaques para os ésteres de linoleato, oleato e palmitato de etila, respectivamente, que são os ácidos graxos presentes em maior proporção na matéria-prima resultante da biomassa da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942.

Os valores de concentração de ésteres de etila (%) variaram de 27,34 a 49,97 m/m%, correspondendo a rendimentos da ordem de 47,69 a 87,17%, respectivamente para os tempos reacionais de 24 e 96h.

Do ponto de vista comparativo entre as três biomassas lipídicas testadas na síntese de biodiesel pela rota etílica via catálise bioquímica, verifica-se que o desempenho do biocatalisador foi diferente para cada matéria-prima analisada. Em apenas 48h de reação praticamente uma conversão total da matéria-prima lipídica oriunda da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1 (98,09%) foi convertida em biodiesel. Nesse mesmo tempo reacional a matéria-prima lipídica resultante da biomassa de *Synechococcus* sp. PCC7942 resultou em um rendimento de 69,06%. Por outro lado, a matéria-prima lipídica resultante da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77 forneceu uma conversão menor (43,21%).

O trabalho realizado por Lai e colaboradores (2012), teve por objetivo avaliar a produção enzimática de biodiesel a partir do material lipídico de três linhagens de microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Botryococcus braunii*. Foram testadas duas lipases como biocatalisador da reação: *Penicillium expansum* (PEL) e Novozym 435 e dois sistemas de solvente: líquido iônico [(BMIm) (PF₆)] e terc-butanol. Os melhores resultados foram obtidos quando líquido iônico foi utilizado como solvente independente do biocatalisador empregado. Nessas condições, foram obtidos rendimentos de 90,7 e 86,2% em 48h para reações catalisadas por PEL e Novozym 435, respectivamente. Quando as reações foram conduzidas na presença de ter-butanol como solvente, resultados inferiores foram obtidos no mesmo tempo reacional: 86,2 e 44,4% para reações catalisadas por PEL e Novozym 435, respectivamente. Por outro lado, se compararmos o desempenho de ambos os biocatalisadores testados, observa-se que a lipase de *Penicillium expansum* forneceu melhores resultados, principalmente na reação conduzida na presença de terc-butanol. Esses resultados confirmam a importância do solvente utilizado nas reações catalisadas por lipases.

Outros autores avaliaram a biomassa lipídica oriunda da cianobactéria de água doce *Oscillatoria annae* BDU6, isolada e obtida na Índia como fonte de matéria-prima lipídica na reação. Foram testados dois sistemas de catalisadores para mediar a reação: metóxido de sódio (catalisador químico) e lipase imobilizada em alginato de sódio (catalisador bioquímico). A conversão dos triglicerídeos em biodiesel forneceu melhor resultado quando catalisada pela via química, na qual um rendimento de 86% foi obtido em 3h de reação. Porém, a reação de transesterificação catalisada pela lipase imobilizada forneceu um rendimento de 76,5% em 12h (VIMALARASAN et al., 2011).

No estudo realizado por Tran e colaboradores (2012), o material lipídico oriundo da biomassa de *Chlorella vulgaris* ESP-31 foi testado na síntese enzimática de biodiesel. A lipase empregada como biocatalisador foi a *Burkholderia* sp. C20 imobilizada em suporte com propriedades magnéticas. A reação de transesterificação foi conduzida de duas maneiras: empregando óleo extraído (R1) e usando diretamente a biomassa microalgal (R2). Os resultados obtidos revelaram que, quando utilizou-se diretamente a biomassa microalgal (R2) uma conversão maior de biodiesel foi obtida (97,3%) em 48h. A reação empregando o óleo extraído forneceu rendimento menor (72,1%) no mesmo tempo reacional. O estudo da reutilização do biocatalisador indicou que o mesmo pode ser usado repetidamente por seis ciclos (ou 288 h) sem perda significativa da atividade inicial.

5.9. Síntese de biodiesel por catálise química

Adotando as condições descritas no item 4.12, o desempenho do catalisador químico heterogêneo (Nb/Na) foi avaliado nas reações de transesterificação das matérias-primas lipídicas das linhagens: *M. aeruginosa* NPCD-1, *Synechococcus* sp. PCC7942 e *Trichormus* sp. CENA77.

As amostras de biodiesel foram quantificadas empregando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H), a qual permite avaliar a conversão das matérias-primas lipídicas em biodiesel, tomando por base o monitoramento das variações no sinal dos hidrogênios da glicerina, possibilitando assim confirmar a ocorrência da reação de transesterificação do triglicerídeo e a sua conversão em ésteres etílicos.

Essa técnica tem sido empregada para monitorar reações de transesterificação química e enzimática e vem sendo muito utilizada recentemente por requerer uma quantidade mínima de amostra na análise, além de ser uma análise rápida (PAIVA, 2010; CARVALHO, 2011; ANDRADE, 2012). As Figuras 5.33, 5.34 e 5.35 ilustram os espectros de RMN¹H referentes as amostras de biodiesel purificadas.

Nos espectros da Figura 5.33 (correspondente ao material lipídico da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1) verifica-se a ausência dos sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio do grupo do CH₂ do glicerol em 4,2 ppm e o aparecimento do sinal de um quarteto em 4,1 ppm, referente aos hidrogênios metilênicos da porção alcoólica do éster [CH₃-CH₂-OC(=O)-R]. O valor de rendimento calculado por essa técnica foi de 100%, confirmando os resultados obtidos pela via enzimática de acordo com análise cromatográfica reportada no

item 5.8.1. O material lipídico da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 forneceu conversão similar (94,12%), conforme espectros mostrados na Figura 5.34.

A menor conversão foi obtida para o material lipídico oriundo da biomassa da linhagem *Trichormus* sp. CENA77 devido ao seu elevado índice de acidez (15,74 mg KOH/g) e teor de ácidos graxos livres (9%), (Apêndice C), que pode ter inibido a ação catalítica do Nb/Na, reduzindo o rendimento da reação (50%). Alguns autores relatam que matérias-primas lipídicas que apresentam percentagem de ácidos graxos livres acima de 5% não são adequadas quando se utiliza a catálise básica na síntese de biodiesel (PORPHY; FARID, 2012). Outros catalisadores são indicados nesse caso, preferencialmente ácidos.

Figura 5.33. Ressonância magnética nuclear de prótons do biodiesel da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1.

Figura 5.34. Ressonância magnética nuclear de prótons do biodiesel da biomassa de *Synechococcus* sp. PCC7942.

Figura 5.35. Ressonância magnética nuclear de prótons do biodiesel da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77.

Como pode ser verificado na Figura 5.35, o espectro de RMN¹H, além de apresentar o quarteto referente ao desdobramento do pico correspondente ao hidrogênio metilênico presente na estrutura dos ésteres etílicos, apresentou também picos que podem estar relacionados com a presença de mono, di e triglicerídeos que não foram convertidos a ésteres.

Resultados similares foram relatados por Carvalho (2011), no estudo referente a utilização do óleo de macaúba como fonte de matéria-prima lipídica na síntese de biodiesel empregando o mesmo sistema catalítico (Nb/Na), rendimento de transesterificação de apenas 20,7% em 5h foi alcançado devido à elevada acidez presente no óleo (16,11 mg KOH/g).

5.9.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para determinar qualitativamente os componentes formados nas reações de transesterificação empregando as matérias-primas lipídicas resultantes das biomassas de cianobactérias testadas neste trabalho. Por ser não destrutiva e não necessitar da realização de pré-tratamento na amostra, essa técnica vem sendo empregada na identificação dos grupos funcionais e bandas correspondentes às vibrações dos estiramentos e flexões nas amostras de biodiesel. A posição do grupo carbonila no FTIR é sensível aos efeitos substituintes dos ésteres e a estrutura da molécula (BIANCHI et al., 1995). Os ésteres têm duas bandas de absorção fortes e características do grupo carbonila (C=O) por volta de 1750-1730 cm⁻¹ e para o grupo νC–O (estiramento axial simétrico e não simétrico) em 1300-1000 cm⁻¹ (SOARES et al., 2008). As vibrações de estiramento do CH₃, CH₂ e CH aparecem em 2980-2950, 2950-

2850 e 3050-3000 cm^{-1} , enquanto que as vibrações de flexão (ρCH_2) desses grupos aparecem em 1475-1350, 1350-1150 e 722 cm^{-1} , respectivamente (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

A Figura 5.36 mostra os espectros na região do infravermelho das amostras de biodiesel resultantes das reações conduzidas por catálise química, na qual verifica-se a ocorrência de bandas de absorção características em 1750 cm^{-1} correspondentes a deformação axial da carbonila ($-\text{C}=\text{O}$), em 1170 cm^{-1} relacionado à deformação axial da ligação éster ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) e em 722 cm^{-1} atribuído a seqüência de cadeia alifática $-(\text{CH}_2)_n$. Este comportamento é similar ao reportado para amostras de biodiesel obtidas de diferentes matérias-primas lipídica (SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2011). As bandas presentes na região de 3100-3500 cm^{-1} relacionadas à deformação axial característica do grupo hidroxila (OH), sugerem que as amostras de biodiesel apresentam provavelmente traços de água ou etanol, remanescentes da etapa de purificação.

Figura 5.36. Espectros na região do infravermelho das amostras de biodiesel oriundo das linhagens de *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942.

