

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

SAVIENNE MARIA FIORENTINI ELERBROCK ZORN

Líquens artificiais e a integração de produtos de alto valor agregado a uma
biorrefinaria

Lorena
2022

SAVIENNE MARIA FIORENTINI ELERBROCK ZORN

**Líquens artificiais e a integração de produtos de alto valor agregado a uma
biorrefinaria**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de concentração de Processos Catalíticos e Biocatalíticos.

Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva.

Versão Original

Lorena

2022

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Zorn, Savienne Maria Fiorentini Elerbrock
Liquens artificiais e a integração de produtos de
alto valor agregado a uma biorrefinaria / Savienne
Maria Fiorentini Elerbrock Zorn; orientador Messias
Borges Silva - Versão Original. - Lorena, 2022.
136 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química na Área de
Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
2022

1. *Chlorella vulgaris*. 2. *Scenedesmus obliquus*.
3. *Mucor circinelloides*. 4. Biolubrificante. 5.
Biodiesel. I. Título. II. Silva, Messias Borges ,
orient.

Dedico este trabalho aos meus pais Sonia e Otto (*in memoriam*), ao meu marido Hans Werner e aos meus filhos Gustav, Sophie e Nicolas.

Aos meus amados pais, por tudo que me ensinaram, ao meu marido e filhos pelo apoio, carinho e paciência durante todos os anos do doutoramento.

À Professora Heizir (*in memoriam*), pela preciosa orientação (até dezembro de 2020), a qual foi o alicerce para esta Tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, e à minha querida tia e primeira professora, Icléa, por tudo que deles recebi e com eles aprendi.

Ao meu marido, por sempre me apoiar e ajudar em tudo. Aos meus três filhos pela paciência, carinho e incentivo.

Ao Prof. Dr. Messias Borges Silva, que assumiu minha orientação a partir de dezembro de 2020, após o falecimento da Professora Heizir, até o presente. Professor Messias é uma inspiração como mestre e ser humano, grande conhecedor e incentivador de novas ferramentas do ensino e da pesquisa em engenharia, para registrar aqui o mínimo.

À Professora Heizir, que me acompanhou desde o início, em fevereiro de 2018, até dezembro de 2020, *in memoriam* a minha mais profunda gratidão e reconhecimento.

Às professoras Dr^{as}. Patrícia Caroline Molgero Da Rós e Larissa de Freitas, pelos ensinamentos, preciosos conselhos e orientações.

Aos amigos e companheiros de jornada dos laboratórios de biocatálise e de microalgas, Cristiano Eduardo Rodrigues Reis, Ana Karine Furtado de Carvalho, Heitor Buzetti Simões Bento, Guilherme Arantes Pedro, Matheus Casagrande, Amanda Bahia, Ana Paula da Silva, por todo apoio, companheirismo e ensinamentos. Pelos momentos de descontração e apoio mútuo, que nos uniram e nos fortaleceram na conquista de nossos objetivos!

À secretária do Programa de pós-graduação, Ana Beatriz de Carvalho Lourenço, por toda atenção, carinho e constantes orientações sobre o programa.

A todos os funcionários do DEQUI e CPG pelo constante apoio. À equipe das Bibliotecas (Campus I e II), pelas preciosas orientações e correções do trabalho escrito.

Às agências de fomento à pesquisa, CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro, que foi de suma importância para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Oceanografia da USP, em específico à equipe do Banco de Microrganismos Aidar e Kutner (BMAK), pela valiosa doação das cepas de microalgas e todo apoio técnico.

A todos que contribuíram para que este trabalho se concretizasse, profunda gratidão!

RESUMO

ZORN, S. M. F. E. **Líquens artificiais e a integração de produtos de alto valor agregado a uma biorrefinaria.** 2022. 136p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Consórcios microbianos representam uma alternativa limpa à colheita de células, bem como à geração de bioprodutos de alto valor agregado. Neste sentido, o presente trabalho avaliou a formação de líquens artificiais por duas espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris* BMAK 007 e *Scenedesmus obliquus* CCCMA-UFSCar604) e uma espécie de fungo filamentososo (*Mucor circinelloides* f. *griseo-cyanus* URM 4182). Na primeira etapa da pesquisa foram avaliadas quatro estratégias distintas de liquenização entre a espécie *C. vulgaris*, considerada microalga modelo, e o fungo filamentososo, em cocultivos efetuados em *shaker* orbital. A melhor condição resultou em um líquen artificial composto por 79% de biomassa da microalga e eficiência de recuperação de células de 99,5%. Na segunda etapa da pesquisa, reaplicou-se a estratégia de melhores resultados para a espécie *S. obliquus* e o fungo filamentososo. Estudou-se o efeito da suplementação do meio de cultivo da microalga com melaço de cana-de-açúcar (MC) sobre o aumento da biomassa e de lipídios. Resultados de cultivos com meio suplementado por MC demonstraram que as biomassas da microalga e do respectivo consórcio microbiano duplicaram em comparação com os cultivos sem suplementação e o acúmulo de lipídios na biomassa aumentou em 1,5 vezes. Ademais, a eficiência de recuperação de células manteve-se em 99,7%, com contribuição de 80% de biomassa de algas na composição do líquen, conteúdo lipídico do consórcio alga:fungo igual a 38,2% em peso, e composição em ácidos graxos balanceada (52,7% de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, 47,4% de ácidos graxos poli-insaturados). Na etapa final da pesquisa foram realizados cocultivos em mesa agitadora orbital, empregando maiores volumes de meio de cultivo, bem como, maior quantidade de células e de micélios fúngicos. Os experimentos de liquenização neste equipamento tiveram como principal objetivo, produzir maior quantidade de biomassa, possibilitando sua caracterização e utilização para a síntese de bioprodutos. As concentrações obtidas em biomassa seca de líquens foram em média 2,71 g/L, o dobro, em comparação à biomassa cultivada em *shaker* orbital (1,27 g/L). O conteúdo lipídico dos líquens formados foi de $32,0 \pm 0,4\%$, e a contribuição média em biomassa de algas nos líquens foi de $61 \pm 2,1\%$. A biomassa de líquens foi caracterizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e espectroscopia na região de infravermelho por transformada de Fourier por refletância total atenuada (ATR-FTIR). A biomassa oleaginosa foi aplicada para as sínteses de biolubrificante e biodiesel: para o biolubrificante utilizou-se óleo fúsel simulado como receptor acila; para o biodiesel, etanol como solvente e reagente. Os respectivos resultados foram obtidos, em teores de ésteres: 96,8% para biolubrificante e 98,8% para biodiesel. Com base na composição em ácidos graxos do óleo extraído da biomassa liquenizada, as seguintes propriedades para o biodiesel foram estimadas: número de cetano, índice de iodo, estabilidade à oxidação, massa específica, e viscosidade cinemática. Os resultados demonstraram que os líquens artificiais podem ser uma alternativa eficiente de biorremediação e colheita de células de baixo custo, além de fornecer uma biomassa oleaginosa para várias aplicações industriais, portanto, contém um potencial biotecnológico muito interessante a ser explorado em biorrefinarias.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Mucor circinelloides*, melaço de cana-de-açúcar, óleo fúsel simulado, biolubrificante, biodiesel.

ABSTRACT

ZORN, S. M. F. E. **Artificial lichens and the integration of high value-added products into a biorefinery**. 2022. 136p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Microbial consortia represent a clean alternative to cell harvesting, as well as the generation of high value-added bioproducts. In this sense, the present work evaluated the formation of artificial lichens with two microalgae species (*Chlorella vulgaris* BMAK 007 and *Scenedesmus obliquus* CCCMA-UFSCar604) and a filamentous fungus (*Mucor circinelloides* f. *griseo-cyanus* URM 4182). In the first stage of the research, four distinct lichenization strategies were evaluated between the species *C. vulgaris*, considered a model microalgae, and the filamentous fungus, in co-cultures carried out in an orbital shaker. The best condition resulted in an artificial lichen composed of 79% of microalgae biomass and cell recovery efficiency of 99.5%. In the second stage, the best result strategy was reapplied for the species *S. obliquus* and the filamentous fungus. The effect of supplementing the microalgae culture medium with sugarcane molasses (SM) was studied on the increase in biomass and lipids. Results from cultures with SM-supplemented medium showed that microalgae biomass and its microbial consortium doubled compared to cultures without supplementation and the accumulation of lipids in the biomass increased by 1.5 times. Furthermore, the cell recovery efficiency remained at 99.7%, with a contribution of 80% of algae biomass in the lichen composition, lipid content of the algae:fungus consortium equal to 38.2% by weight, and a balanced fatty acids composition (52.7% saturated and monounsaturated fatty acids, 47.4% polyunsaturated fatty acids). In the final stage of the research, co-cultures were carried out on an orbital shaker table, using larger volumes of culture medium, as well as a larger amount of cells and fungal mycelia. The lichenization experiments in this equipment had the main objective, to produce a greater amount of biomass, enabling its characterization and use for the synthesis of bioproducts. The concentrations obtained in dry lichen biomass were, on average, 2.71 g/L, twice as compared to the biomass grown in an orbital shaker (1.27 g/L). The lipid content of the formed lichens was $32.0 \pm 0.4\%$, and the average contribution of algal biomass in the lichens was $61 \pm 2.1\%$. Lichen biomass was characterized by scanning electron microscope (SEM) and spectroscopy in the infrared region (ATR-FTIR). The oleaginous biomass was applied for the synthesis of biolubricant and biodiesel: for the biolubricant, simulated fusel oil was used as acyl receptor; for biodiesel, ethanol as a solvent and reagent. The respective results were obtained, in ester contents: 96.8% for biolubricant and 98.8% for biodiesel. Based on the fatty acid composition of the oil extracted from lichenized biomass, the following properties for biodiesel were estimated: cetane number, iodine number, oxidation stability, specific gravity, and kinematic viscosity. The results demonstrated that artificial lichens can be an efficient alternative for bioremediation and low-cost cell harvesting, in addition providing an oilseed biomass for various industrial applications. Artificial lichens contain a very interesting biotechnological potential to be explored in biorefineries.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Mucor circinelloides*, sugarcane molasses, simulated fusel oil, biolubricant, biodiesel.

SUMÁRIO

1 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS.....	13
1.1 Justificativa e motivação do trabalho.....	13
1.2 Objetivos.....	15
1.3 Estrutura da tese.....	16
REFERÊNCIAS.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Microalgas e fungos em biorrefinarias.....	20
2.2 Cocultura de microalgas e fungos: alternativa aos métodos convencionais de colheita celular.....	21
2.3 Diferentes técnicas de cocultivo para formação de líquens artificiais.....	25
2.4 Morfologias dos fungos filamentosos.....	27
2.5 Formação do líquen artificial ao nível molecular.....	28
2.6 Fatores que influenciam sobre a produtividade e qualidade dos lipídios.....	31
2.7 Espécies estudadas na formação de líquens artificiais.....	35
2.7.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	35
2.7.2 <i>Scenedesmus obliquus</i>	36
2.7.3 <i>Mucor circinelloides</i>	37
2.8 Melaço de cana-de-açúcar (MC).....	38
2.9 Aplicações da biomassa de líquen para biolubrificante e biodiesel.....	39
2.9.1 Biolubrificante de origem microbiana.....	39
2.9.2 Biodiesel de origem microbiana.....	42
2.9.3 Propriedades do biodiesel.....	44
REFERÊNCIAS.....	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
3.1 Materiais.....	60
3.1.1 Microrganismos.....	60
3.1.2 Meios de cultivo.....	60
3.1.3 Melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e nutrientes.....	61
3.1.4 Catalisador químico.....	61
3.1.5 Outros materiais.....	62
3.2 Metodologia experimental e analítica.....	62