5.9.2. Análise termogravimétrica (TGA)

Outra técnica muito utilizada para verificar a conversão dos óleos em biodiesel é a Análise termogravimétrica (TGA) ou Termogravimetria, que foi também utilizada como parâmetro de avaliação qualitativa e quantitativa neste trabalho. Essa técnica permite avaliar a

conversão da reação de transesterificação, bem como determinar a estabilidade térmica do biodiesel obtido.

A técnica de Termogravimetria (TGA) gera como resultado uma curva de decomposição térmica que informa as etapas de degradação das amostras em função da temperatura. Por meio da análise desses dados, é possível estabelecer parâmetros de estabilidade térmica do biodiesel obtido. Sendo que, o biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos, possui propriedades físicas análogas àquelas obtidas para os ésteres puros.

A Figura 5.37 apresenta as curvas de decomposição térmica das amostras de biodiesel obtidas a partir das matérias-primas lipídicas das cianobactérias: *M. aeruginosa* NPCD-1, *Synechococcus* sp. PCC7942 e *Trichormus* sp. CENA77. As amostras de biodiesel analisadas são resultantes da reação de transesterificação pela via química, uma vez que a via bioquímica não permitiu a realização da etapa de purificação do biodiesel, devido ao pequeno volume do meio reacional.

Figura 5.37. Análise termogravimétrica (TGA) das amostras de biodiesel oriundo das matérias-primas lipídicas de *M. aeruginosa* NPCD-1, *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 via catálise química.

Verifica-se na Figura 5.37 que o biodiesel oriundo da biomassa da cianobactéria *M. aeruginosa* NPCD-1 apresentou apenas a ocorrência de um evento térmico, aproximadamente, entre 100 a 280°C. A temperatura inicial de decomposição foi bem menor em relação à temperatura inicial de decomposição do seu material lipídico antes de ser transesterificado (280 a 500°C), confirmando assim a maior volatilidade do biodiesel, e certificando a qualidade da mistura dos ésteres de etila como biocombustível.

Para o biodiesel oriundo da matéria-prima lipídica da biomassa de *Synechococcus* sp. PCC7942 pode-se notar que ocorreram dois eventos térmicos na amostra de biodiesel. O primeiro evento ocorreu na faixa de temperatura de 150 a 300°C aproximadamente, referente à decomposição dos ésteres etílicos e o segundo na faixa de temperatura de 300 a 450 °C o que indica uma fração do óleo não convertido, visto que a análise foi realizada em atmosfera inerte, o que descarta a possibilidade desse evento térmico estar relacionado à oxidação do material.

Para a amostra de biodiesel oriunda da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77, a Figura 5.37 mostra que ocorreram dois eventos térmicos na amostra analisada. O primeiro evento ocorreu na faixa de temperatura de 200 a 300°C, aproximadamente, referente à decomposição dos ésteres etílicos e o segundo na faixa de temperatura de 300 a 500°C, relacionado com a decomposição do óleo não convertido.

5.10. Comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos na síntese de biodiesel da biomassa de cianobactérias

Um estudo comparativo do desempenho dos catalisadores heterogêneos foi efetuado, tomando por base os dados alcançados na transesterificação das matérias-primas lipídicas oriunda das linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1, e *Synechococcus* sp. PCC7942 por fornecerem elevadas conversões em ésteres de etila.

A linhagem de *Trichormus* sp. CENA77 não foi utilizada para tal comparação, pois apresentou valores insatisfatórios de rendimento de transesterificação (inferiores a 50 %) independente do tipo de catalisador empregado (químico ou enzimático). Em função do elevado teor de acidez da biomassa lipídica derivada do cultivo de linhagem de *Trichormus* sp. CENA77 recomenda-se utilizar catalisadores ácidos para promover a esterificação dos ácidos graxos livres. Este tipo de limitação tem sido também registrado na literatura na descrição de processo de obtenção de biodiesel para matérias-primas diversas, incluindo óleos residuais e vegetais (BECKER; MAKKAR, 2008; VASUDEVAN; BRIGGS, 2008; SUAREZ et al., 2009) e biomassas algais (CHENG et al., 2009; CHINNASAMY et al., 2010).

As conversões obtidas pela atuação de cada catalisador em função do tempo reacional são apresentadas na Tabela 5.18. Conforme pode ser observado, o tipo de catalisador afetou acentuadamente a velocidade de reação. O catalisador bioquímico promoveu conversões mais elevadas em maior tempo reacional: 48 h para catalisar 98,9% do material lipídico da *M.*

aeruginosa NPCD-1 e 96 h para catalisar 87,17% do material lipídico da *Synechococcus* sp. PCC7942. Por outro lado, o catalisador químico forneceu conversão total do material lipídico da *M. aeruginosa* NPCD-1 e 94,12% do material lipídico da *Synechococcus* sp. PCC7942 em apenas 10 h de reação. Desta forma, a via química foi superior em termos de produtividade em relação à via bioquímica.

Tabela 5.18. Comparação do desempenho dos catalisadores heterogêneos na síntese de biodiesel a partir do material lipídico de cianobactérias pela rota etílica.

Matéria-prima	Catalisador	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)
Material lipídico de <i>M. aeruginosa</i> NPCD-1	Novozym® 435	48	98,09
	Nb ₂ O ₅ /Na	10	100
Material lipídico de <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	Novozym® 435	96	87,17
	Nb ₂ O ₅ /Na	10	94,12

Os resultados obtidos neste trabalho comprovaram a eficiência desses dois sistemas de catalisadores heterogêneos testados, ressaltando que eles podem substituir com sucesso os catalisadores homogêneos convencionais geralmente empregados na síntese de biodiesel. Além do mais, eles apresentam vantagens que merecem ser destacadas, tais como: redução significativa do número de etapas de purificação do biodiesel e podem ser reutilizados (reduzindo o custo operacional).

5.11. Propriedades das amostras de biodiesel obtidas

As propriedades do biocombustível devem ser analisadas de modo a verificar a qualidade do biodiesel, tais como: número de cetano, calor de combustão, viscosidade, ponto de névoa, ponto de fluidez, entre outras (KNOTHE et al., 2006). As quantidades de cada ácido graxo presente na molécula de triglicerídeo usada na transesterificação, bem como o comprimento da cadeia e o número de duplas e triplas ligações são fatores importantes para determinar as características físicas tanto da matéria-prima lipídica quanto do biodiesel obtido (RAMOS et al., 2009). Esta composição desempenha um papel importante em alguns parâmetros críticos do biodiesel, como o número de cetano e propriedades de fluxo a frio.

Estudos sobre a influência da composição de triglicerídeos na qualidade do biodiesel são escassos. Alguns autores relataram valores de viscosidade, densidade e ponto de névoa de duas amostras de biodiesel, produzidos a partir de óleo de soja e sebo bovino. O elevado ponto de turbidez de ambos foi um indicativo da elevada concentração de ésteres resultantes de ácidos graxos saturados. Estudos da estabilidade oxidativa do biodiesel em função da quantidade de ácido linolênico presente nas matérias-primas lipídicas utilizadas no processo e o emprego de blendas de biodiesel de pinhão manso e palma para avaliar suas propriedades físico-químicas, a fim de melhorar a estabilidade oxidativa também são relatados na literatura (RAMOS et al., 2009; FRANCISCO et al., 2010). A padronização do biodiesel é estabelecida por normas, dentre as quais se destacam: ASTM D6751 (Estados Unidos), EN 14214 (Europa) e ANP255 (Brasil).

As propriedades das amostras de biodiesel resultantes da transesterificação do material lipídico das linhagens de cianobactérias *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Synechococcus* sp. PCC7942 via catálise química heterogênea estão expressos na Tabela 5.19.

Conforme pode ser observado, o biodiesel resultante da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1 forneceu o valor de 59,5 para o índice de cetano similar ao dado obtido pelo biodiesel oriundo de óleo de palma (60,6). Esta similaridade está relacionada com o perfil de ácidos graxos de ambas as matérias-primas, que apresentam maiores porcentagens dos mesmos tipos de ácidos graxos. Por outro lado, o biodiesel resultante da biomassa de *Synechococcus* sp. PCC7942 apresentou um valor mais baixo de índice de cetano (51,3). Isso está relacionado com a composição dessa fonte de matéria-prima, que apresenta maior porcentagem de graxos insaturados, resultando em diminuição do índice de cetano.

Os valores obtidos para o índice de iodo e grau de insaturação confirmam as diferentes características de cada matéria-prima lipídica em função da composição em ácidos graxos. A biomassa lipídica de *M. aeruginosa* NPCD-1, que apresenta 50% de ácidos graxos saturados e 46%, aproximadamente, de ácidos graxos insaturados, resultou em índice de iodo de 57 e grau de insaturação de 60,7%. No entanto, a biomassa lipídica de *Synechococcus* sp. PCC7942, que apresenta em sua composição aproximadamente 30% de ácidos graxos saturados e 69% de ácidos graxos insaturados, resultou em valores mais elevados de índice de iodo e grau de insaturação (97,1 e 103,7%, respectivamente). Os valores de ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF), determinados com base na quantidade de ácidos graxos saturados de cadeia longa (a partir do C16) presente em cada matéria-prima lipídica, mostraram uma diferença significativa para ambas às amostras de biodiesel analisadas.