3.2.1 Preparo de concentrados de células e suspensão de esporos.....	62
3.2.2 Contagem de células microalgais e de esporos fúngicos.....	63
3.2.3 Determinação da concentração de açúcares totais.....	63
3.2.4 Determinação da concentração de clorofila A.....	63
3.2.5 Estratégias de cocultivo.....	63
3.2.6 Parâmetros dos cultivos em <i>shaker</i> orbital para <i>C. vulgaris</i> e <i>M. circinelloides</i>	64
3.2.7 Parâmetros dos cultivos em <i>shaker</i> orbital para <i>S. obliquus</i> e <i>M. circinelloides</i>	65
3.2.8 Parâmetros dos cultivos e cocultivos em mesa agitadora orbital.....	66
3.2.9 Colheita da biomassa e determinação de massa seca.....	68
3.2.10 Cálculo dos parâmetros bioquímicos com base em dados de cultivo.....	68
3.2.11 Contribuição das biomassas de alga e fungo na biomassa dos líquens.....	69
3.2.12 Determinação da eficiência de recuperação de células (ER).....	69
3.2.13 Extração de lipídios das biomassas de algas, fungo e líquens.....	70
3.2.14 Composição em ácidos graxos dos óleos microbianos extraídos.....	70
3.2.15 Análises de caracterização.....	71
3.2.16 Reações de transesterificação <i>in situ</i>	72
3.2.17 Determinação de parâmetros de qualidade do biodiesel.....	72
REFERÊNCIAS.....	74
4 AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE COCULTIVO.....	76
4.1 Introdução.....	76
4.2 Resultados e discussão.....	77
4.2.1 Efeitos do meio de cultivo e da glicose sobre as linhagens estudadas..	77
4.2.2 Formação de líquens por inoculação simultânea de células e esporos: estratégia I.....	78
4.2.3 Formação de líquens por imobilização sobre tela de fibra de algodão como suporte: estratégia II.....	80
4.2.4 Formação de líquens por adição de inóculo de células sobre o micélio fúngico: estratégia III.....	83
4.2.5 Formação de líquens por adição do micélio fúngico ao meio de cultivo	

com maior concentração inicial de células: estratégia IV.....	85
4.2.6 Avaliação da eficiência de recuperação de células (ER).....	87
4.2.7 Efeito das diferentes estratégias para a acumulação lipídica.....	91
4.3 Conclusões.....	97
REFERÊNCIAS.....	98
5 AVALIAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE FORMAÇÃO DE LIQUENS POR ADIÇÃO DE MICÉLIO FÚNGICO AO MEIO DE CULTIVO COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS DE <i>S. Obliquus</i>.....	101
5.1 Introdução.....	102
5.2 Resultados e discussão.....	102
5.2.1 Formação de liquens entre <i>S. obliquus</i> e <i>M. circinelloides</i>	102
5.2.2 Avaliação do conteúdo lipídico e do efeito da suplementação do meio de cultivo com melação de cana-de-açúcar.....	104
5.2.3 Caracterização lipídica: avaliação do perfil em ácidos graxos.....	108
5.2.4 Avaliação da eficiência de colheita e composição da biomassa do consórcio microbiano.....	110
5.3 Conclusões.....	113
REFERÊNCIAS.....	114
6 AVALIAÇÃO DE LIQUENS ARTIFICIAIS PRODUZIDOS EM MESA AGITADORA ORBITAL.....	117
6.1 Introdução.....	117
6.2 Resultados e discussão.....	118
6.2.1 Parâmetros de crescimento das espécies microbianas e dos liquens artificiais.....	118
6.2.2 Avaliação da eficiência de colheita de células e da composição da biomassa.....	121
6.2.3 Avaliação dos liquens artificiais por microscopia eletrônica de varredura.....	122
6.2.4 Avaliação dos liquens artificiais por análise de espectroscopia na região de infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	124
6.2.5 Aplicação da biomassa de liquens artificiais para síntese de biolubrificante e biodiesel.....	126
6.2.6 Avaliação de propriedades do biodiesel com base na composição em	

ácidos graxos.....	128
6.3 Conclusões.....	130
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	132
REFERÊNCIAS.....	134

1 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Justificativa e motivação do trabalho

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de combustíveis renováveis e outros bioprodutos de alto valor e interesse comercial tem sido intrinsecamente ligados a tecnologias que envolvem o processamento de microalgas (ZUCCARO *et al.*, 2021).

As microalgas sintetizam biomassa rica em produtos valiosos como lipídios, proteínas e carboidratos; assim, sua adaptabilidade a diversas condições, incluindo condições ambientais, e sua capacidade de modular o metabolismo celular, resultam em compostos de alto valor que incluem carotenoides, clorofilas, ficobiliproteínas e ácidos graxos poli-insaturados (LIYANAARACHCHI *et al.*, 2021). Além disso, vinculado a um contexto de economia circular, o emprego de microalgas como matéria-prima para a geração de energia limpa tem feito progressos tangíveis nos últimos anos (AGARWAL *et al.*, 2020).

O uso de microalgas pode ir muito além de seu papel como fornecedores de lipídios microbianos (ZUCCARO *et al.*, 2021), que podem se transformar em valiosos ésteres metílicos e etílicos para a indústria de biodiesel (CHISTI, 2007); as microalgas podem, de fato, funcionar como uma plataforma para capturar dióxido de carbono (CO₂) e, indiretamente, convertê-lo em combustível líquido e outros bioprodutos de alto valor comercial. No entanto, as instalações operacionais para produção de microalgas ainda apresentam algumas limitações, como uma demanda muito alta de energia e o cumprimento de requisitos relacionados ao uso de produtos químicos tóxicos ou recalcitrantes nas etapas de colheita (VISIGALLI *et al.*, 2021). Além disso, as células de microalgas apresentam valores de gravidade específica semelhantes aos apresentados pelo seu meio de cultura; devido a esta peculiaridade, a colheita de pequenas células microbianas por métodos tradicionais como centrifugação, floculação, flotação e filtração está associada a operações dispendiosas, podendo representar 50% do custo total de produção de biodiesel (MATA *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2022).

Por outro lado, outras espécies de microrganismos, como fungos, são relativamente mais fáceis de recuperar que as microalgas (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013; REIS *et al.*, 2020). Além disso, diversas espécies de fungos filamentosos podem atuar como biofloculantes atrativos devido à sua natureza autopeletizante, pela qual as células de microalgas são aderidas (REIS *et al.*, 2019; ZUCCARO *et al.*, 2021; DAS *et al.*, 2022).

Ademais, diferentes autores confirmam que as microalgas são microrganismos capazes de interagir mutualisticamente com outros microrganismos, como bactérias, leveduras, outras microalgas, bem como, fungos filamentosos (ZUCCARO *et al.*, 2021; DAS *et al.*, 2022).

Especificamente em termos da interação entre microalgas e fungos, é possível obter a formação de consórcios, como demonstrado por diferentes pesquisadores (GULTOM; HU, 2013; REIS *et al.*, 2019); nesses casos, as interações podem favorecer a síntese de compostos promissores para bioprocessos industriais (ZHANG; HU, 2012; LI *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2019). Com base nessa premissa, é possível estabelecer uma abordagem biotecnológica que envolva diferentes espécies microbianas (OLSON; Mc BRIDE; SHAW; LYND, 2012; ZORN *et al.*, 2020).

Conseqüentemente, a inserção de líquens artificiais, compostos de microalgas e fungos filamentosos, em um sistema de biorrefinaria, não responde somente à demanda de colheita de células, além disso, pode integrar a biotecnologia à utilização de múltiplos recursos, para a síntese de compostos até hoje produzidos em culturas isoladas, sejam somente algais ou fúngicas.

Desta forma, o presente trabalho teve como motivação, encontrar uma alternativa limpa e eficaz de colheita de células, ao mesmo tempo que sintetizar biomassa oleaginosa para diferentes aplicações industriais, através de consórcios microbianos, compostos por algas e fungos, ou seja, líquens artificiais.

O trabalho experimental compreendeu o cocultivo de duas espécies de microalgas com uma espécie de fungo filamentoso, respectivamente: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Mucor circinelloides*.

1.2 Objetivos

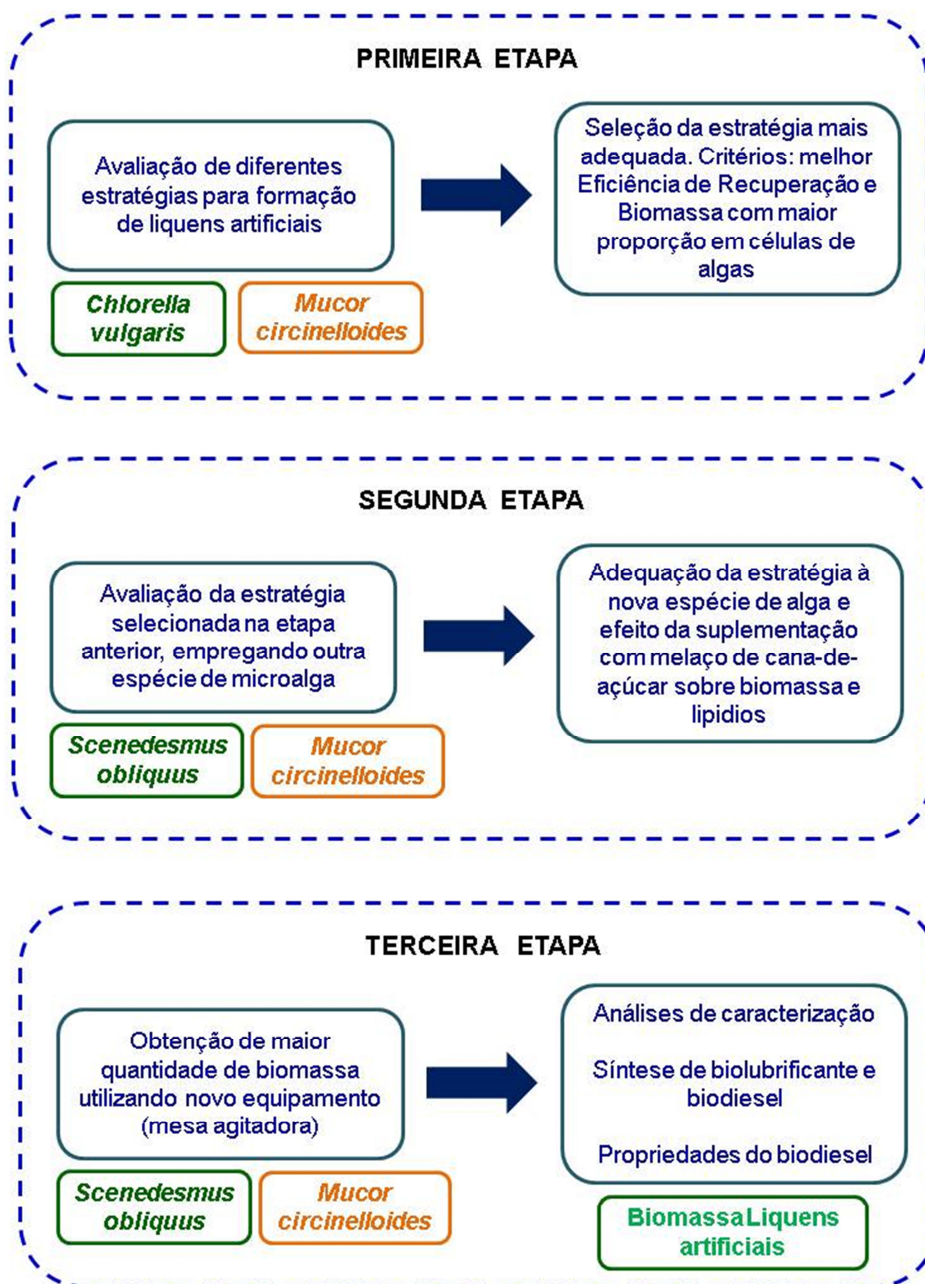
O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a formação de líquens artificiais com duas espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris* BMAK 007 e *Scenedesmus obliquus* CCCMA-UFSCar604) e uma espécie de fungo filamentoso (*Mucor circinelloides* f. *griseo-cyanus* URM 4182), visando a eficiência de recuperação de células e a síntese de biomassa oleaginosa útil a diferentes aplicações industriais.

Para alcançar este objetivo, primeiramente foram estabelecidos os métodos e avaliadas diferentes estratégias de liquenização entre a espécie *C. vulgaris*, considerada modelo, e o fungo filamentoso *M. circinelloides*. Nas etapas seguintes, os estudos de liquenização desenvolveram-se com a microalga *S. obliquus* e o fungo filamentoso *M. circinelloides*. As principais linhas de trabalho desenvolvidas nesta pesquisa foram:

- ✓ Determinação de condições de cultivo e estratégias de liquenização para as microalgas *C. vulgaris* e *S. obliquus* com o fungo filamentoso *M. circinelloides*.
- ✓ Integração de fontes de carbono de coprodutos agroindustriais aos estudos de liquenização.
- ✓ Obtenção de maior quantidade de biomassa e lipídios nos líquens artificiais formados pelas espécies *S. obliquus* e *M. circinelloides*.
- ✓ Avaliação da biomassa liquenizada para a síntese de produtos interesse comercial.

Um resumo das etapas desenvolvidas no trabalho está ilustrado na Figura 1.1.

Figura 1.1 – Esquema das etapas desenvolvidas no presente trabalho.



Fonte: Própria autora.

1.3 Estrutura da tese

O presente trabalho de tese encontra-se organizado em 7 capítulos. No primeiro capítulo encontram-se a justificativa e motivação para o desenvolvimento da tese: utilizar as espécies *C. vulgaris*, *S. obliquus* e *M. circinelloides*, na formação de líquens artificiais, para encontrar uma alternativa limpa e eficaz de

colheita de células, ao mesmo tempo que sintetizando biomassa oleaginosa para diferentes aplicações industriais. O capítulo também detalha os objetivos propostos e ilustra a estrutura do trabalho.

No segundo capítulo é efetuada a revisão da literatura, envolvendo os principais aspectos relacionados a líquens artificiais, condições para a formação dos consórcios microbianos, as espécies estudadas neste trabalho e a aplicação da biomassa oleaginosa de líquens para obtenção de biolubrificante e biodiesel, dentre outros temas relacionados.

O terceiro capítulo descreve os materiais e métodos experimentais e analíticos empregados, bem como, métodos utilizados para a caracterização da biomassa oleaginosa e as condições das reações de transesterificação para síntese de biolubrificante e biodiesel.

Nos capítulos 4, 5 e 6 são apresentados e discutidos os resultados obtidos em cada etapa do trabalho experimental. O capítulo 4 refere-se aos resultados obtidos na primeira etapa do trabalho, a formação de líquens com as espécies *C. vulgaris* e *M. circinelloides*, onde diferentes estratégias de cocultivo foram avaliadas.

Em uma segunda etapa, no capítulo 5, a formação de líquens artificiais entre as espécies *S. obliquus* e *M. circinelloides* foi avaliada, a partir da estratégia selecionada no capítulo anterior. Neste capítulo, o efeito da suplementação do meio de cultivo da microalga com melaço de cana-de-açúcar sobre o aumento da biomassa e sobre o conteúdo lipídico também foi estudado.

No capítulo 6 foram discutidos os resultados de cocultivos efetuados em um novo equipamento (mesa agitadora orbital) e apresentados resultados de análises de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia na região de infravermelho por transformada de Fourier por refletância total atenuada para a caracterização da biomassa liquenizada, bem como, a aplicação da biomassa nas sínteses de biolubrificante e biodiesel. Algumas propriedades para o biodiesel foram estimadas com base na composição em ácidos graxos dos óleos extraídos da biomassa dos líquens artificiais.

As considerações finais do trabalho desenvolvido, bem como sugestões para trabalhos futuros, são apresentadas no capítulo 7.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; MHATRE, A.; PANDIT, R.; LALI, A.M. Synergistic biorefinery of *Scenedesmus obliquus* and *Ulva lactuca* in poultry manure towards sustainable bioproduct generation. **Bioresource Technology**, v. 297, p. 1-10, 2020.

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

DAS, P.K.; RANI, J.; RAWAT, S.; KUMAR, S. Microalgal co-cultivation for biofuel production and bioremediation: current status and benefits. **Bioenergy Research**, v. 15, p. 1-26, 2022.

GULTOM, S.; HU, B. Review of microalgae harvesting via co-pelletization with filamentous fungus. **Energies**, v.6, p. 5921-5939, 2013.

LI, T.; LI, C.-T.; BUTLER, K.; HAYS, S.G.; GUARNIERI, M.T.; OYLER, G.A.; BETENBAUGH, M.J. Mimicking lichens: Incorporation of yeast strains together with sucrose-secreting cyanobacteria improves survival, growth, ROS removal, and lipid production in a stable mutualistic co-culture production platform. **Biotechnology Biofuels**, v. 10, p. 1-11, 2017.

LIYANAARACHCHI, V.C.; PREMARATNE, M.; ARIYADASA, T.U.; NIMARSHANA, P.H.V.; MALIK, A. Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review. **Algal Research**, v. 57, p. 1-21, 2021.

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.

OLSON, D.G.; MC BRIDE, J.E.; SHAW, A.J.; LYND, L.R. Recent progress in consolidated bioprocessing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 396-405, 2012.

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

REIS, C.E.R.; BENTO, H.B.S.; CARVALHO, A.K.F.; RAJENDRAN, A.; HU, B.; DE CASTRO, H.F. Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, p. 555-570, 2019.

REIS, C.E.R.; VALLE, G.F.; BENTO, H.B.S.; CARVALHO, A.K.F.; ALVES, T.A.; DE CASTRO, H.F. Sugarcane by-products within the biodiesel production chain: vinasse and molasses as feedstock for oleaginous fungi and conversion to ethyl esters. **Fuel**, v. 277, p. 1-7, 2020.

VISIGALLI, S.; BARBERIS, M.G.; TUROLLA, A.; CANZIANI, R.; ZRIMEC, M.B.; REINHARDT, R.; FICARA, E. Electrocoagulation–flotation (ECF) for microalgae harvesting - a review. **Separation and Purification Technology**, v. 271, p. 1-23, 2021.

ZHANG, J.; HU, B. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 529-535, 2012.

ZORN, S.M.F.E.; REIS, C.E.R.; SILVA, M.B.; HU, B.; DE CASTRO, H.F. Consortium growth of filamentous fungi and microalgae: evaluation of different cultivation strategies to optimize cell harvesting and lipid accumulation. **Energies**, v. 13, p. 1-15, 2020.

ZUCCARO, G.; DEL MONDO, A.; PINTO, G.; POLLIO, A.; DE NATALE, A. Biorefinery-based approach to exploit mixed cultures of *Lipomyces starkeyi* and *Chloroidium saccharophilum* for single cell oil production. **Energies**, v. 14, p. 1-20, 2021.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microalgas e fungos em biorrefinarias

O esgotamento dos recursos naturais e o impacto negativo dos combustíveis fósseis no meio ambiente são uma preocupação global (CHATERJEE; MOHAN, 2022). A industrialização, o avanço no setor de transportes e as mudanças climáticas severas, contribuem negativamente para o aumento da emissão de gases de efeito estufa. Fontes de energia renovável são a única alternativa para resolver ou minimizar esses problemas em um futuro próximo (ARUN *et al.*, 2020). Neste sentido, as biorrefinarias são uma importante plataforma para a solução de diversas questões relacionadas, devido ao aproveitamento integral de resíduos, reutilização de produtos secundários e a geração de energia para alimentar o próprio processo (CHATERJEE; MOHAN, 2022). A produção simultânea de energia renovável e a mitigação de gases causadores do efeito estufa, principalmente o sequestro de dióxido de carbono (CO₂), tem sido a área de pesquisa em alta nos últimos anos (ARUN *et al.*, 2020). Assim, os pesquisadores tem explorado o sequestro de CO₂ para a produção de biomassa e bioenergia renovável, por diversos meios. Neste sentido, microrganismos como as microalgas apresentam-se como uma alternativa interessante.

As microalgas são organismos fotossintetizantes, com elevada taxa de crescimento e menor exigência de espaço, em comparação a plantações (CHIU *et al.*, 2008). Microalgas são superiores às plantas terrestres em termos de redução de CO₂ e aumento de produção de biomassa, pois fixam cerca de 183 t de CO₂ produzindo 100 t de biomassa, que contém aproximadamente 50-60% de carbono em base de peso seco (ELOKA-EBOKA; INAMBAO, 2017; KUMAR *et al.*, 2020; SIDDIKI *et al.*, 2022). A biomassa algal também é um recurso à produção de biocombustíveis e outros compostos (KUO *et al.*, 2017). As microalgas podem, portanto, contribuir efetivamente para a mitigação de gases do efeito estufa e gerar produtos valiosos comercialmente.

Dentre as notáveis vantagens de diversas espécies microalgais, destacam-se a produtividade de biomassa e o elevado acúmulo de lipídios (CHOI *et al.*,

2019). As microalgas fornecem, portanto, matéria prima para a geração de bioenergia, pois podem sintetizar elevadas quantidades de ácidos graxos e triacilgliceróis (SIBI *et al.*, 2016).

De outro lado, fungos são notórios produtores de enzimas e ácidos orgânicos (SHAHRYARI *et al.*, 2019; MASLOVA *et al.*, 2019). A taxa de crescimento dos fungos é muito maior em comparação a outros micróbios. Além da maior velocidade de crescimento, constata-se também grande acúmulo de biomassa e lipídios (FEOFILOVA; SERGEEVA; IVASSHECHKIN, 2010; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2011; FERREIRA; MEIRELLES; BATISTA, 2013). Sua capacidade de produção de bioprodutos de menor valor/alto volume e, elevado valor/menor volume, os torna candidatos mais adequados às biorrefinarias (KUMAR; SHARMA, 2017; AMOAH *et al.*, 2019). Os fungos filamentosos, pertencentes ao filo de zigomicetos, tais como *Mortierella isabellina* e *Cunninghamella echinulata*, são capazes de acumular elevada quantidade de lipídios, ou seja, 60-87% e 40-57% de biomassa seca, respectivamente (FAKAS *et al.*, 2009). Dentre os fungos zigomicetos, os do gênero *Mucor* se destacam por serem potenciais produtores de lipídios, lipases e β -caroteno, em particular a espécie de *Mucor circinelloides* que foi pioneira na produção comercial de lipídio microbiano (RATLEDGE, 2004; TANG *et al.*, 2015).

Outras vantagens associadas ao cultivo de fungos são a fácil separação de biomassa e dos produtos, o que diminui os custos de produção. Por essas razões e robustez inerente, leveduras e fungos podem ser considerados como fábricas de células ideais para a síntese de produtos em biorrefinarias (KUMAR; SHARMA, 2017; AMOAH *et al.*, 2019).

2.2 Cocultura de microalgas e fungos: alternativa aos métodos convencionais de colheita celular

A colheita de células de microalgas é tecnicamente desafiadora, especialmente considerando: baixas densidades celulares (tipicamente na faixa de 0,3 - 1 g/L), tamanho pequeno das células (tipicamente na faixa de 2 - 40 μ m) e sua densidade semelhante à água (OLAIZOLA, 2003; LI *et al.*, 2008). O método

ideal para recuperar células de microalgas depende das características de cada espécie, como tamanho e densidade (OLAIZOLA, 2003), e a recuperação geralmente é uma etapa separada após o cultivo celular. Todas as abordagens de colheita disponíveis, que incluem floculação, flutuação, sedimentação, centrifugação e filtração, têm limitações para uma produção efetiva e econômica de biocombustíveis (REIS *et al.*, 2018). Por exemplo, os métodos de flotação, com base em captura de células de algas usando bolhas de ar dispersas, são limitados em sua viabilidade técnica e econômica. A maioria dos métodos de separação convencionais e econômicos, como filtração e sedimentação gravitacional, são amplamente aplicados nas instalações de tratamento de águas residuais para recuperar microalgas relativamente grandes ($>70 \mu\text{m}$), como *Coelastrum* e *Spirulina*. No entanto, eles não podem ser usados para colher espécies de algas cujas células se aproximam de dimensões bacterianas ($<30 \mu\text{m}$), como *Scenedesmus*, *Dunaliella* e *Chlorella* (BRENNAN; OWENDE, 2010), as quais pertencem às espécies de microalgas mais oleaginosas.

A centrifugação é amplamente utilizada para recuperar biomassa de microalgas, especialmente células de algas de pequeno porte; no entanto, sua aplicação é restrita a culturas de algas para metabólitos de alto valor, devido às necessidades energéticas intensivas e requisitos elevados para manutenção de equipamentos (OKORU *et al.*, 2019). De outro lado, a floculação é usada para colher células de microalgas de tamanho pequeno, sendo um passo preparatório para agregar as células de microalgas e aumentar o tamanho de partícula para que outros métodos de colheita, como filtração, centrifugação ou sedimentação por gravidade, possam ser aplicados (MOLINA *et al.*, 2003; SINGH; PATIDAR, 2018). Ainda sobre a floculação, o alto custo dos floclulantes químicos e possíveis efeitos de poluição que seu uso pode acarretar, as reações químicas são altamente sensíveis à salinidade, o que limita sua aplicação a algas de água doce (SUPARMANIAN *et al.*, 2019). Em síntese, a maioria das tecnologias, incluindo métodos químicos e mecânicos, aumentam consideravelmente os custos operacionais para a produção de algas e são apenas economicamente viáveis para uma pequena gama de produtos (RAJENDRAN; FOX; HU, 2017).