Tabela 5.19. Comparação das propriedades das amostras de biodiesel obtidas de diferentes linhagens de cianobactérias em relação ao óleo de palma.

Fonte de óleo	Teor de éster (%)	Índice de Cetano (IC)	Índice de Saponificação (IS)	Índice de Iodo (II)	Grau de insaturação (GI) %	Fator do comprimento da cadeia (FCC) %	Ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF) °C	Referência
<i>M. aeruginosa</i> NPCD-1	100	59,5	210	57,0	60,7	5,7	1,4	Este trabalho
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	94,1	51,3	203	97,1	103,7	5,2	-0,06	Este trabalho
<i>Aphanothece</i>	99,9	55,8	225	65,4	70,6	3,8	-4,6	
<i>Phormidium</i>	99,8	54,6	217	74,5	76,3	6,6	4,4	FRANCISCO et al., 2010
<i>Scenedesmus</i>	99,8	56,1	217	68,2	67,8	11,9	20,8	
Palma	99,9	60,6	208	53,0	58,6	6,58	4,2	Este trabalho
Palma	ND	62,0	199	52,0	ND	ND	ND	KRISNANGKURA, 1986

Os valores de ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF), determinados com base na quantidade de ácidos graxos saturados de cadeia longa (a partir do C16) presente em cada matéria-prima lipídica, foram similares para as amostras de biodiesel analisadas. O valor de PEFF está relacionado com a temperatura mínima na qual o biodiesel pode gerar entupimento e problemas pertinentes no motor. O biodiesel resultante da biomassa da linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 forneceu um valor de PEFF de 1,4°C, enquanto o resultante da biomassa da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7942 forneceu um valor de PEFF (-0,06°C). Esses valores favorecem o uso desses biocombustíveis em regiões com temperaturas climáticas mais baixas, e a similaridade entre eles pode ser explicada pelo fato da biomassa de *M. aeruginosa* NPCD-1 apresentar apenas 2,2% a mais de ácidos graxos saturados de cadeia longa (C16 e C18) em sua composição, quando comparada à de *Synechococcus* sp. PCC7942.

Do ponto de vista comparativo, os resultados obtidos neste trabalho apresentaram algumas características semelhantes ao biodiesel obtido por outras linhagens de cianobactérias estudadas por outros autores (FRANCISCO et al., 2010), conforme visualizado na Tabela 5.19. Os valores de índice de cetano obtidos foram 55,8, 54,6 e 56,1 para as amostras de biodiesel oriundo das linhagens de *Aphanothece*, *Phormidium* e *Scenedesmus*, respectivamente. Com relação ao índice de iodo e grau de insaturação, os valores encontrados foram próximos (65,4, 74,5 e 68,2 para o índice de iodo e 70,6, 76,3 e 67,8% para o grau de insaturação). Por outro lado, os valores obtidos de PEFF variaram muito para cada matéria-prima, na faixa de -4,6 a 20,8°C. O biodiesel da linhagem de *Aphanothece* forneceu o menor valor (-4,6°C), enquanto que o biodiesel da linhagem *Scenedesmus* forneceu o maior valor (20,8°C).

Os baixos valores de índices de cetano têm sido associados com maiores quantidades de ácidos graxos insaturados (C18:2 e C18:3) na matéria-prima. Além disso, o biodiesel resultante dessas matérias-primas apresentam elevados índices de iodo. Por outro lado, a estabilidade oxidativa diminui com o aumento do conteúdo de ésteres alquílicos oriundos de ácidos graxos poli-insaturados. O fator de entupimento de filtro a frio, é prejudicado por amostras de biodiesel oriundo de matérias-primas lipídicas com cadeias longas de ácidos graxos saturados. É válido ressaltar que o biodiesel que apresenta o melhor conjunto de propriedades globais é aquele decorrente de matérias-primas lipídicas com elevados teores de ácidos graxos monoinsaturados (em especial ácido oleico), tais como: amêndoa, colza, milho e óleo de girassol (RAMOS et al., 2009).

5.12. Comparação das características gerais das linhagens de cianobactérias testadas neste trabalho como fonte de matéria-prima lipídica

As cianobactérias já foram classificadas junto às microalgas devido à semelhança em seu aparato fotossintético. No entanto, estudos estruturais, bioquímicos e moleculares efetuados permitiram verificar a origem procariótica desses organismos e a semelhança de sua parede celular a de uma bactéria gram negativa (-). Desta forma, as cianobactérias são classificadas como pertencentes ao domínio Bacteria (organismos procariotos) enquanto as microalgas pertencem ao domínio Eucarya (organismos eucariotos). A única semelhança entre esses micro-organismos é a capacidade de realizar a fotossíntese oxigênica.

Levando em consideração a produção de biodiesel, as cianobactérias apresentam algumas vantagens perante as microalgas, dentre as quais merecem destaque especial: a facilidade de manipulação genética visando induzir a um aumento do teor de lipídeos, por se tratar de organismos procariotos; maior taxa de crescimento; são fixadoras de nitrogênio atmosférico; o envoltório celular é mais simples, facilitando a etapa de extração de lipídeos. Além disso, apresentam uma capacidade de conversão de energia solar em biomassa cinco vezes maior que as microalgas e dez vezes maior que o milho e a cana-de-açúcar. No entanto, a produtividade celular, teor de lipídeos e a composição química são fatores que podem variar de acordo com cada espécie estudada e principalmente em virtude das condições de cultivo.

Considerando esses aspectos, bem como as etapas envolvidas no processo de produção de biodiesel, incluindo desde a aquisição da linhagem, confirmação da atoxicidade, condições de cultivo, separação da biomassa celular, extração dos lipídeos e caracterização de seus constituintes até a obtenção do produto de interesse, elaborou-se a Tabela 5.20 que reúne as principais características das cianobactérias testadas neste trabalho, visando permitir uma comparação da potencialidade dessas biomassas lipídicas como fonte de matéria-prima de terceira geração para a obtenção de biocombustível.

Com relação à fonte de isolamento das linhagens, *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Trichormus* sp. CENA 77 apresentam vantagens, pois são isoladas no Brasil, sendo mais fáceis de adquirir, o que torna o custo do processo mais acessível. Quanto às características das células *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Synechococcus* sp. PCC7942 são unicelulares, facilitando a possibilidade de manipulação genética para indução de elevados teores de lipídeos.

Tabela 5.20. Quadro comparativo das propriedades das linhagens de cianobactérias testadas como fonte de matéria-prima lipídica neste trabalho

		Linhagem		
		<i>M. aeruginosa</i> NPCD-1	<i>Trichormus</i> sp. CENA 77	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942
Característica	Fonte de isolamento	Estação de tratamento de esgoto da Cidade de Deus-RJ	Campo de arroz inundado-SC	Água fresca, Califórnia-EUA
	Morfologia	Unicelular	Filamentosa	Unicelular
	Produção de toxinas	Não	Não	Não
Cultivo	Meio	ASM-1	BG-11	BG-11
	Intensidade de luz	100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
	Fonte de carbono inorgânico (Na_2CO_3)	Influência negativa	Influência positiva	Influência positiva
Biomassa celular	Separação	Centrifugação	Decantação/Filtração	Centrifugação
	Produtividade	46,9 mg/L/dia	286,5mg/L/dia	124,0 mg/L/dia
Extração de lipídeos	Ruptura celular	Fácil	Difícil	Fácil
	Teor de lipídeos	28,1%	14,5%	29,5%
	Produtividade lipídica	13,2 mg/L/dia	41,5 mg/L/dia	36,5 mg/L/dia
Óleo	Composição em ácidos graxos	Saturados (50%) Monoinsaturados (31%) Poli-insaturados (15%)	Saturados (44%) Monoinsaturados (39%) Poli-insaturados (16%)	Saturados (30%) Monoinsaturados (35%) Poli-insaturados (34%)
	Viscosidade (cP)	52,2	59,1	62,3
	Ácidos graxos livres (AGL)	ND	7,00%	ND
Transesterificação	Rendimento em ésteres de etila	98,1 a 100%	43,2 a 50%	87,1 a 94,1%

ND: Não determinado

São diversos os trabalhos relatados na literatura de modificação genética de linhagens de cianobactérias visando favorecer maior acúmulo de lipídeos pelas células, principalmente para a espécie *Synechocystis* sp. PCC6803 considerada como o modelo de estudo mais adequado em função do conhecimento disponível em termos de sequenciamento genético e propriedades bioquímicas (LIU et al., 2011).

Dentre o universo das 5 linhagens testadas, todas são classificadas como não produtoras de toxinas, conforme comprovado por testes moleculares e químicos. Destacando que esse é o primeiro passo que deve ser levado em consideração quando se deseja obter um produto a partir de cianobactérias, que são conhecidas como potenciais “produtoras de toxinas”. Esse critério merece destaque principal para tornar o processo viável e ambientalmente favorável.

Ao contrário do critério manipulação genética, no qual as linhagens unicelulares se destacam, a separação da biomassa celular é facilitada pelas linhagens filamentosas, como é o caso da *Trichormus* sp. CENA77. A facilidade do processo de separação da biomassa ao final da etapa de cultivo torna o processo mais viável economicamente, mais prático e de baixo custo. Além disso, linhagens filamentosas, como a *Trichormus* sp. CENA77 possuem células especializadas (heterócitos) que são fixadoras de nitrogênio, o que permite que o cultivo seja feito na ausência de nitrogênio.