A integração do processo de cultivo fúngico com o microalgal vem sendo considerada como alternativa à solução de problemas comumente encontrados na separação de células microalgais. O uso de cocultivos, para tratar vários tipos de águas residuárias e efluentes agroindustriais, também é um campo de estudo em desenvolvimento. Estruturas em *pellets* de fungos de *Aspergillus* sp. e algas *C. vulgaris* foram utilizados para tratar derivados de lodo ativado. Os pesquisadores observaram que os *pellets* conseguiram diminuir significativamente nitrogênio e fósforo, bem como a cor, produzindo uma suspensão praticamente incolor em cerca de 24 h (WREDE *et al.*, 2014). Resultados semelhantes foram observados pela utilização de *Aspergillus fumigatus* com *Chlorella protothecoides* e *Tetraselmis suecica* utilizando resíduos da digestão anaeróbica de esterco de suínos, com redução nos valores de até 73,9% de amônia e 55,6% de fosfatos. Observou-se também que a absorção de nutrientes essenciais levou a um aumento de 1,7 vezes na produção de biomassa após 48 h de tratamento nas condições em cocultivo. O uso de *A. fumigatus* com *Tetraselmis chuii* também foi testado com águas residuais diluídas de suínos, desviado de um sistema de lagoas, em que até 86% de amônia e 69% de fosfato foram capturados em apenas 48 h de tratamento (WREDE *et al.*, 2014). Além disso, *pellets* de *A. fumigatus* e *Synechocystis* sp. foram cultivados em águas residuais tratadas por digestão anaeróbica de uma instalação de tratamento municipal (MIRANDA *et al.*, 2015). Para o último estudo, foi relatado que em suspensões relativamente concentradas (25% da concentração original de águas residuais), as estruturas microbianas conseguiram reduzir o teor de nitrogênio amoniacal em níveis próximos de 90% (164,3 a 18,2 mg/L) e fósforo em até 75% (38,7 a 9,8 mg/L). Curiosamente, o efeito sinérgico dos líquens foi maior que nas culturas isoladas, o que alcançou resultados não superiores a 52% para amônia-N e 45% para fosfato-P. Ainda em relação a este estudo, os rendimentos de biomassa foram aumentados para 2,3 vezes em relação ao sistema de controle, e os lipídios foram aumentados em 1,5 vezes (MIRANDA *et al.*, 2015).

Uma configuração experimental também foi estabelecida usando coprodutos da indústria de etanol do milho (RAJENDRAN; FOX; HU, 2017). Em um estudo, um biofilme composto por *Mucor* sp. e *C. vulgaris* foi testado, e os

resultados mostraram que a biomassa microbiana atingiu concentrações de 9,4 g/L em cultivo de 12 dias, sendo principalmente composta por células fúngicas (97,2% do biofilme) (RAJENDRAN; FOX; HU, 2017). Considerando os nutrientes do meio, o biofilme foi capaz de reter 55,7% e 74% das concentrações originais de fósforo (818 mg/L) e nitrogênio (924 mg/L), respectivamente. Os resultados também mostraram diminuição nos níveis da demanda química de oxigênio (DQO) de até 65,6%. Como outros estudos também mostraram, a combinação de diferentes culturas atingiu maiores concentrações de biomassa que as culturas isoladas sob todas as condições testadas.

A cocultura ou cocultivo de algas e fungos pode ser, portanto, uma alternativa para minimizar o custo de produção de biocombustíveis, especialmente por reduzir o custo de investimentos na etapa de colheita, uma vez que os fungos filamentosos atuam como agentes biofloculantes que atraem as células de microalgas, devido à sua capacidade de autopeletização (WREDE *et al.*, 2014). Essa atração ocorre porque as microalgas carregam uma carga líquida negativa (-23,7 mV) em sua superfície composta por íons fosfato, fosfodiéster, amina, hidroxila e grupos funcionais carboxílicos próton-ativos estão presentes, ao passo que hifas e micélios carregam uma carga positiva líquida (+46,1 mV), pois contêm polissacarídeos em suas superfícies (GULTOM; ZAMALLOA; HU, 2014). Portanto, fungos filamentosos podem neutralizar potencialmente a carga superficial negativa de algas permitindo a fixação para a parede celular do fungo quando são cocultivados e finalmente precipitando por copeletização (MURADOV *et al.*, 2015).

A técnica de cocultura tem mostrado resultados de aumento no rendimento de biomassa total, produtividade de lipídios, produção de enzimas e outros produtos de valor agregado, como metabólitos secundários, polímeros e ácidos orgânicos (BADER *et al.*, 2010). Nesta tendência, diferentes autores tem relatado várias biomoléculas de alto valor agregado, como ficocianina, β -caroteno, astaxantina, ácidos graxos essenciais, exopolissacarídeos (EPS), ácidos orgânicos e alguns alelopáticos como produtos oriundos da cocultura desses microrganismos que têm interesse comercial nas indústrias farmacêutica e nutracêutica (PADMAPERUMA *et al.*, 2018).

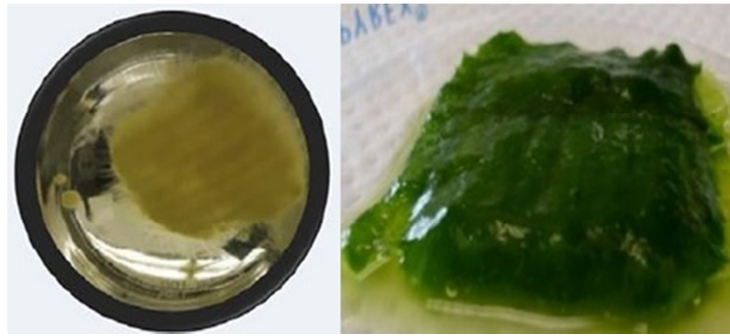
O cocultivo de fungos e algas requer condições mixotróficas, visto que os fungos são heterótrofos obrigatórios e as algas verdes são fotoautotróficas, portanto, a seletividade relativa de nutrientes e modo de tropismo para ambos podem variar (PADMAPERUMA *et al.*, 2018). Essas modificações em um sistema de cocultivo devido à interação entre fungos filamentosos e algas podem, dentre outros efeitos, modular a composição de ácidos graxos de lipídios sintetizados (DASH; BANERJEE, 2017). Além disso, o cultivo fotoautotrófico pode conduzir a reduções significativas de produtividade, se ocorrer variação da intensidade luminosa, por esse motivo, outros modos de cultivo em que as microalgas também são capazes de usar uma fonte de carbono orgânico têm sido explorados para melhorar a produtividade de óleos microbianos (ZUCCARO *et al.*, 2021).

2.3 Diferentes técnicas de cocultivo para formação de líquens artificiais

A formação de líquens artificiais, que são consórcios microbianos resultantes de um micobionte e um fotobionte, respectivamente, fungo e microalga, pode ser realizada por diferentes técnicas:

- Cocultivo de microalgas e fungos sobre uma matriz (substrato): esporos fúngicos são inoculados em um meio de cultivo apropriado à espécie; no mesmo local é utilizada uma matriz ou substrato, tal como uma tela de algodão ou de outro material; os esporos fúngicos depositam-se sobre a superfície da matriz, formando hifas; as células das microalgas, inoculadas concomitantemente, depositam-se sobre as hifas, formando um biofilme (RAJENDRAN; HU, 2016). Diversos autores conceituam como biofilme um consórcio de microrganismos, incorporado em substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances* - EPS), que compõem uma estrutura complexa, a qual se desenvolve em superfícies sólidas (ASSIS *et al.*, 2019; MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019; CHEUNG *et al.*, 2020). De acordo com este princípio, o biofilme é formado ou se desenvolve sobre um terceiro elemento, o substrato (RAJENDRAN; HU, 2016). A Figura 2.1 ilustra diferentes biofilmes formados sobre um substrato ou matriz.

Figura 2.1- À esquerda, biofilme de fungo filamentososo sobre suporte polimérico (crescimento isolado); á direita, biofilme tipo líquen (microalga + fungo filamentososo) sobre suporte de polipropileno e algodão.



Fonte: RAJENDRAN; HU, 2016; BARNHARST; RAJENDRAN; HU, 2018.

- Cocultivo de microalgas e fungos sem utilização de matriz (substrato): as espécies microbianas podem também unir-se, pelo mesmo princípio de liquenização/consórcio, sem, no entanto, empregar o elemento externo (matriz ou substrato), ou seja, somente com a integração entre os microrganismos componentes (ZHANG; HU, 2012; RAKESH *et al.*, 2014; DU *et al.*, 2018). Neste tipo de formação, o micobionte (fungo filamentososo) torna-se o suporte ou matriz, ao qual o fotobionte (microalga) irá ligar-se.

Neste tipo de cocultivo, distinguem-se duas variações mais conhecidas na literatura científica:

- Cocultivo de microalgas com *pellets* ou hifas /micélio de fungos: processo que ocorre em duas etapas: primeiramente os esporos de fungos desenvolvem-se em meio de cultivo próprio, formando *pellets* ou formando hifas, dependendo das características de cada espécie; em se tratando de fungos filamentosos as hifas compõem um micélio; em uma segunda etapa, efetua-se a liquenização, através da inoculação de células de microalgas ao meio de cultivo contendo os *pellets* ou o micélio formado (WREDE *et al.*, 2014; MIRANDA *et al.*, 2015; MURADOV *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018);

- Copeletização direta de fungos com outros microrganismos: em etapa única, os esporos de fungos e células de outros microrganismos (por exemplo, de microalgas) são inoculados simultaneamente no mesmo meio de cultivo; os *pellets* fúngicos ao se formarem floculam as células de microalgas (ZHOU *et al.*,

2012; ZHANG; HU, 2012; PRAJAPATI; KUMAR; MALIK, 2014; ZAMALLOA *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018; BARNHARST; RAJENDRAN; HU, 2018).

2.4 Morfologias dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos podem apresentar diferentes morfologias quando em culturas submersas, dependendo da espécie e das condições de cultivo (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). Estas morfologias incluem: hifas dispersas, agregados microscópicos, agregados hifais soltos, denominados *clumps*, e agregados densos esféricos, comumente referidos como *pellets* (COX; PAUL; THOMAS, 1998).

As hifas são padrões polarizados em forma de filamentos, que originam-se da proliferação de células ou esporos isolados, como tubos multinucleados contendo citoplasto, o qual se move dentro da hifa em direção à sua extremidade (KRULL *et al.*, 2010; KRULL *et al.*, 2013). A partir das principais hifas, novas pontas são formadas, produzindo ramos, resultando em uma rede ou conjunto de emaranhado de hifas, denominada micélio (ZNIDARSIC; PAVKO, 2001; ZMAK *et al.*, 2006; GULTOM; HU, 2013).

Pellets são massas de forma esférica ou elipsoidal, contudo, seu formato pode ser irregular ou bem compactado. Em termos de formação, os *pellets* formados por fungos filamentosos podem ser de dois tipos: coagulativo e não coagulativo (METZ; KOSSEN, 1977; VECHT-LIFSHITZ *et al.*, 1990; ZNIDARSIC; PAVKO, 2001).

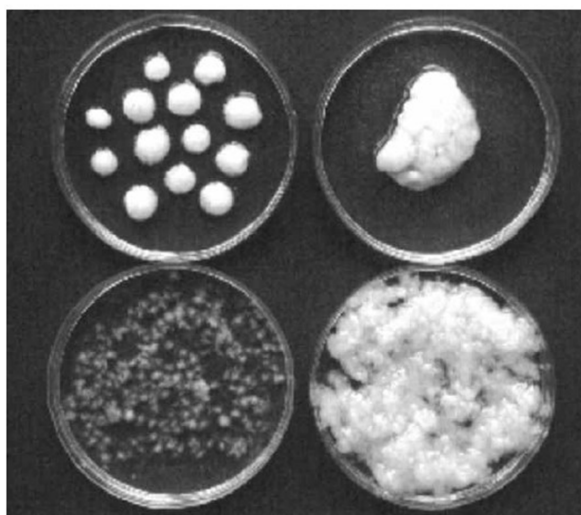
No tipo não coagulado, os grânulos são formados a partir de um esporo. Esse tipo de formação de grânulos tem sido relatado para alguns actinomicetos do gênero *Streptomyces*, *Rhizopus* spp e *Mucor* spp (METZ; KOSSEN, 1977; VECHT-LIFSHITZ *et al.*, 1990; ZNIDARSIC; PAVKO, 2001).

No tipo de *pellet* coagulativo, os esporos agregam-se no estágio inicial do cultivo, e os *pellets* formam-se a partir desses agregados. Esse tipo de formação de grânulos pode incluir *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e o fungo basidiomiceto *Fanerochaete chrysosporium* (METZ; KOSSEN, 1977; ZNIDARSIC; PAVKO, 2001; GRIMM *et al.*, 2004).

De acordo com Braun *et al.* (1991), diversos fatores podem afetar sua estrutura e formação dos *pellets*: fatores microbiológicos (herança genética e composição da parede celular), fatores externos (tamanho de ciclo, taxa de crescimento, nutrição e relação entre fontes de nitrogênio e carbono), fatores histoquímicos (compartilhamento de substâncias, agentes ativos de superfície, pH, temperatura, força iônica e suspensão de sólidos no meio de cultivo).

A Figura 2.2 mostra diferentes condições de cultivo submerso, com diversas formas de crescimento de *pellets* do fungo filamentososo *Rhizopus nigricans*.

Figura 2.2- Diferentes formas de pelletização de *Rhizopus nigricans*



Fonte: ZNIDARSIC; PAVKO, 2001.

2.5 Formação do líquen artificial ao nível molecular

Durante o cocultivo para a formação do líquen artificial, microalgas e fungos filamentosos se beneficiam mutuamente por trocas gasosas e de nutrientes. De forma simplificada, o oxigênio liberado pela microalga no processo de fotossíntese é utilizado pelo fungo filamentoso e o dióxido de carbono liberado pelo fungo será absorvido pela microalga (RAJENDRAN; HU, 2016; ARORA *et al.*, 2019).

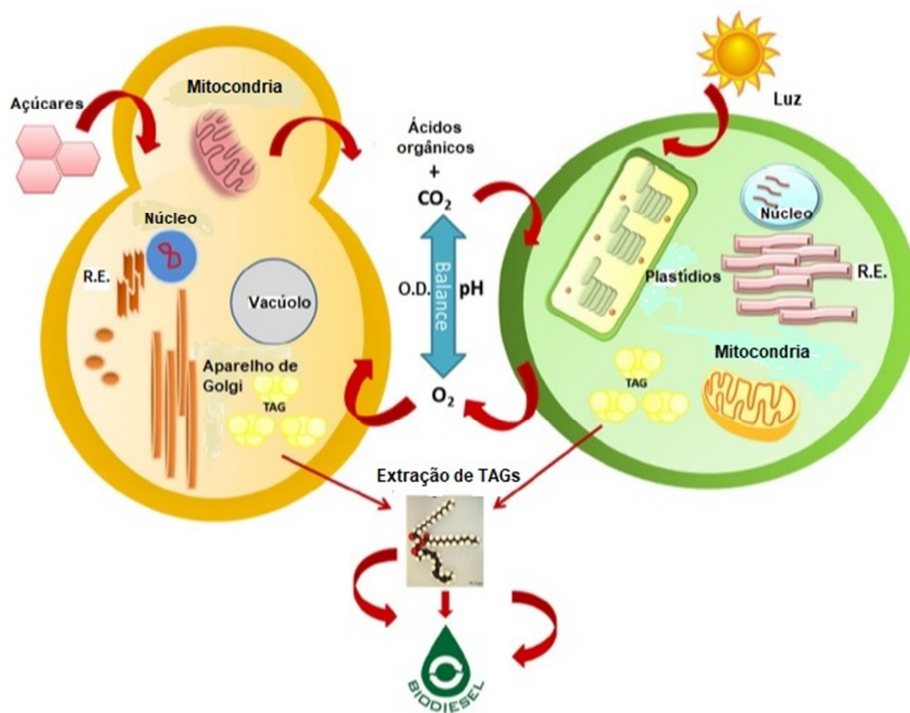
Os fungos filamentosos liberam ácidos orgânicos, que inibem seu crescimento em fases posteriores do metabolismo; em incubação com as microalgas, estas absorvem estes ácidos orgânicos, que favorecem o

desenvolvimento dos fungos (RAJENDRAN; HU, 2016). Em um estudo de cocultivo realizado por Zhang *et al.* (2014) com as espécies *Chlorella vulgaris* e *Rhodotorula glutinis*, destacou-se a diminuição dos níveis de ácido propiônico, ácido pirúvico, ácido acético e ácido palmítico, enquanto os níveis de glicina e pirolina aumentaram, indicando que a microalga consumiu os ácidos orgânicos liberados pelo fermento, o que foi comprovado pelo aumento do pH no meio de cultivo alga-levedura, em comparação com os cultivos isolados.

Diversas espécies de fungos são capazes de clivar vários açúcares complexos em simples, que podem então ser usados por microalgas para sua multiplicação celular, enquanto as microalgas convertem o CO₂ presente no meio de cultivo em bicarbonato, que é consumido pelo fungo, liberando íons OH⁻, tornando o meio de cultivo alcalino (XUE *et al.*, 2010; ARORA *et al.*, 2019). Essa alcalinidade é benéfica para muitos fungos, pois equilibra a acidez do meio de cultura, o que interfere no crescimento das espécies fúngicas. Assim, a interação de metabólitos pode resultar no equilíbrio intrínseco de O₂/CO₂, pH e oxigênio dissolvido no meio de cultivo, levando a um aumento na taxa de crescimento e produção de metabólitos para ambas as espécies (XUE *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2014; ARORA *et al.*, 2019), o que pode ser notado pelo aumento da biomassa e pelo acúmulo de lipídios.

A Figura 2.3 ilustra o esquema de trocas gasosas e nutrientes entre microalgas e fungos em cocultivo.

Figura 2.3 - Representação esquemática: trocas gasosas e nutrientes entre microalgas e fungos.



Fonte: Adaptado de ARORA *et al.*, 2019.

A superfície celular do líquen formado é macia e coberta com macromoléculas flexíveis, hidratadas, o que facilita a adesão entre as células e, das células às superfícies (GULTOM; HU, 2013), ou seja, as macromoléculas contidas nas células de microalgas e fungos são interligadas.

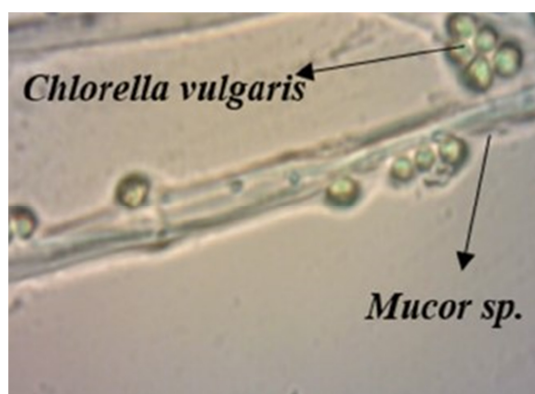
De acordo com diferentes autores (GULTOM; HU, 2013; REIS *et al.*, 2018), a formação de uma estrutura tipo líquen, composta por algas e fungos, sobre uma matriz, baseia-se nas seguintes etapas:

- adesão de esporos de fungos ou germinação de esporos de fungos e células de algas sobre a matriz;
- proliferação de células mononucleadas sobre a superfície ou a matriz;
- indução da formação de hifas fúngicas, promovendo a fixação das células de algas nos micélios.

Os esporos de fungos apresentam camadas semelhantes a cristais, que impedem a agregação entre si e com outras cepas, de maneira que as hifas crescentes atuam como o principal promotor de interligações entre esporos em germinação e outras espécies (GULTOM; HU, 2013). Além disso, microscopicamente, o carboidrato de lectina é um fator importante na ligação de

algas e fungos (GULTOM; HU, 2013; ZAMALLOA *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2018). Na estrutura da lectina-carboidrato, há a presença de íons cálcio, que atuam como um elo entre a célula com carga negativa e os ácidos nucleicos extracelulares, que permitem a comunicação célula a célula através de interações eletrostáticas (ZAMALLOA *et al.*, 2017). A fraca ligação de lectina-carboidrato forma arranjos celulares estáveis e aumenta a resistência de cisalhamento (ZAMALLOA *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2018). A microfotografia da Figura 2.4 mostra a estrutura de líquen artificial vista ao microscópio, contendo diversas células de microalgas aderidas sobre a hifa fúngica.

Figura 2.4 - Células de *C. vulgaris* aderidas sobre a hifa do fungo filamentosso *Mucor* sp. formando uma estrutura tipo líquen.



Fonte: RAJENDRAN; HU, 2016.

2.6 Fatores que influenciam sobre a produtividade e a qualidade dos lipídios

Em um sistema de cocultivo, a produtividade e a qualidade dos lipídios extraídos da biomassa podem variar substancialmente (ARORA *et al.*, 2019). A produtividade está diretamente relacionada à quantidade de lipídios totais. As variações na qualidade refletem-se na composição em ácidos graxos do material lipídico, ou seja, o comprimento das cadeias de carbono dos ácidos graxos e grau de insaturação (REIS *et al.*, 2018; ARORA *et al.*, 2019). Portanto, os seguintes fatores devem ser considerados, dependendo da aplicação desejada:

- Seleção das espécies: deve-se priorizar espécies de fácil cultivo, buscando as que são compatíveis entre si, preferencialmente cultivadas no

mesmo meio de cultivo (ARORA *et al.*, 2019). Algumas características para a seleção de espécies incluem: taxa de crescimento rápido, alto conteúdo lipídico, resistência a variações extremas, tolerância à contaminação e a variações no meio ambiente e tamanho de células para facilitar a colheita da biomassa (GRIFFITHS; HARRISON, 2009; KITCHA; CHEIRSILP, 2014). No entanto, nenhuma espécie em particular pode atender a todas essas propriedades. Deste modo, a seleção de espécies requer priorização, que depende principalmente do meio de cultura e das condições ambientais locais prevalentes no local do cultivo. Em um cenário de cocultivo, os principais critérios de seleção dependem da compatibilidade entre as cepas, ou seja, devem ter faixa de temperatura de crescimento e tempo de duplicação comparável, em que as espécies possam ser cultivadas associadas (SRINUANPAN *et al.*, 2018; ARORA *et al.*, 2019).

- Meio de cultivo: a variação no meio de cultivo influencia fortemente a taxa de crescimento e a produção lipídica. Macronutrientes, como nitrogênio e fósforo, afetam a taxa de crescimento, pois são os blocos de construção da síntese de ácidos nucleicos e enzimas (CONVERTI *et al.*, 2009). As espécies fúngicas, por exemplo, necessitam de fontes de carbono para seu crescimento, cuja fonte e quantidade influenciam no seu desenvolvimento e composição lipídica (SITEPU *et al.*, 2013; PADMAPERUMA *et al.*, 2017).

- Proporção entre os microrganismos: No cenário de cocultivo entre microalgas e fungos, os fungos normalmente são a espécie dominante no início (24 - 48h) devido à sua taxa de crescimento mais rápida, enquanto microalgas reproduzem-se mais lentamente no tempo inicial (CAI; HU; DU, 2007; CHEIRSILP *et al.*, 2011; SHU *et al.*, 2013). Esse crescimento lento inicial das microalgas pode ser devido ao efeito inibitório do CO₂ liberado pelos fungos no meio (YEN; CHEN; CHEN, 2015), ou à taxa de divisão celular lenta ou falta de penetração da luz, devido ao crescimento denso da espécie fúngica (KITCHA; CHEIRSILP, 2014). No entanto, após 24 a 48 h (dependendo das espécies cultivadas), as microalgas se adaptam ao ambiente e começam a crescer em um ritmo mais rápido, enquanto a espécie fúngica já atingiu sua fase estacionária, visto que os

nutrientes (principalmente a fonte de carbono) foram esgotados (YEN; CHEN; CHEN, 2015).

- Intensidade de luz e fotoperíodo: A intensidade de luz e o fotoperíodo não interferem no metabolismo da espécie fúngica, contudo, influenciam fortemente a espécie microalgal. Durante a fotossíntese, os elétrons passam da água para o nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺) gerando ATP (WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2013). A baixa intensidade de luz desempenha um papel crucial, pois pode levar a taxas fotossintéticas retardadas, enquanto a alta iluminação resulta em danos aos pigmentos fotossintéticos, causando fotoinibição (ZUROFF; CURTIS, 2012; WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2013). A intensidade da luz também modula a composição bioquímica de microalgas, especificamente de lipídios e carboidratos. Uma alta iluminação pode levar à indução de estresse nas células microalgais, resultando no acúmulo de TAGs intracelularmente (HUO *et al.*, 2011).

- Proporção entre carbono e nitrogênio: O metabolismo lipídico em fungos oleaginosos e microalgas é controlado pela razão carbono-nitrogênio (BRAUNWALD *et al.*, 2013; SILABAN *et al.*, 2014). A proporção entre carbono e nitrogênio deve ser modulada, de tal forma que a produção de biomassa seja beneficiada, bem como a produção lipídica (DALIRY *et al.*, 2017).

- Tempo de cultivo: Microalgas e fungos oleaginosos acumulam a maioria dos lipídios na fase estacionária inicial. Ao entrar na fase estacionária tardia, embora os triacilgliceróis sejam sintetizados, a via de peroxidação lipídica também é ativada, levando a uma diminuição no seu conteúdo (SITEPU *et al.*, 2013). Portanto, o tempo de cultivo é um parâmetro importante para decidir a fase máxima de acumulação lipídica e, assim, otimizar o tempo de colheita (SITEPU *et al.*, 2013). Este tempo pode variar de acordo com o tempo de divisão das células de microalgas e fungos, as condições e a composição do meio de cultivo (PADMAPERUMA *et al.*, 2017).