As linhagens unicelulares apresentam outra vantagem perante as filamentosas, relacionadas à facilidade de ruptura celular para liberação dos lipídeos. Conforme constatado na etapa de extração dos lipídeos, a biomassa de *Trichormus* sp. CENA77 apresentou uma característica mais rígida de sua parede celular, dificultando a etapa de extração em comparação com as demais.

Os valores de produtividade lipídica mais elevados foram obtidos pelo cultivo das linhagens de *Trichormus* sp. CENA77 (41,5 mg lipídeo/L/dia) e *Synechococcus* sp. PCC7942 (36,5 mg lipídeo/L/dia). Apesar da produtividade lipídica da *M. aeruginosa* NPCD-1 ter se situado num patamar inferior (13,2 mg lipídeo/L/dia), as outras propriedades dessa biomassa lipídica forneceram condições mais propícias para obter amostras de biodiesel empregando tanto catalisador químico e bioquímico que atendem as especificações das normas estabelecidas pela ANP. O pior desempenho na síntese de biodiesel foi obtido pela biomassa lipídica oriunda do cultivo de *Trichormus* sp. CENA77, em função do elevado teor de acidez dessa matéria-prima. Testes adicionais são recomendados utilizando outros tipos de catalisadores, preferencialmente, de caráter ácido.

6. CONCLUSÕES

No âmbito de substituir as matérias-primas tradicionais utilizadas para a síntese de biodiesel, que comprometem o dilema atual entre a segurança alimentar e energética, o uso de micro-organismos fotossintéticos (microalgas e cianobactérias) tem sido preconizado como via alternativa aos óleos e gorduras que caracterizam os processos atuais de produção desse biocombustível. As vantagens dos micro-organismos fotossintéticos estão na sua maior velocidade de crescimento em relação às culturas oleaginosas e em seu teor de lipídeo, que em algumas espécies pode chegar a valores superiores a 50%. Apesar do potencial envolvendo as microalgas e cianobactérias, muitos desafios ainda precisam ser superados para tornar viável a aplicação desses micro-organismos para fins energéticos. São necessários desenvolvimentos nas mais diversas áreas, abordando os seguintes aspectos: seleção e melhoramento genético das espécies com maior eficiência fotossintética, desenvolvimento de sistemas de produção e de processos de colheita, extração e processamento dos lipídeos, bem como otimização das condições de síntese do produto alvo. Este trabalho teve como objetivo contribuir na geração de conhecimento nessa área de atuação, tendo como proposta a avaliação do óleo de cianobactérias como matéria-prima lipídica na síntese de biodiesel via catálise heterogênea. Foi efetuado um extenso trabalho experimental, partindo de um universo de cinco linhagens de cianobactérias mantidas no banco de cultura do CENA-USP. Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios e nesse conjunto de dados podem ser destacados que:

1. Dentre as cinco linhagens de cianobactérias testadas foram selecionadas as linhagens de *M. aeruginosa* NPCD-1; *Trichormus* sp. CENA77 e *Synechococcus* sp. PCC7942 por terem apresentado o melhor conjunto de características para serem empregadas como fonte de matéria-prima lipídica na síntese de biodiesel, incluindo os valores mais elevados de produtividade lipídica, além de apresentarem perfis de ácidos graxos similares ao de oleaginosas já empregadas com sucesso na síntese de biodiesel.
2. O estabelecimento das condições adequadas de cultivo foi efetuado por delineamentos fatorial verificando a influência da intensidade luminosa, concentração de nutrientes (fósforo e nitrogênio) e concentração de Na_2CO_3 como fonte de carbono inorgânico. Nas faixas de trabalho estudadas modelos matemáticos foram propostos que permitiram estabelecer condições otimizadas de cultivo nas quais a produtividade lipídica de cada linhagem foi significativamente incrementada chegando atingir produtividades 10 vezes

superior em relação aos dados obtidos nos testes iniciais de triagem das linhagens. O fator mais importante no incremento desta variável para todas as linhagens foi a intensidade luminosa. Com exceção da linhagem de *M. aeruginosa* NPCD-1 que sofreu inibição na presença de Na_2CO_3 , as outras duas linhagens responderam positivamente na presença dessa fonte de carbono inorgânico.

3. Os valores de produtividade lipídica mais elevados foram obtidos pelo cultivo das linhagens de *Trichormus* sp. CENA77 (41,5 mg lipídeo/L/dia) e *Synechococcus* sp. PCC7942 (36,5 mg lipídeo/L/dia). Apesar da produtividade lipídica da *M. aeruginosa* NPCD-1 ter se situado num patamar inferior (13,2 mg lipídeo/L/dia), outras propriedades dessa biomassa lipídica foram favoráveis para síntese de biodiesel.
4. O desempenho do catalisador químico (óxido de nióbio impregnado com Na) foi efetivo na síntese de biodiesel das matérias-primas lipídicas de cianobactérias, obtendo-se conversões superiores a 94% para os óleos de *Synechococcus* sp. PCC7942 e *M. aeruginosa* NPCD-1. Por outro lado, a elevada acidez do óleo extraído da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77 inibiu a ação do catalisador, sendo obtido rendimento máximo de 50%.
5. O desempenho do catalisador bioquímico foi também eficiente na catálise das matérias-primas das cianobactérias de *Synechococcus* sp. PCC7942 e *M. aeruginosa* NPCD-1, fornecendo rendimentos de transesterificação superiores a 87%. Nas condições testadas, a matéria-prima oriunda de *M. aeruginosa* NPCD-1 foi a mais adequada para a produção de biodiesel, alcançando a conversão máxima dos ácidos graxos em seus respectivos ésteres de etila em 48h de reação. A atuação do catalisador bioquímico foi limitada pela presença excessiva de pigmentos presentes em grande quantidade pela matéria-prima lipídica da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77, fornecendo uma conversão de 43,21%.
6. As amostras de biodiesel resultantes das biomassas de *Synechococcus* sp. PCC7942 e *M. aeruginosa* NPCD-1 foram caracterizadas quanto alguns parâmetros estimados por modelos teóricos, visando à predição da qualidade do biodiesel, tais como: número de cetano: 59,5 e 51,3; índice de saponificação: 210 e 203; índice de iodo: 57 e 97,1; grau de insaturação: 60,7 e 103,7; fator de comprimento da cadeia: 5,7 e 5,2 e ponto de entupimento de filtro a frio: 1,4 e -0,06, respectivamente para amostras de biodiesel de *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Synechococcus* sp. PCC7942.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em função dos promissores resultados obtidos neste trabalho e com o intuito de complementar esse estudo, recomenda-se:

- Cultivar as cianobactérias empregando gás enriquecido com CO₂ como fonte de carbono inorgânico.
- Testar outras formas de cultivo, tais como a utilização de fotobiorreatores e crescimento heterotrófico.
- Testar outros tipos de catalisadores, preferencialmente de caráter ácido para a síntese de biodiesel a partir da biomassa lipídica oriunda do cultivo de *Trichormus* sp. CENA77.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R.; FIORE, M.F.; FRANCO, M.W.; VENTRELLA, M.C.; LORENZI, A.S.; VANETTI, C.A.; ALFENAS, A.C. A novel epiphytic cyanobacterium species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. **Journal of Phycology**, v. 44, p. 1322-1334, 2008.
- AHMAD, A. L.; MAT YASIN, N. H.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 584-593, 2011.
- AKOH, C. C.; CHANG, S. W.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.22, p. 8995-9005, 2007.
- ALONSO, D. L.; BELARBI, E.-H.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; RODRÍGUEZ-RUIZ, J.; GRIMA, E. M. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 461-471, 2000.
- AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3402-3410, 2011.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th ed. Champaign: AOCS, 2004.
- ANDRADE, G. S. S. **Produção de biodiesel a partir de óleos vegetais usando células íntegras imobilizadas de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica (Glicerol Éster Hidrolase – E.C.3.1.1.3)**. 2012. 158p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.
- AN, J.; CARMICHAEL, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 32, p. 1495-507, 1994.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) Disponível em: <http://www.anp.gov.br/> Acesso em: 13 jun. 2012.
- APT, K.E.; COLLIER, J.L.; GROSSMAN, A.R. Evolution of the phycobiliproteins. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 248, p. 79-96, 1995.
- ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2070-2093, 2012.
- ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. A. Biodiesel separation and purification: a review. **Renewable Energy**, v. 36, p. 437-443, 2011.

BALASUBRAMANIAN, L.; SUBRAMANIAN, G.; NAZEER, T. T.; SIMPSON, H. S.; RAHUMAN, S. T.; RAJU, P. Cyanobacteria cultivation in industrial wastewaters and biodiesel production from their biomass: a review. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 59, p. 220-225, 2012.

BARKLEY, W. C. W.; LEWIN, R. A.; CHENG, L. In: **Development of Microalgal Systems for the Production of Liquid Fuels**. Villeneuve d'Ascq, France: Elsevier Applied Science, 1987.

BEARDALL, J.; YOUNG, E.; ROBERTS, S. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. **Aquatic Sciences**, n. 63, p. 44-69, 2001.

BECKER, K.; MAKKAR, D. H. P. S. *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel. **Lipid Technology**, v. 20, n. 5, p. 104-107, 2008.

BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y.B.; KUPPER, H.; KOLBER, Z.; BERGMAN, B.; FALKOWSKI, P. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. **Science**, Washington, v. 294, p. 1534-1447, 2001.

BIANCHI, G.; HOWARTH, O. W.; SAMEUL, C. J.; VLAHOV, G. Long range γ -inductive interactions through saturated C-C bonds in polymethylene chains. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 2**, p. 1427-1432, 1995.

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

BONEN, L.; DOOLITTLE, W.F. Ribosomal RNA homologies and the evolution of the filamentous blue-green bacteria. **Journal of Molecular Evolution**, v. 10, p. 283-291, 1978.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology: the Archaea and deeply branching and phototrophic Bacteria**. 2nd.ed. New York: Springer-Verlag, 2001. v. 1, 721 p.

BORGES, L. V. **Caracterização do potencial de absorção do dióxido de carbono atmosférico por microalgas utilizadas na aquicultura para a geração de um mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL)**. 57p. 2005. Dissertação (Mestrado) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2005.

BRANCO, L.H.Z.; HOFFMANN, L.; TEIXEIRA, J.P.; FERREIRA, V.; MORAIS FILHO, J.C. Aerophytic cyanoprokaryotes from the Atlantic rainforests region of São Paulo State, Brazil: Chroococcales and Oscillatoriales. **Cryptogamie Algologie**, Paris, v. 30, p. 135-152, 2009.

BRANDINI, F. **Biodiesel, a bola da vez**. Disponível em: http://www.oeco.com.br/index.php/frederico-brandini/50-frederico-brandini/17106-oeco_24021. Acesso em: 14 jan. 2011.

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

BRENNER, D.J.; STALEY, J.T.; KRIEG, N.R. Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ R.W. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 27-31.

BRETAS, R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2.ed. São Carlos: EdUFSCAR, 2005. 257p.

BRIGGS, M. Widescale Biodiesel Production from Algae. **Energy Bulletin**, October 3, 2004. Published in University of New Hampshire (US) Biodiesel Group.

BRUNSCHWIG, C.; MOUSSAVOU, W.; BLIN, J. Use of bioethanol for biodiesel production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 283-301, 2012.

BRYANT, D.A. Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.128, p.835-844, 1982.

BRYCE, T. A.; WELTI, D.; WALSBY, A. E.; NICHOLS, B. W. Monohexoside derivatives of long-chain polyhydroxy alcohols - novel class of glycolipid specific to heterocystous algae. **Phytochemistry**, v. 11, p. 295-302, 1972.

CAMPBELL, M. N. Biodiesel: Algae as a renewable source for liquid fuel. **Guelph Engineering Journal**, v. 1, p. 2-7, 2008.

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

CARVALHO, A. K. F. **Síntese de biodiesel por transesterificação pela rota etílica: Comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos**. 2011. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2011.

CARR, N.G.; WHITTON, B.A. **The biology of blue-green algae**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1973. 676 p.

CASTENHOLZ, R.W. The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs. 1. New Zealand and Iceland. **Journal of Phycology**, Baltimore, v.12, p.54-68, 1976.

CASTENHOLZ, R.W.; WATERBURY, J.B. Oxygenic photosynthetic bacteria, group 1, cyanobacteria. In: STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1989. p. 1710-1728.

CGEE. **Química Verde no Brasil 2010-2030**, Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), 2010.

CHEN, C-Y.; YEH, K-L.; AISYAH, R.; LEE, D-J.; CHANG, J-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 71-81, 2011.

CHENG, Y.; ZHOU, W.; GAO, C.; LAN, K.; GAO, Y.; WU, Q. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus L.*) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 777-781, 2009.

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

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

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

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, p. 21-34, 2004.

CHOUHAN, A. P. S.; SARMA, A. K. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4378-4399, 2011.

CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 264-272, 2005.

COHEN, Y.; JORGENSEN, B.B.; REVSBECK, N.P.; PAPLAWSKI, R. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.51, p.398-407, 1986.

CORDEIRO, C. S.; SILVA, F. R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 477-486, 2011.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, MILVIO.; CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 898-902, 2008.

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

DANTAS, M. B.; CONCEIÇÃO, M. M.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Avaliação da estabilidade térmica e reologia do biodiesel etílico e metílico obtido através da transesterificação do óleo de milho. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1., 2006, Brasília, DF.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5508-5516, 2010.

DAYANANDA, C.; SARADA, R.; USHA RANI, M.; SHAMALA, T. R. RAVISHANKAR, G. A. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, p. 87-93, 2007.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p. 146-156, 2004.

DE LA NOUE, J.; DE PAUW, N. The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 6, p. 725-770, 1988.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 2738-2749, 2010.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 163-170, 2011.

DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI, A.; PEREIRA, O. L.; DIAS, D. C. F. S.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S.; SOUSA, L. C. A.; OLIVEIRA, T. S.; PRETTI, L. A. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível. In: SEMINÁRIO DE BIODIESEL E PINHÃO MANSO, 2, Viçosa, MG, 2007, 40 p.

DOMINGOS, A. K. **Otimização da etanólise de óleo de *Raphanus sativus* L. e avaliação de sua estabilidade à oxidação.** 129p. 2005. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2005.

DOR, I.; DANIN, A. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. **Archiv für Hydrobiologie – Algological Studies**, Stuttgart, v. 83, p. 197-206, 1996.

ERNEST, A. Cyanobacterial picoplankton from Lake Constance. I. Isolation by fluorescence characteristics. **Journal of Plankton Research**, Oxford, v.13, p.1307-1312, 1991.

FAJARDO, A. R.; CERDAN, L. E.; MEDINA, A. R.; FERNANDEZ, F. G. A.; MORENO, P. A. G.; GRIMA, E. M. Lipid extraction from the microalga *Phaedactylum tricornutum*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 120-126, 2007.

FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 56, p.340-373, 1992.

FERREIRA, E. E.; BRANDAO, P. R. G.; KLEIN, B.; PERES, A. E. C. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. **Revista Escola de Minas**, v. 58, n. 1, p. 83-87, Jan./Mar, 2005.

FIGUEREDO, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N₂ por cianobactérias. In: FIGUEREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. **Microorganismos e Agrobiodiversidade**. Guaíba: Agrolivros, 2008. v. 1, p. 69-96.

FOGG, G.E.; STEWART, W.D.P.; FAY, P.; WALSBY, A.E. **The blue-green algae**. London: Academic Press, 1973. 459 p.

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

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

FREEDMAN, B.; BAGBY, M. O. Heats of combustion of fatty esters and triglycerides. **Journal American Oil Chemists Society**, v. 66, p. 1601-1605, 1989.

FREITAS, S. P.; SILVA F.C.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Efeito de enzimas hidrolíticas no comportamento reológico do óleo de palma cru. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 127-130, 1998.

FU, B.; VASUDEVAN, P. T. Effect of solvent-co-solvent mixtures on lipase-catalyzed transesterification of canola oil. **Energy Fuels** v. 24, p. 4646-4651, 2010.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n.5 pg 405-416, 2001.

FUNARI, E.; TESTAI, E. **Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure. Critical Reviews in Toxicology**. Disponível em: www.informaworld.com/smpp/titlecontent=t713401167. Acesso em: 3 Mar. 2011.

GALLON, J.R. Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. **New Phytologist**, Malden, v. 122, p. 571-609, 1992.

GLAZER, N.A. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.264, p.1-4, 1989.

GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel, **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1269-1284, 2011.

GOUVEIA, L.; MARQUES, A. E.; DA SILVA, T. L.; REIS, A. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 821-826, 2009.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 269-274, 2009.

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

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. In: 3rd CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR APPLIED PHYCOLOGY, 3., 2009. v. 21, p. 493-507.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNÁNDEZ, F. G.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

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, p. 1646-1653, 2008.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. **The Lipid Handbook**. 3rd.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 791p.

GUPTA, P. K. Cell and Molecular Biology. 3rd ed. In: Energy Conversions: Photosynthesis and Respiration. Nova Deli: Rastogi, 2008. p. 177-183.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, 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, p. 178-185, 2011.

HERNANDEZ, J. P.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. Co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Enzyme Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 190-198, 2006.

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

JUSTO, O. R.; PEREZ, V. H.; VIANA, C. O.; ALEGRE, R. M. Efeito da adição de precursores na produção de alcaloide anticancerígeno usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1394-1398, 2009.

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

KENYON, C. N.; RIPPKA, R.; STANIER, R. Y. Fatty-acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. **Archives of Microbiology**, v. 83, p. 216-236, 1972.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. **Phytochemical**, v. 67, p. 696-701, 2006.

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

KNOTHE, G., MATHEAUS, A. C., AND RYAN III, T. W. Cetane numbers of branched and straight chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel**, v. 82, p. 971-975, 2003.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. (2006). **Manual do Biodiesel**, São Paulo: Edgard Blucher.

KOBERG, M.; COHEN, M.; BEN-AMOTZ, A.; GEDANKEN, A. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4265-4269, 2011.

KOMÁREK, J. Problem of the taxonomic category “species” in cyanobacteria. **Archiv fur Hydrobiologie – Algological Studies**, Stuttgart, v.109, p.281-297, 2003.