- pH, velocidade de agitação e temperatura: O pH do meio determina a solubilidade e a disponibilidade de CO₂ e nutrientes essenciais, influenciando

portanto, no crescimento das espécies (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013), desta forma, o pH ótimo deve ser estabelecido de acordo com as espécies em cocultivo. A velocidade de agitação controla a taxa de transferência de massa, modulando assim a troca de O₂ e CO₂ entre microalgas e fungos (CHEIRSILP *et al.*, 2011). Em específico sobre esse parâmetro, estudos demonstrando sua influência sobre o acúmulo de lipídios na biomassa são escassos (CHEIRSILP *et al.*, 2011), contudo, diversos autores preconizam que uma velocidade de agitação em torno de 150 rpm é considerada adequada (CHEIRSILP *et al.*, 2011). Quanto à temperatura, o cultivo de células em uma temperatura ideal resulta em rápida taxa de crescimento com captação eficiente de nutrientes (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013). A exposição a altas e baixas temperaturas leva a condições estressantes, conduzindo a um desequilíbrio energético nas células, com excesso de produção de radicais livres e inibição na taxa de crescimento, respectivamente (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013; VANHERCKE *et al.*, 2013). Portanto, é essencial otimizar a temperatura de cocultura, de modo que ambas as espécies cresçam em taxas de crescimento iguais com um aumento subsequente no acúmulo de lipídios. Diversos autores enfatizam que uma temperatura entre 24 e 26 °C tem-se demonstrado adequada para os cocultivos entre diferentes espécies de microalgas e fungos (GULTOM; HU, 2013).

A composição em ácidos graxos de estruturas tipo líquen é um tema relevante e relativamente recente (REIS *et al.*, 2018). Análises da composição de ácidos graxos de *pellets* de fungos e algas sugerem que esta composição pode ser adaptada e otimizada através de cocultivos com diferentes espécies, sem a necessidade de modificação genética (WREDE *et al.*, 2014), o que é bastante promissor. De forma geral, devido aos benefícios que os consórcios microbianos propiciam em ambas as espécies participantes, a composição em ácidos graxos será resultante da contribuição entre ambas (ZHANG; HU, 2012).

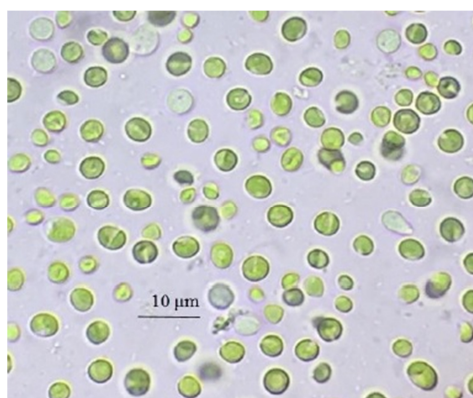
2.7 Espécies estudadas na formação de líquens artificiais

2.7.1 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris é uma espécie unicelular, das microalgas verdes, pertencente à família Chlorophyta. Desenvolve-se bem sob condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas (CORONADO-REYES *et al.*, 2020). Comercialmente, é uma das microalgas mais utilizadas na aquicultura. Vários estudos confirmaram sua capacidade de melhorar a nutrição, imunidade, biorremediação aquática, estresse, resistência a doenças em peixes, quando usada adequadamente (AHMAD *et al.*, 2018; CORONADO-REYES *et al.*, 2020). Do ponto de vista nutricional, esta espécie contém 61,6% de proteínas, 12,5% de lipídios, 13,7% de carboidratos, oligoelementos e vitaminas (complexo B, tiamina, C, D, E e K), contudo, esses valores podem variar completamente de acordo com as condições de cultivo (RODRIGUEZ-GARCIA; GUIL-GUERRERO, 2008; BLAS-VALDIVIA *et al.*, 2011).

Por ser uma espécie robusta, de fácil cultivo e adaptação a diferentes meios de cultivo, com amplas referências na literatura científica, esta espécie foi escolhida como modelo para os experimentos de liquenização no presente trabalho. A Figura 2.5 demonstra a morfologia das células de *Chlorella vulgaris* observadas ao microscópio ótico.

Figura 2.5- Células de *C. vulgaris* observadas ao microscópio ótico.



Fonte: RAMARAJ; UNPAPROM; DUSSADEE, 2016

2.7.2 *Scenedesmus obliquus*

Scenedesmus obliquus é uma espécie de microalga verde, colonial e não móvel, pertencente à divisão *Chlorophyta*, excelente produtora de lipídios, carboidratos e proteínas (SHUBA; KIFLE, 2018). A morfologia da colônia pode variar significativamente, de acordo com o meio de cultivo em que as células estão crescendo. Em um meio com baixa concentração de nitrato ou baixa de sais em geral, a espécie é induzida a crescer como unicelular, formando células elípticas com cerca de 10 µm de comprimento (PANCHHA *et al.*, 2014). Pode ser facilmente cultivada fotoautotroficamente ou mixotroficamente (SHUBA; KIFLE, 2018).

O conteúdo lipídico desta microalga é estimado em 40-55% e, especialmente, contendo ácidos palmítico e oleico como principais constituintes dos lipídios, tornando-a uma matéria-prima apropriada para a produção de biocombustíveis (MANDAL; MALLICK, 2009). Como muitas outras espécies de microalgas, essa espécie tem a capacidade de modular seu metabolismo em resposta a mudanças simples da composição química de seu meio de cultura (XIN; HU; SUN, 2010), com consequente alta produtividade lipídica. Esta espécie foi escolhida para os experimentos de liquenização, por ser de fácil cultivo e crescimento rápido e também por ser uma espécie de água doce bastante estudada em cocultivos (CHEUNG *et al.*, 2020). A Figura 2.6 mostra uma das morfologias das células de *Scenedesmus obliquus* ao microscópio.

Figura 2.6 - Microfotografia de *S. obliquus*, cultivada em meio com baixa concentração de sais.



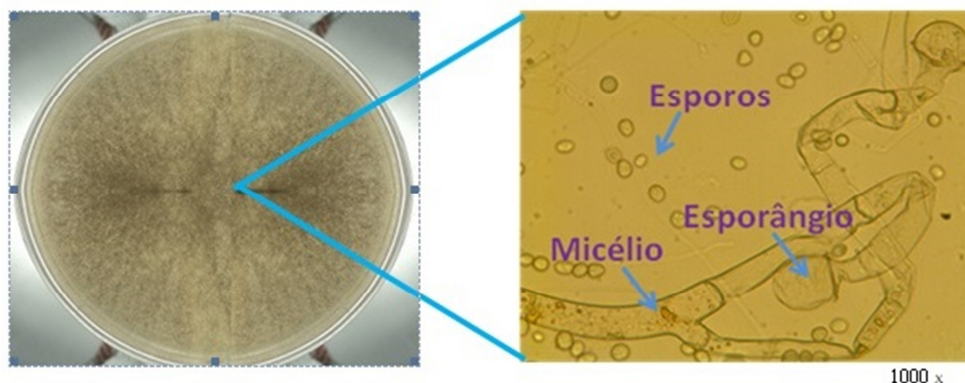
Fonte: BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2011

2.7.3 *Mucor circinelloides*

Os fungos filamentosos do filo Zigomiceto, com destaque para os do gênero *Mucor*, tem sido extensivamente estudados para a aplicação em biorrefinarias (CARVALHO *et al.*, 2015). Esse gênero, particularmente da espécie *Mucor circinelloides*, é um potencial produtor da enzima lipase e de biomassa com quantidades significativas de lipídios (*single cell oil*) o que permite sua exploração de forma integrada no processo de produção de biodiesel. A linhagem *Mucor circinelloides* f. *griseo-cyanus* URM 4182 foi escolhida para os experimentos de liquenização, devido à sua comprovada robustez, rápido crescimento e adaptabilidade a diferentes condições de cultivo (CARVALHO *et al.*, 2019; REIS *et al.*, 2019).

Esta espécie fúngica desenvolve-se bem sob uma variedade de fontes de carbono e sua biomassa é constituída por proteínas, lipídios e aminoácidos (FERREIRA; MEIRELLES; BATISTA, 2013).

A Figura 2.7 ilustra a morfologia do fungo *Mucor circinelloides* f. *griseo-cyanus* URM 4182, com o cultivo e produção de esporos em meio sólido.

Figura 2.7 – Morfologia do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* URM 4182

Fonte: CARVALHO, 2015.

2.8 Melaço de cana-de-açúcar (MC)

O melaço de cana-de-açúcar (MC) é um subproduto oriundo do processamento do suco de cana altamente concentrado, processado em usinas sucroalcooleiras. Tem sido amplamente explorado pela indústria, devido à sua abundância e baixo custo de produção nas regiões tropicais, como o Brasil e a Índia. Adicionalmente sua composição química é relativamente simples, majoritariamente composto por sacarose, e suas unidades monoméricas de açúcar, glicose e frutose. Este substrato atende a segmentos diversos, desde a pecuária, aquicultura e horticultura até a mineração, indústria de fertilizantes, e em tratamento de efluentes (BENTO *et al.*, 2020).

Sua utilização não está restrita somente a tais segmentos agro-industriais, visto que diferentes pesquisadores aplicam o melaço como suplemento ou como principal agente em processos biotecnológicos (CARVALHO *et al.*, 2019; BENTO *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2020; ARGAWAL *et al.*, 2020; TINÔCO *et al.*, 2021), notadamente por ser uma fonte rica em nutrientes e sais minerais, o que faz essa matéria-prima um importante complemento, favorecendo o metabolismo de espécies microbianas. Por exemplo, Tinôco *et al.* (2021) empregaram o melaço de cana-de-açúcar (10 g/L), como suplemento ao meio de cultivo contendo glicerol, para a produção de (2R,3R)-butanodiol (2,3-BDO) por *Paenibacillus polymyxa* PM 3605, resultando em um aumento da concentração do 2,3- BDO para até 19 g/L, sendo que, de acordo com os autores, trata-se da maior concentração deste *levo*-isômero produzido pela cepa de *P. polymyxa* a partir do

glicerol bruto e do melaço de cana-de-açúcar como substrato secundário. O melaço de cana-de-açúcar foi avaliado por Bento *et al.* (2020) como meio de cultivo para o fungo filamentoso *M. circinelloides*, onde obteve-se uma concentração em biomassa fúngica de 11,2 g/L, com um conteúdo lipídico de 29 % em peso, sendo esta biomassa processada para a síntese de biodiesel. Reis *et al.* (2020) utilizaram uma suplementação à base de melaço de cana-de-açúcar e vinhaça e obtiveram biomassa oleaginosa também da espécie *M. circinelloides*, com composição em ácidos graxos adequada à produção de biodiesel.

Neste contexto, buscou-se avaliar o emprego do melaço de cana-de-açúcar como suplemento ao cocultivo do consórcio microbiano de alga:fungo neste trabalho, visto que, além de ser uma matéria prima abundante, tem-se um histórico bastante relevante, até mesmo dentro da linha de pesquisa dos laboratórios da USP em Lorena-SP.

2.9 Aplicações da biomassa de líquen para biolubrificante e biodiesel

2.9.1 Biolubrificante de origem microbiana

Biolubrificantes podem ser compreendidos como lubrificantes que possuem em sua composição óleos vegetais *in natura* ou modificados, alta biodegradabilidade e baixa ecotoxicidade, onde a porcentagem de oleaginosas pode ser integral ou parcial, variando de acordo com o tipo da aplicação do produto (HONARY; RICHTER, 2013). Biolubrificantes são uma mistura de ésteres graxos, produto da reação entre o triacilglicerol de óleos vegetais com álcoois de cadeia mais longa, como por exemplo o álcool isoamílico (HONARY; RICHTER, 2013).

Os biolubrificantes são derivados principalmente de óleos e gorduras e utilizados como alternativas biodegradáveis aos lubrificantes minerais para reduzir os impactos ambientais em situações onde a probabilidade de derramamento ou vazamento é alta. As regulamentações ambientais locais e nacionais e a demanda dos consumidores por materiais ecologicamente corretos aumentaram a

conscientização sobre os impactos dos produtos derivados do petróleo no meio ambiente (SHARMA; BIRESAW, 2017).

Devido a estas vantagens, a demanda por biolubrificantes tem aumentado continuamente: esses produtos “verdes” têm sustentado um crescimento anual de mercado de 10% nos últimos 10 anos (DA SILVA *et al.*, 2020). A biodegradabilidade é amplamente definida como a capacidade de um material ser decomposto por microrganismos em até um ano (DA SILVA *et al.*, 2020).

Contudo, os óleos vegetais possuem elevadas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, o que gera biolubrificantes com baixa estabilidade oxidativa (MASUDI; MURAZA, 2018). Devido à baixa estabilidade oxidativa, diversas reações têm sido propostas para modificação química dos triglicerídeos que compõem estas fontes oleaginosas (NAGENDRAMMA; KAUL, 2012; KULKARNI *et al.*, 2013; SHARMA; BIRESAW, 2017).

Uma alternativa possível a esta questão está nos óleos de microalgas, com maiores quantidades de ácido oleico (C18:1), monoinsaturado, e menores quantidades de ácido linolênico (C18:3) (QIAO *et al.*, 2017), que contribuem positivamente para a estabilidade oxidativa.