KOMÁREK, J. (1992) **Diversity and modern classification of Cyanobacteria (Cyanoprokaryota)** Disponível em: <http://www.cyanodb.cz/> Acesso em: 20 jun. 2012.

KREITLOW, S.; MUNDT, S.; LINDEQUIST, U. Cyanobacteria – a potential source of new biologically active substances. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.70, p.61-63, 1999.

KRISNANGKURA, K. A Simple Method for Estimation of Cetane Index of Vegetable Oil Methyl Esters. **Journal American Oil Chemical Society**, v.63, n.4, p. 552-553, 1986.

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

KURMAYER, R.; DITTMAN, E.; FASTNER, J.; CHORUS, I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Mycrocystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). **Microbial Ecology**, v. 43, p.107-118, 2002.

LAI, J-Q.; HU, Z-L.; WANG, P-W.; YANG, Z. Enzymatic production of microalgal biodiesel in ionic liquid [BMIm][PF₆]. **Fuel**, v. 95, p. 329-333, 2012.

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

- LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 764-771, 2007.
- LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; CALERO, N. D. Biofuels from microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.
- LIANG, Y. N.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043-1049, 2009.
- LIU, X.; BRUNE, D.; VERMAAS, W.; CURTISS III, R. Production and secretion of fatty acids in genetically engineered cyanobacteria. **PNAS**, v. 108, n. 17, p. 6899-6904, 2011.
- LV, J-M.; CHENG, L-H.; XU, X-H.; ZHANG, L.; CHEN, H-L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6797-6804, 2010.
- MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 281-291, 2009.
- MANN, N.H.; CARR N.G. Photosynthetic prokaryotes. In: *Biotechnology Handbooks*. London: Plenum Press, 1992. 275p.
- MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300-1311, 2007.
- MARCILLA, A.; GÓMEZ-SIURANA, A.; GOMIS, C.; CHÁPULI, E.; CATALÁ, M. C.; VALDÉS, F. J. Characterization of microalgal species through TGA/FTIR analysis: Application to *nannochloropsis* sp. **Thermochimica Acta**, v. 484, p. 41-47, 2009.
- MARTÍN, E. H.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. **Bioresource Technology**, v.99, p.277-286, 2008.
- MASLOVA, I. P.; MOURADYAN, E. A.; LAPINA, S. S.; KLYACHKO-GURVICH, G. L.; LOS, D. A. Lipid fatty acid composition and thermophilicity of cyanobacteria. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, p. 353–360, 2004.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217–232, 2010.
- MEHER, L.C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification- A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.10, p. 248-268, 2006.
- MEINERZ, L. I. **Influência da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de água estuarina e costeira**. 76p. 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Aqüicultura, Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul-RS, 2007.

- MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R.; SILVA, E. C.; LIMA, G. E. S.; SILVA, L. L.; SERRA, T. M.; CAUDURO, F.; OLIVEIRA, L. G. Biodiesel from castor oil: A comparison of ethanolysis versus methanolysis. **Energy and Fuels**, v. 20, p. 2262-2265, 2006.
- MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.
- MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 841-846, 2006.
- MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 85-93, 2004.
- MIAO, X.; WU, Q.; YANG, C. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. **Journal of Analysis Applied Pyrolysis**, v. 71, p. 855-863, 2004.
- MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V. H.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy and Fuels**, v. 21, p. 3689-3694, 2007.
- MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Research**, v. 40, p. 2799-2815, 2006.
- MURATA, N.; NISHIDA, I. Lipids of blue-green algae (Cyanobacteria). In: **THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS**, v. 9, p. 315-347. Eds. P.K. Stumpf and E.E. Conn, New York: Academic Press, 1987.
- MUTANDA, T.; RAMESH, D.; KARTHIKEYAN, S.; KUMARI, S.; ANANDRAJ, A.; BUX, F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 57-70, 2011.
- NAGLE, N.; LEMKE, P. Production of methyl ester fuel from microalgae. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24/25, p. 355-361, 1990.
- NOBLES JR, D. R.; BROWN JR, R. M. Transgenic expression of *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53582 cellulose synthase genes in the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* strain UTCC 100. **Cellulose**, v. 15, p. 691-701, 2008.
- OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 7-18, 2008.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.
- OLIVER, R.L.; GANF, G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The Ecology of Cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 149-194.

PAIVA, E. J. M. **Estudo da produção de biodiesel a partir de óleo de babaçu e etanol utilizando a transesterificação alcalina tradicional com agitação mecânica e assistida por ultrassons**. 2010. 173 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

PENTEADO, D. M. R. **Estudos de otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para produção de lipídios**. 2010. 114 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba/PR, 2010.

PETKOV, G.; IVANOVA, A.; ILIEV, I.; VASEVA, I. A critical look at the microalgae biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, p. 103-111, 2012.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; MICHELLE, J. C. R.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, B. A. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p.1313-1330, 2005.

PIORRECK, M.; POHL, P. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue-green algae during one growth phase. **Phytochemistry**, v. 23, p. 217-223, 1984.

PORPHY, S. J.; FARID, M. M. Feasibility study for production of biofuel and chemicals from marine microalgae *Nannochloropsis sp.* based on basic mass and energy analysis. **Renewable Energy**, doi:10.5402/2012/156824, v. 2012, ID 156824, 11 p., 2012.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 287-293, 2001.

RAI, A.N. Cyanobacterial fungal symbiosis: The cyanolichens. In: CRC handbook of symbiotic cyanobacteria. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 9-41.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Bioteecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 261-268, 2009.

RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, p. 195-214, 2002.

RITTMANN, B. E. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v.100, n.2, p. 203-212, 2008.

ROCHA, M.; DE FREITAS, R. C. Metrôpoles mais limpas. **Revista Biodieselbr**, n. 13, outubro/novembro 2009.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. 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.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas, SP: Editora Casa do Pão, 2005. 326p.

RODRIGUES, F. Pequenas Notáveis. **Revista Biodieselbr**, n. 6, agosto/setembro 2008.

ROSS, A. B.; JONES, J. M.; KUBACKI, M. L.; BRIDGEMAN T. Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behavior. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6494-6504, 2008.

SAHA, S. K.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 263-272, 2003.

SAMORÌ, C.; TORRI, C.; SAMORÌ, G.; FABBRI, D.; GALLETTI, P.; GUERRINI, F.; PISTOCCHI, R.; TAGLIAVINI, E. Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3274-3279, 2010.

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGUNG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Research**, v. 1, p. 20-43, 2008.

SCHOPF, J. W. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. **Nova Hedwigia**, v.112, p.13-32, 1996.

SCHOPF, W. Disparate rates, differing fates: Tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.91, p.6735-6742, 1994.

SCHUCHARDT, U.; SERCHEL, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: A review. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 1-10, 2010.

SHARATHCHANDRA, K.; RAJASHEKHAR, M. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 2, p. 83-97, 2011.

SHARMA, K. K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P. M. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. **Energies**, v. 5, p. 1532-1553, 2012.

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**. [S.L.]: National Renewable Energy Laboratory, 1998, 328 p.

SHEEHAN, J. Engineering direct conversion of CO₂ to biofuel. **News and Views**, v. 27, n. 12, p. 1128-1129, 2009.

SHI, J.; PODOLA, B.; MELKONIAN, M. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 417-423, 2007.

SILVA-STENICO, M. E.; SILVA, C. S. P.; LORENZI, A. S.; SHISHIDO, T. K.; ETCHEGARAY A.; LIRA, S. P.; MORAES, L. A. B.; FIORE, M. F. Non-ribosomal peptides produced by brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological Research**, v. 166, p. 161-175, 2011.

SILVA, G. A. M.; DA RÓS, P. C. M.; SOUZA, L. T. A.; COSTA, A. P. O.; DE CASTRO, H. F. Physico-chemical, spectroscopical and thermal characterization of biodiesel obtained by enzymatic route as a tool to select the most efficient immobilized lipase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 39-47, 2012.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric identification of organic compounds**. 6th ed. New York: Wiley, 1998.

SIRON, R.; GIUSTI, G.; BERLAND, B. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Marine Ecology Progress Series**, v. 55, p. 95-100, 1989.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water. **A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p.41-111.

SKULBERG, O.M. Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. In: YÜRÜM, Y. (Ed.). **Hydrogen energy system: production and utilization of hydrogen and future aspects**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 95-110, 1995.

SMITH, V. H.; STURM, B. S. M.; DENOYELLES, F. J.; BILLINGS, S. A. The ecology of algal biodiesel production. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 5, p. 301-309, 2009.

SMITH, V.H. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. **Science**, Washington, v. 221, p. 669-671, 1983.

SOARES, I. P.; REZENDE, T. F.; SILVA, R. C.; CASTRO, E. V. R.; FORTES, I. C. P. Multivariate calibration by variable selection for blends of raw soybean oil / biodiesel from different sources using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) spectra data. **Energy Fuels**, v. 22, p. 2079-2083, 2008.

SOARES, I. P.; REZENDE, T. F.; PEREIRA, R. C. C. ; SANTOS, C. G.; FORTES, I. C. P. Determination of biodiesel adulteration with raw vegetable oil from ATR-FTIR data using chemometric tools. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, 1229-1235, 2011.

SQUIZATO, R. Fugindo da soja. **Revista Biodieselbr**, n. 5, junho/julho 2008.

STAL, L. J. Physiological ecology of Cyanobacteria in microbial mats and other communities. **New Phytologist**, Malden, v. 131, n. 1, p. 1-32, 1995.

STAL, L.J.; MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p.179-211, 1997.

STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p.225-274, 1977.

STANIER, R.Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 35, p. 171-205, 1971.

STANIER, R.Y.; SISTROM, W.R.; HANSEN, T.A.; WHITTON, B.A.; CASTENHOLZ, R.W.; PFENNING, N.; GORLENKO, V.N.; KONDRATIEVA, E.N.; EIMHJELLEN, K.E.; WHITTENBURY, R.; GHERNA, R.L.; TRUPER, H.G. Proposal to place nomenclature of Cyanobacteria (Blue-green-algae) under rules of International Code of Nomenclature of Bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.28, p.335-336, 1978.

STENROOS, S.; HÖNABRA, F.; MYLLYS, L.; HYVÖNEN, J.; THELL, A. High selectivity in symbiotic associations of lichenized ascomycetes and cyanobacteria. **Cladistics**, Oxford, v.22, p.230-238, 2006.

STEWART, R. Oxidation by permanganate. In: WIBERG, K. (Ed.) **Oxidation in organic chemistry**. New York: Academic Press, 1973.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, p. 667-676, 2007.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: Desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A. H.; HAIK, Y.; FARID, M. M.; A review of enzymatic transesterification of microalgal oil-based biodiesel using supercritical technology, **Enzyme Research**, v. 2011, ID 468292, 25 p., 2011. doi:10.4061/2011/468292. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/er/2011>. Acesso em: 12 de jun. 2012.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TANG, H.; WANG, A.; SALLEY, S. O.; SIMON, K. Y. N. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 373-382, 2008.

TANABE, K. Catalytic application of niobium compounds. **Catalysis Today**, v.78, p. 5-77, 2003.

TEIXEIRA, C. M. L. L.; MORALES, E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL. 1, 2006., Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2006, p. 91-96.

THIEL, T.; WOLK, C. P. Metabolic activities of isolated akinetes of the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 156, p. 369–74, 1983.

TRAN, D-T.; YEH, K-L.; CHEN, C-L.; CHANG, J-S. Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia* lipase. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 119-127, 2012.

UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.; HOADLEY, A. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels, **Journal of Renewable Sustainable Energy**, v. 2, p. 012701, 2010.

URIESTE, D. CASTRO, M. A. B., BIAGGIO, F. C., CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de métodos para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, n.2, p. 407-412, 2008.

VAN APELDOORN, M. E.; VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A.; BAKKER, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.51, p.7-60, 2007.

VASUDEVAN, P. T. BRIGGS, M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 421-430, 2008.

VERMA, N. M.; MEHROTRA, SHAKTI.; SHUKLA, A.; MISHRA, B. N. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 10, p. 1402-1411, 2010.

VERMAAS, W. Gene modifications and mutation mapping to study the function of photosystem II. **Methods in Enzymology**, v. 297, p. 293-310, 1988.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 297-305, 2004.

VIMALARASAN, A.; PRATHEEBA, N.; ASHOKKUMAR, B.; SIVAKUMAR, N.; VARALAKSHMI, P. Production of biodiesel from cyanobacteria (*Oscillatoria annae*) by alkali and enzyme mediated transesterification. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 70, p. 959-967, 2011.

WAHLEN, B. D.; WILLIS, R. M.; SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2724-2730, 2011.

WALTER, T. L.; PURTON, S.; BECKER, D. K.; COLLET, C. Microalgae as bioreactors. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 629–641, 2005.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. 669 p.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C.-C.; JU, Y.-H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 1, p. 13-20, 2009.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 201–218, 2005.

WILLIAMS, P. J. B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v. 3, p. 554-590, 2010.

WILMOTTE, A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. (Ed.). **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer, 1994. P. 1-25.

WILMOTTE, A.; GOLUBIĆ, S. Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. **Archiv fur Hydrobiologie – Algological Studies**, Stuttgart, v.64, p.1-24, 1991.

WOESE, C.R.; SOGIN, M.L.; BONEN, L.; STAHL, D. Sequence studies on 16S ribosomal RNA from blue-green alga. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.4, p.307-315, 1975.

WUST, E. **Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau – FURB. Blumenau-SC, 2004.

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

YOO, C.; JUN, S. Y.; LEE, J. Y.; AHN, C. Y.; OH, H. M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, p. S71-S74, 2010.

APÊNDICE

Apêndice A.1—Meio de cultivo ASM-1

Composição química	Quantidade (g)	
NaNO ₃	1,70	
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	<i>Solução Estoque A</i>
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29	
K ₂ HPO ₄	0,87	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1,78	<i>Solução Estoque B</i>
H ₃ BO ₃	2,48	
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39	
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08	
ZnCl ₂	0,335	<i>Solução Estoque C</i>
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019	
CuCl ₂	0,0014	
EDTA.Na ₂	1,86	<i>Solução Estoque D</i>

Apêndice A.2—Meio de cultivo BG-11

Componentes	Concentração estoque (g/L)	Quantidade por litro	Concentração final no meio (g/L)
NaNO ₃	150	10 mL	1,5
K ₂ HPO ₄	40	1 mL	0,04
MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1 mL	0,075
CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1 mL	0,036
Ácido cítrico	6	1 mL	0,006
Citrato de amônio férrico	6	1 mL	0,006
Na ₂ EDTA	1	1 mL	0,001
Micronutrientes*	-	1 mL	-
Carbonato de sódio	20	1 mL	0,02

Apêndice A.3—Meio de cultivo SWBG-11

O meio de cultura SWBG-11 é semelhante ao meio BG-11, descrito no Apêndice A.2, porém adaptado às condições de água do mar, preparando-se uma água salgada artificial com as seguintes soluções: NaCl (12,5 g/L), MgCl₂.6H₂O (1,0 g/L) e KCl (0,25 g/L).

Apêndice B.1—Análises de toxicidade das linhagens

Sabe-se que cianobactérias são conhecidas por serem produtoras de toxinas, no entanto, apesar de possuírem os genes de toxinas, elas podem não expressá-los dependendo da condição de cultivo ou ambiental. Por outro lado, se elas possuírem os genes, em algum momento elas poderão produzir toxinas. Desta forma, foi necessário fazer uma busca dos genes envolvidos na síntese da microcistina por métodos moleculares e confirmar ausência desses compostos por testes de espectrometria de massa. Sendo assim, testes foram feitos para confirmar atoxidade das linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Trichormus* sp. CENA77.

Apêndice B.2—Análises moleculares

Para a extração de DNA genômico das culturas puras de cianobactérias, uma suspensão de 1,5 mL de células na fase de crescimento exponencial foi coletada e concentrada através de centrifugação a 13.000 rpm, durante 8 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete contendo as células de cianobactérias foi usado para extrair o DNA genômico de acordo com protocolo descrito por Fiore et al., 2000, conforme a seguir. Três mililitros (mL) de cultura na fase de crescimento exponencial foram concentrados (13.000 rpm, 5 min, 20°C) em centrífuga (Hettich, modelo Universal 320 R, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o pélete foi lavado duas vezes com 1 mL de solução I (50 mM Tris HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 50 mM NaCl). O pélete foi ressuspendido em 200 µL de solução II (50 mM Tris HCl pH 8,0; 50 mM EDTA) e 2 µL de Proteínase K (200 µg mL⁻¹) foram acrescentados. Após 10 min em banho-maria à 55°C, 600 µL de tampão de extração preparado na hora foram acrescentados [em 10 mL de solução: 3,0 mL de CTAB 10%; 2,8 mL de NaCl 5 M; 0,4 mL de EDTA 0,5 M; 1,0 mL de Tris-HCl pH 8,0 1 M; 1,0 mL de sarcosyl 10%; 100 µL de β-mercaptoetanol; 1,7 mL de água ultrapura esterilizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA)]. Após 30 min em banho-maria à 55 °C, com agitação por inversão a cada 5 min, esperou-se esfriar por 30 s e acrescentou-se 800 µL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1). O microtubo foi invertido trinta vezes e centrifugado (13.000 rpm, 5 min, 20 °C). Transferiu-se 500 µL para um novo tubo e adicionou-se 2 volumes de NaCl 4 M e 50 µL de suspensão de sílica, misturando gentilmente. As amostras foram incubadas em banho-maria (55 °C, 10 min) e depois centrifugadas (10.000 rpm, 30 s, 20 °C) e o sobrenadante descartado. O pélete foi lavado duas vezes com 250 µL de solução de lavagem (em 200 mL: 2,0 mL de NaCl 5 M,

2,0 mL de Tris-HCl 1 M pH 7,5, 1,0 mL de EDTA 0,5 M, 100 mL de etanol). O pélete foi seco à 40 °C em bloco de aquecimento (LabLine Instruments, Illinois, IL, EUA) e reidratado com 30 µL de água ultrapura esterilizada. Após incubado em banho-maria (45 °C, 10 min) foi centrifugado (10.000 rpm, 1 min, 20 °C) e o sobrenadante transferido para novo e esterilizado microtubo. A integridade do DNA extraído foi verificada aplicando alíquotas contendo 5 µL do produto extraído acrescidos de tampão de carregamento (0,4 g mL⁻¹ de sacarose e azul de bromofenol 0,25%) contendo SYBR[®] Green I (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) em gel de agarose 1,0% após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X (1 X TBE: 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0). A documentação do gel foi feita usando o fotodocumentador “Kodak Gel logic 212 – Molecular Imaging Software, v. 5,0” (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA). A verificação do tamanho dos produtos de PCR foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA Lambda DNA/EcoRI + Hind III (Promega, Madison, EUA). O material foi armazenado a -20 °C.