A biomassa de microalgas também pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de biolubrificantes através da transesterificação de triglicerídeos presentes em seu óleo. A reação de transesterificação é, essencialmente, a transformação de um éster em outro. Para a produção do biolubrificante, o triacilglicerol do óleo da microalga reage com um ou mais álcoois, produzindo a mistura de ésteres graxos (biolubrificante) (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021).

As moléculas de álcool atuam como receptores acila na reação de transesterificação (DA SILVA *et al.*, 2020; VALDOVINOS-GARCÍA *et al.*, 2020; BOLINA; GOMES; MENDES, 2021). Portanto, a escolha de um receptor acila apropriado é de imensa importância para as propriedades finais do biolubrificante produzido e para o rendimento da reação de transesterificação.

O procedimento de produção pode ser realizado em uma ou duas etapas. A abordagem em duas etapas é feita pela transesterificação dos triglicerídeos com metanol ou etanol, produzindo ésteres metílicos ou etílicos, respectivamente. Esses produtos, então, reagem com um poliálcool (por exemplo, trimetilolpropano,

pentaeritritol e neopentilglicol), produzindo o biolubrificante. A primeira etapa é necessária para reduzir a viscosidade dos triglicerídeos, acelerando a segunda etapa do processo, favorecendo a purificação do biolubrificante. Esta tem sido uma das principais rotas para a produção de biolubrificantes (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021).

A obtenção de biolubrificantes em uma única etapa, no entanto, é possível, e pode reduzir os custos de produção. Da Silva *et al.* (2020) alcançaram altos rendimentos de transesterificação com a reação de transesterificação *in situ* (etapa única), usando óleo fúsel como receptor acila. Este método estabeleceu o óleo fúsel como uma escolha interessante entre os receptores acila.

O óleo fúsel é um subproduto gerado na destilação multiestágio do etanol, obtido por meio de fermentação. Trata-se da fração menos volátil obtida na destilação do etanol e possui excelente potencial de reaproveitamento devido à sua composição rica em álcoois superiores e volume gerado (120 milhões de litros/ano) (FERREIRA; MEIRELLES; BATISTA, 2013; VILAS BÔAS *et al.*, 2017). É composto principalmente de álcoois com dois a cinco átomos de carbono por molécula (por exemplo, etanol, álcool n-propílico, álcool isoamílico, álcool isobutílico e álcool n-butílico (SIMSEK; OZDALYAN, 2018; KOWAL *et al.*, 2021). O uso e descarte adequados do óleo fúsel, como resíduo químico, é de imensa importância econômica e ambiental, o que tem sido reforçado pela crescente demanda por álcool puro, provocada pela pandemia de COVID-19, que aumentou a produção de óleo fúsel (KOWAL *et al.*, 2021). Possíveis usos para este subproduto incluem a produção de álcoois superiores purificados por destilação simples ou fracionada e síntese química ou biotecnológica de ésteres (CHU *et al.*, 2021). Os principais componentes do óleo fúsel são álcool isoamílico (78,2%), butanol (10,6%), outros álcoois secundários e etanol (11,2%) (DARKI; SEYFABADI; FAYAZI, 2017).

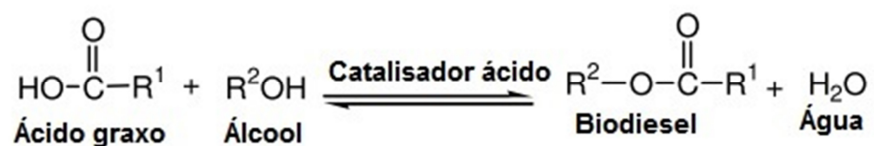
O óleo fúsel foi utilizado como receptor acila na reação de transesterificação do óleo da microalga *Dunaliella salina* (DA SILVA *et al.*, 2020). De acordo com os autores, empregando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em óxido de nióbio (Nb_2O_5) obteve-se a conversão do óleo da microalga nos correspondentes ésteres alquílicos com rendimentos que variam de

70,8 a 89,0%. Este resultado demonstra o potencial do óleo fúsel como receptor acila para obtenção de ésteres graxos a partir de lipídios microbianos na síntese de biolubrificantes. Neste presente trabalho utilizou-se uma mistura de álcoois similar ao óleo fúsel (óleo fúsel simulado).

2.9.2 Biodiesel de origem microbiana

O biodiesel é definido como um combustível que compreende ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleos vegetais ou gorduras animais (HOEKMAN *et al.*, 2012). Quimicamente trata-se de uma mistura de alquilésteres de cadeia linear, obtida da transesterificação dos triglicerídeos de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta, em específico o metanol ou etanol, obtendo-se como coproduto desta reação o glicerol (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). Embora o metanol seja amplamente aplicado em escala comercial, devido à sua reatividade, implicando em menor temperatura e tempo de reação, o etanol é consideravelmente menos tóxico, renovável e produz biodiesel com maior número de cetano e lubricidade, ademais, sua produção é consolidada no Brasil (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). A Figura 2.8 ilustra a reação genérica de esterificação, em que os ácidos graxos são convertidos em ésteres alquílicos.

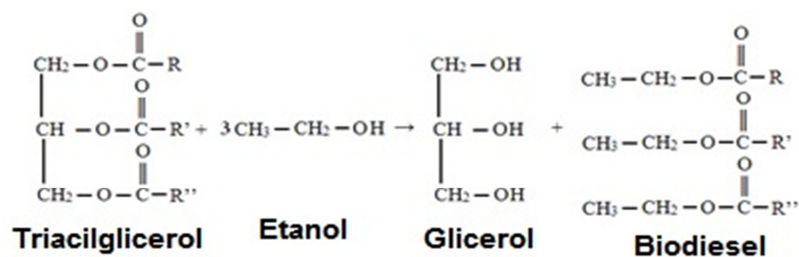
Figura 2.8- Reação de esterificação para formação do biodiesel.



Fonte: Adaptado (VÖLZ, 2009).

Ao empregar-se etanol em lugar de metanol, tem-se a formação de ésteres etílicos (biodiesel de origem etílica) (LEMÕES, 2011; AMARAL, 2014). A Figura 2.9 sintetiza a reação de transesterificação empregando etanol.

Figura 2.9- Reação de transesterificação empregando etanol.



Fonte: Adaptado (ALVES, 2012).

O biodiesel é frequentemente classificado em três gerações (HOEKMAN *et al.*, 2012; LEONG *et al.*, 2018). Biodiesel de primeira geração utiliza óleos vegetais comestíveis como matéria-prima, como óleo de soja, colza, girassol e óleo de palma. Essas matérias-primas utilizadas para produzir biodiesel são conhecidas como triacilglicerídeos (TAGs) (LEONG *et al.*, 2018) e consistem em C16:0 (ácido palmítico), C18:0 (ácido esteárico), C18:1 (ácido oleico) e C18:2 (ácido linoleico) (SAINI *et al.*, 2020; SIDDIKI *et al.*, 2022). O uso de óleos comestíveis para a produção de biodiesel pode levar a um conflito entre energia e alimentação (SIDDIKI *et al.*, 2022). O biodiesel de segunda geração evita este conflito por utilizar matérias-primas não comestíveis, tais como a biomassa de plantas lignocelulósicas, biomassa residual de cultivos e óleos usados (LEONG *et al.*, 2018; SIDDIKI *et al.*, 2022). No entanto, estas matérias-primas para a produção de biodiesel de segunda geração podem não ser suficientes e, além disso, a qualidade das matérias-primas pode afetar a qualidade do produto final (HOEKMAN *et al.*, 2012; LEONG *et al.*, 2018; SIDDIKI *et al.*, 2022).

O biodiesel de terceira geração utiliza óleos microbianos oleaginosos (MA *et al.*, 2018), obtidos de diferentes espécies de microalgas, bactérias, leveduras e fungos que produzem biomassa com alto teor lipídico (LEONG *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2021; SIDDIKI *et al.*, 2022), onde o biodiesel é produzido a partir de biomassa microbiana após extração e transesterificação (CHEN *et al.*, 2021; SIDDIKI *et al.*, 2022).

Embora o biodiesel de terceira geração apresente desvantagens, como altos custos de instalação, processos complexos de extração e necessidade de luz solar (LEONG *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2020), também há muitas vantagens: não precisa de terras agrícolas, o ciclo de crescimento dos microrganismos é curto e este crescimento independe da estação do ano e das condições climáticas (SUBRAMANIAM *et al.*, 2010; SIDDIKI *et al.*, 2022). Além disso, diferentes microrganismos, como as microalgas, consomem CO₂ para acumular lipídios nas células, o que tem um efeito positivo no alívio do aquecimento global (KUMAR *et al.*, 2020; SIDDIKI *et al.*, 2022).

2.9.3 Propriedades do biodiesel

O biodiesel pode ser usado em motores a diesel, puro ou misturado ao diesel, não sendo necessária qualquer modificação nos motores, para que seja utilizado (CHEN *et al.*, 2021). Além dos parâmetros do próprio motor (por exemplo, taxa de compressão, pressão de injeção, relação ar-combustível e turbulência do ar), as propriedades químicas do combustível (por exemplo, viscosidade cinemática, número de cetano, saturação e poder calorífico) também têm um grande efeito sobre o desempenho do motor (CHEN *et al.*, 2021). Sendo assim, para garantir a qualidade do biodiesel, são estabelecidos padrões de qualidade, com o objetivo de fixar limites dos contaminantes, para que não venham a prejudicar a qualidade das emissões da queima, desempenho e integridade do motor, além da segurança no transporte, manuseio e estabilidade no processo de estocagem (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). Diferentes agências regulatórias estabelecem os padrões de qualidade para o biodiesel, sendo no Brasil a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a autoridade responsável. A padronização do biodiesel é estabelecida por diferentes normas, dentre as quais destacam-se e são mais utilizadas: ASTM D6751 (American Society for Testing and Materials - Estados Unidos) e EN 14214 (European Norm - Europa). No Brasil, a Resolução ANP n° 45, de 25/08/2014 determina as diretrizes a serem seguidas em território nacional e é complementada pelo Regulamento Técnico ANP n° 3/2014 que estabelece os

parâmetros especificados para o biodiesel, bem como as metodologias a serem utilizadas (ANP, 2014).

As propriedades do biodiesel são determinadas pelas propriedades dos ésteres graxos que o constituem. Por sua vez, estas propriedades dependem das características e composição em ácidos graxos, bem como, do álcool empregado para gerar os ésteres (CHEN *et al.*, 2021). Dentre as características estruturais dos ácidos graxos que influenciam nas propriedades finais do biodiesel tem-se: o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações nas moléculas de ácidos graxos (KNOTHE; MATHEAUS; RYAN, 2003; KNOTHE, 2014). Portanto, para bons resultados, principalmente quanto à boa performance dos motores a diesel, é necessário analisar e controlar as características físico-químicas do biocombustível.

Dentre as análises importantes para determinar a qualidade do biodiesel tem-se: número de cetano, índice de iodo, estabilidade à oxidação, entre outras (KNOTHE, 2014).

O número de cetano é um valor adimensional referente à qualidade de ignição de um combustível diesel. O número de cetano é determinado pelo tempo de retardamento da ignição, isto é, pelo tempo que se passa entre a injeção do combustível nos cilindros e a ocorrência da ignição. É importante que os valores do número de cetano estejam dentro de uma faixa adequada, pois, caso contrário, o combustível pode ocasionar problemas no bom funcionamento do motor. Se o número de cetano for muito elevado, pode haver a geração de fumaça devido à combustão incompleta, ou seja, elevado risco de a combustão ocorrer antes do combustível e do ar estarem apropriadamente misturados. Por outro lado, valores muito baixos do número de cetano podem causar trepidações e falhas no funcionamento do motor, além de aquecimento lento na primeira partida do dia (KNOTHE; MATHEAUS; RYAN, 2003; KNOTHE, 2014; TALEBI *et al.*, 2013).

O número de cetano do biodiesel depende da matéria-prima utilizada para a sua produção, bem como do tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos e do grau de saturação. Assim, quanto maior o número de carbonos encadeados e mais saturados (ausência de duplas ligações), maior será o valor do número de cetano. Existe uma faixa para este parâmetro de acordo com cada norma;

conforme a norma europeia, o número de cetano deve ser no mínimo 51. Portanto, matérias-primas graxas que contenham um elevado grau de insaturação não são capazes de atender a esse padrão. Índices de cetano baixos estão associados com os componentes altamente insaturados, tais como: ésteres de ácido linoleico (C18:2) e linolenico (C18:3) (KNOTHE; MATHEAUS; RYAN, 2003; KNOTHE, 2014; TALEBI *et al.*, 2013).

De acordo com Talebi *et al.* (2013), 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.