Apêndice B.3—Amplificação por PCR do domínio NMT do gene de microcistinas sintetase (*mcyA*)

A tentativa de amplificação por PCR de sequências de nucleotídeos da região do domínio da NMT, pertencente ao gene *mcyA* das microcistinas sintetases foi realizada utilizando os seguintes conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores: MSF (5'-ATCCAGCAGTTGAGCAAGC-3') e MSR (5'-TGCAGATAACTCCGCAGTTG-3') (TILLET; PARKER; NEILAN, 2001). A reação da PCR continha: tampão para a reação PCR 1 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em um termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, Inglaterra) em gradiente de temperatura de anelamento: 94°C/4 min; 30 ciclos 94°C/10 s, (50; 50,6; 51,6; 52,7; 53,5; 54,5; 55,3; 56,9; 58,9; 60,0, 60,1°C)/30 s, 72°C/1 min; extensão final a 72°C/7min. Como controle positivo utilizou-se cultura pura de *Mycrocistis panniformis* SPC702, produtora de microcistina.

Apêndice B.4—Análises químicas

As células liofilizadas (200mg) foram extraídas em metanol 100% usando pérolas de vidro (ϕ 3 mm). A suspensão foi agitada por 1 min e em seguida centrifugada a 9000 rpm a 4°C. O sobrenadante então foi coletado e evaporado. O extrato seco foi dissolvido em água destilada estéril (10 mL), aplicada em um cartucho C₁₈ (SepPak) (Applied Separation, Allentown, PA, USA) pré-condicionado. O cartucho foi lavado com água (2 × 10 mL) e os cianopeptídeos foram eluídos em metanol 70%.

Processo de extração de cianopeptídeos. A) Cultura de *M. aeruginosa* NPCD-1 (8 L); B) Rompimento celular com metanol; C) Extrato metanólico.

A partir de extratos celulares, foi realizada análise em LC-MS/MS (Agilent 6410 MS controlado pelo programa Agilent MassHunter) do Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP, utilizando inserção direta em modo MRM permitindo a identificação dos cianopeptídeos. A voltagem do cone foi de 50 V e detector em modo positivo. A varredura dos íons foi de 100 a 1.700 Da. A energia de colisão utilizada foi de 60 eV.

Apêndice B.5—Resultados obtidos e confirmação da atoxicidade das linhagens

As extrações de DNA genômico das culturas puras de cianobactérias foram realizadas com sucesso usando o protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP visando à obtenção de DNA de todos os gêneros deste grupo de organismos conhecidos até o momento (FIORE et al., 2000).

As tentativas de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) da sequência do domínio único da *N*-metiltransferase (NMT) do gene *mcyA*, usando DNA extraído das linhagens foram realizadas em gradiente de temperatura. A linhagem *Microcystis panniformis* SPC702 foi utilizada como controle positivo, por ser uma

linhagem conhecida pela produção de microcistinas. Após a corrida eletroforética, foi observado que o tamanho esperado de 1.300 pares de bases para o conjunto de iniciadores MSF/MSR foi obtido para o controle positivo, mas para as duas linhagens investigadas não foi possível obter amplificação. A ausência do fragmento de interesse sugere a ausência do gene envolvido na síntese de microcistinas. É importante destacar, que a metodologia de PCR (reação em cadeia da polimerase) é uma técnica molecular que se baseia na amplificação exponencial seletiva com o objetivo de produzir uma quantidade apreciável de um segmento específico de DNA a partir de uma quantidade mínima. A amplificação é controlada por enzimas, obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse. Utiliza-se um iniciador específico (sequência de gene conservada e conhecida) e esse iniciador vai se ligar ao fragmento de gene correspondente no DNA do organismo estudado, posteriormente a enzima (TaqDNA polimerase) faz a leitura do DNA molde e insere nucleotídeos complementares a este molde. Quando não ocorre a amplificação do gene uma das possibilidades pode ser devido ao não reconhecimento do iniciador pelo gene de interesse, ou seja, o DNA molde pode não possuir o gene. Como nas linhagens estudadas não foi possível obter o fragmento de interesse, pode-se inferir que *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Trichormus* sp. CENA77 não possuem o gene *mcyA* envolvido na síntese da microcistina.

Outra análise química que confirmou a ausência de toxinas pelas linhagens estudadas foi à espectrometria de massas. O espectrômetro de massas determina a relação massa/carga dos fragmentos iônicos obtidos por um processo de ionização da amostra. Os íons são coletados e analisados por um programa específico. Desta forma, ao conhecer a massa do composto que se deseja encontrar, pode-se buscá-lo no extrato obtido do organismo em estudo. Ao encontrar a massa/carga correspondente ao composto de interesse, deve-se fragmentá-lo para confirmar o resultado obtido. Muitos compostos químicos, apesar de apresentarem estruturas químicas diferentes, podem apresentar a mesma massa molecular. O processo de fragmentação pelo espectrômetro de massas consiste em quebra da molécula e por ionização detecta-se a massa/carga dos fragmentos gerados. Quando se conhece a estrutura da molécula em estudo, podem-se reconhecer os fragmentos como componentes da estrutura em questão.

Nos extratos de cianobactérias analisados (*M. aeruginosa* NPCD-1 e *Trichormus* sp. CENA77) por espectrometria de massas, não foram detectados picos de massa protonada correspondente às massas de toxinas conhecidas produzidas por cianobactérias. O Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP possui uma

biblioteca de produtos naturais com mais de 800 substâncias conhecidas produzidas por cianobactérias. Os espectros gerados pelos extratos de *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Trichormus* sp. CENA77 foram comparados às massas protonadas de toxinas produzidas por cianobactérias que estão contidas nessa biblioteca e não foi constatado semelhança com nenhuma das toxinas. Em nenhum dos extratos investigados foi observado a presença desses compostos.

Espectro obtido em LC-MS do extrato intracelular de *Trichormus* sp. CENA77 obtido por extração em metanol em m/z de 50 a 2000.

Na estrutura de uma microcistina, o β -aminoácido hidrofóbico incomum “3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico”, conhecido como “Adda” (m/z 135) está sempre presente em todas as variantes e é o responsável pela toxicidade dessa molécula. A análise por espectrometria de massas no modo MRM permite buscar o fragmento do composto por meio da sua massa/carga, que no caso do Adda é m/z 135. A busca desse íon permite relacionar sua presença à massa do composto (variante da microcistina) que contém esse fragmento.

No caso da *Trichormus* sp. CENA77 foi utilizado o modo MRM para buscar todas as moléculas que continham o m/z 135 e o pico de massa protonada 938 e 774 foram encontrados, o que indica a possibilidade dessas duas substâncias possuírem o íon m/z 135. Sendo assim, esses dois picos foram ainda fragmentados para confirmação, na tentativa de encontrar a estrutura da microcistina.

A observação dos espectros indica que os picos m/z 135 correspondentes ao aminoácido Adda, responsável pela toxicidade das microcistinas, não foram detectados e, além disso, verifica-se a ausência de outras estruturas comuns em microcistinas.

Espectro obtido no modo MRM para m/z 135 do extrato metanólico de *Trichormus* sp. CENA77.

Fragmentação por LC-MS/MS do pico de massa 938 $[M+H]^+$ de *Trichormus* sp. CENA77.

Fragmentação por LC-MS/MS do pico de massa 774 $[M+H]^+$ de *Trichormus* sp. CENA77.

Para a linhagem *M. aeruginosa* NPCD-1 o espectro obtido também não apresentou moléculas relacionadas à toxicidade, ou seja, não foi identificada no espectro a massa protonada das variantes de microcistinas conhecidas. Esses resultados confirmam a atoxicidade das linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1 e *Trichormus* sp. CENA77.

Espectro obtido em LC-MS do extrato intracelular de *M. aeruginosa* NPCD-1 obtido por extração em metanol em m/z de 50 a 2000.

FIORE, M. F.; MOON, D. H.; TSAI, S. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 39, p. 159-169, 2000.

Apêndice C—Índice de acidez da matéria-prima lipídica oriunda da biomassa *Trichormus* sp. CENA77

O índice de acidez da matéria-prima lipídica oriunda da biomassa de *Trichormus* sp. CENA77 foi determinado de acordo com as normas estabelecidas pela AOCS, 2004. O resultado foi calculado através da relação entre a massa em miligramas de hidróxido de potássio consumidos por grama de amostra analisada. As Equações (a, b) mostram como foram calculados o índice de acidez e o teor de ácidos graxos livres, respectivamente.

$$I.A. = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{base} \times C_{base}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação (a)}$$

$$\% AGL = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{ácido\ graxo} \times C_{base} \times 1000}{m_{amostra}} \quad \text{Equação (b)}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL), MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1g/mol), C_{base} = Concentração molar da solução de KOH (mol/L), $MM_{ácido\ graxo}$ = Massa Molar do ácido oléico (282 g/mol), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. AOCS Press, 5th Edition, 2004.