Outra importante propriedade para a qualidade do biodiesel é determinada pelo 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. De acordo com a norma europeia (EN 14214), o índice de iodo é limitado a 120g I₂/100g (RAMOS *et al.*, 2009). Torna-se necessário limitar a quantidade de ácidos graxos insaturados, para a finalidade de produção de biodiesel, pois a presença destes resulta em elevado aquecimento e conseqüente polimerização de triacilgliceróis. Como conseqüência, podem formar-se depósitos, ou a deterioração do lubrificante no motor (RAMOS *et al.*, 2009). Portanto, quanto maior o grau de insaturação, maior o valor do índice de iodo. De acordo com a norma europeia, a quantidade máxima de ácido α -linolênico (C18:3) deve limitar-se a 12,0%, para atender às especificações para o índice de iodo. Contudo, segundo outros autores, essa regra não se confirma. O óleo de palma, rico em ésteres de ácidos graxos saturados, tais como palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), apresenta índice de iodo superior (RAMOS *et al.*, 2009).

Outro importante parâmetro refere-se à estabilidade à oxidação. Este parâmetro, medido em horas, determina por quanto tempo as características do biodiesel serão conservadas sob condições de calor, umidade e armazenamento, presença de traços de metais e condições do tanque de armazenagem. A auto-oxidação do combustível relaciona-se à insaturação, ou seja, à presença de

ácidos graxos contendo duplas ligações em sua estrutura (KNOTHE, 2005; KNOTHE, 2007).

Quanto maior o conteúdo de ésteres alquílicos poli-insaturados nas amostras de biodiesel, mais suscetível a sofrer oxidação, contudo, o biodiesel pode ser tratado com antioxidantes, substâncias tais como o alfa-tocoferol e os butilatos de hidroxianisole e de hidroxitolueno, que aumentam sua estabilidade oxidativa (KNOTHE, 2005; KNOTHE, 2007).

Além das propriedades descritas, existem outras, comuns ou específicas, de acordo com os diversos países que produzem e utilizam biodiesel. Os valores estabelecidos para cada parâmetro podem variar, dependendo até mesmo das condições climáticas e das fontes de matérias primas disponíveis. O presente trabalho visa discutir algumas dessas propriedades, com base na análise de composição em ácidos graxos dos óleos obtidos.

Os diversos procedimentos envolvidos para se determinar experimentalmente os parâmetros de qualidade do biodiesel implicam em elevado custo e, principalmente, requerem uma maior quantidade de produto, o que muitas vezes é inviável de se obter no desenvolvimento da pesquisa. Contudo, é possível determinar diversos parâmetros de qualidade de um biodiesel com base no perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos da matéria-prima de óleo usada na sua fabricação, via *software* patenteado denominado “BiodieselAnalyser” (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014). Portanto, é possível prever as propriedades de um biodiesel potencial, a partir da composição em ácidos graxos do material de interesse.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; MHATRE, A.; PANDIT, R.; LALI, A.M. Synergistic biorefinery of *Scenedesmus obliquus* and *Ulva lactuca* in poultry manure towards sustainable bioproduct generation. **Bioresource Technology**, v. 297, p. 1-10, 2020.

AHMAD, M. T.; SHARIFF, M.; YUSOFF, F.M.; , GOH, Y. M.; BANERJEE, S. Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, p. 328-346, 2018.

ALVES, C. T. **Transesterificação de óleos e gorduras residuais via rotas metálica e etílica utilizando o catalisador Aluminato de Zinco, em presença ou não de CO₂ supercrítico**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Industrial) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

AMOAHA, J., OGURA, K., SCHMETZ, Q., KONDO, A., OGINO, C. Co-fermentation of xylose and glucose from ionic liquid pretreated sugar cane bagasse for bioethanol production using engineered xylose assimilating yeast. **Biomass Bioenergy**, v.128, p. 1-7, 2019.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução ANP N° 45 DE 25/08/2014. **DOU 26.8.2014**, 2014.

ARORA, N.; PATEL, A.; MEHTANI, J.; PRUTHI, A. P.; PRUTHI, V.; POLURI, M. K. Co-culturing of oleaginous microalgae and yeast: paradigm shift towards enhanced lipid productivity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 16952-16973, 2019.

ARUN, J.; GOPINATH, K. P.; SUNDARRAJAN, PS.; FELIX, V.; JOSELYNMONICA, M.; MALOLAN, R. A conceptual review on microalgae biorefinery through thermochemical and biological pathways: Bio-circular approach on carbon capture and wastewater treatment **Bioresource Technology Reports**, v. 11, p. 1-10, 2020.

ASSIS, L. R.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. P.; BERG, E. C.; FEBRONI, L. V.; BARTOLOMEU, T. A. Evaluation of the performance of different materials to support the attached growth of algal biomass. **Algal Research**. v.39, p.1-8, 2019.

BADER, J.; MADST-GERLACH, E.; POPOVIC M.K.; BAJPAI, R.; STAHL, U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 371-387, 2010.

BARNHARST, T., RAJENDRAN, A., HU, B. Bioremediation of synthetic intensive aquaculture wastewater by a novel feed-grade composite biofilm. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p. 131-142, 2018.

BENTO, H.B.S.; CARVALHO, A.K.F.; REIS, C.E.R.; DE CASTRO, H.F. Single cell oil production and modification for fuel and food applications: Assessing the potential of sugarcane molasses as culture medium for filamentous fungus. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 1-7, 2020.

BLAS-VALDIVIA, V.; ORTIZ-BUREÓN, R.; PINEDA-REYNOSO, M.; HERNÁNDEZ-GARCIA, A.; CANO-EUROPA, E. *Chlorella vulgaris* administration prevents HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 53-58, 2011.

BOLINA, I.C.A.; GOMES, R.A.B.; MENDES, A.A. Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: current scenario and future perspectives. **Bioenergy Research**, v. 14, p. 1039-1057, 2021.

BRAUN, S.; VECHTLIFSHITZ, S.E.; Mycelial morphology and metabolite production. **Trends in Biotechnology**, v. 9, p. 63-68, 1991.

BRAUNWALD, T.; SCHWEMMLEIN, L.; GRAEFF-HONNINGER, S.; FRENCH, W.T.; HERNANDEZ, R.; HOLMES, W. E.; CLAUPEIN, W. Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p.6581-6588, 2013.

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.

CAI, S.; HU, C.; DU, S. Comparisons of growth and biochemical composition between mixed culture of alga and yeast and monocultures. **Journal of Biosciences Bioenergies**, v. 104, p.391-397, 2007.

CARVALHO, A. K. F. **Avaliação do potencial do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* como fonte de lipase e lipídios para a produção de biodiesel dentro do conceito de biorrefinaria**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2015.

CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B. S.; REIS, C. E. R.; DE CASTRO, H. F. Sustainable enzymatic approaches in a fungal lipid biorefinery based in sugarcane bagasse hydrolysate as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 269-275, 2019.

CARVALHO, A.K.F.; RIVALDI, J.D.; BARBOSA, J.C.; DE CASTRO, H.F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides* - A sustainable pathway for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 47-53, 2015.

CHATTERJEE, S.; VENKATA M. S. Fungal biorefinery for sustainable resource recovery from waste, **Bioresource Technology**, v. 345, p. 1-15, 2022.

CHEIRSILP, B.; SUWANNARAT, W.; NIYOMDECHA, R. Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. **News in Biotechnology**, v. 28, p. 362-368, 2011.

CHEN, Y.; NIE, X.; YE, J.; WANG, Y.; CHEN, J.; XU, J. 2021, Biodiesel from Microorganisms: A Review. **Energy Technology**, v. 9, p. 1-12, 2021.

CHEN; XU; VAIDYANATHAN, Microalgae: a robust “green bio-bridge” between energy and environment. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, p. 351-368, 2018.

CHEUNG, S. L.; ALLEN, D. G.; SHORT, S. M.; Specific quantification of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* in mixed-species algal biofilms. **Bioresource Technology**, v. 295, p. 1-9, 2020.

CHIU, S.-Y.; KAO, C.-Y.; CHEN, C.-H.; KUAN, T.-C.; ONG, S.-C.; LIN, C.-S. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3389-3396, 2008.

CHOI, Y.Y.; PATEL, A.K.; HONG, M.E.; CHANG, W.S.; SIM, S.J. Microalgae bioenergy with carbon capture and storage (BECCS): an emerging sustainable bioprocess for reduced CO₂ emission and biofuel production. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 1-14, 2019.

CHU, R.; LI, S.; ZHU, L.; YIN, Z.; HU, D.; LIU, C.; MO, F. A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, p. 1-17, 2021.

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

CORONADO-REYES, J. A.; SALAZAR-TORRES J. A.; JUÁREZ-CAMPOS, B.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1-11, 2020.

COX, P.W.; PAUL, G.C.; THOMAS, C.R. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. **Microbiology**, v. 144, p. 817-827, 1998.

DA SILVA, A.P.T.; BREDDA, E.H.; DE CASTRO, H.F.; DA RÓS, P.C.M. Enzymatic catalysis: an environmentally friendly method to enhance the

transesterification of microalgal oil with fusel oil for production of fatty acid esters with potential application as biolubricants. **Fuel**, v. 273, p. 1-7, 2020.

DALIRY, S.; HALLAJSANI, A.; MOHAMMADI, R. J.; NOURI, H.; GOLZARY, A.; Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. **Global Journal of Environmental Science Management**, v.3, p. 217-230, 2017.

DARKI, B.Z.; SEYFABADI, J.; FAYAZI, S. Effect of nutrients on total lipid content and fatty acids profile of *Scenedesmus obliquus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 1-12, 2017.

DASH, A.; BANERJEE, R. Enhanced biodiesel production through phyco-mycro co-cultivation of *Chlorella minutissima* and *Aspergillus awamori*: an integrated approach. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 502-509, 2017.

DU, Y. Z.; ALVARO, J.; HYDEN, B.; ZIENKIEWICZ, K.; BENNING, N.; ZIENKIEWICZ, A.; BONITO, G.; BENNING, C. Enhancing oil production and harvest by combining the marine alga *Nannochloropsis oceanica* and the oleaginous fungus *Mortierella elongata*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 1-16, 2018.

ELOKA-EBOKA, A.C.; INAMBAAO, F.L. Effects of CO₂ sequestration on lipid and biomass productivity in microalgal biomass production. **Applied Energy**, v. 195, p. 1100-1111, 2017.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BATSOS, A.; PANAYOTOU, M. G.; MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 573-580, 2009.

FEOFILOVA, E. P.; SERGEEVA, Y. E.; IVASSHECHKIN, A. A. Content, production, producers, contemporary biotechnology (Review). **Applied Biochemistry Microbiology**, v. 46, p. 369-378, 2010.

FERREIRA M.C.; MEIRELLES, A.J.A.; BATISTA, E.A.C. Study of the fusel oil distillation process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 2336-2351, 2013.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, p. 17-48, 2000.

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

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; HENGSTLER, J.; GOBEL, A.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 87, p. 213-218, 2004.

GULTOM, S.O.; ZAMALLOA, C.; HU, B. Microalgae harvest through fungal pelletization co-culture of *Chlorella vulgaris* and *Aspergillus niger*. **Energies**, v. 7, p. 4417-4429, 2014.

GULTOM, S.; HU, B. Review of microalgae harvesting via co-pelletization with filamentous fungus. **Energies**, v.6, p. 5921-5939, 2013.

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

HONARY, L.; RICHTER, E. **Bio-Based Lubricants and Greases**. New Jersey: John Willey and Sons Ltd, 2013.

HUO, S.; DONG, R.; WANG, Z.; PANG, C.; YUAN, Z.; ZHU, S.; CHEN, L. Available resources for algal biofuel development in China. **Energies**, v. 4, p. 1321-1335, 2011.

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

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Enhanced lipid production by co-cultivation and co-encapsulation of oleaginous yeast *Trichosporonoides spathulata* with microalgae in alginate gel beads. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 173, p.522-534, 2014.

KNOTHE, G. A comprehensive evaluation of the cetane numbers of fatty acid methyl esters. **Fuel**, v. 119, p. 6-13, 2014.

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

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, v. 88, p. 669-677, 2007.

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

KOWAL, P.; CIESIELSKI, S.; OTIENO, J.; MAJTACZ, J.B.; CZERWIONKA, K.; MAKINIA, J. Denitrification process enhancement and diversity of the denitrifying community in the full scale activated sludge system after adaptation to fusel oil. **Energies**, v. 14, p. 1-20, 2021.

KRULL, R.; CORDES, C.; HORN, H.; KAMPEN, I.; KWADE, A.; NEU, T.R.; NORTEMANN, B. Morphology of filamentous fungi: Linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. In: WITTMANN, C.; KRULL, R., eds. *Biosystems Engineering II: Linking Cellular Networks and Bioprocesses*. Heidelberg: Springer, 2010. v.121, p. 1-21.

KRULL, R.; WUCHERPFENNIG, T.; ESFANDABADI, M. E.; WALISKO, R.; MELZER, G.; HEMPEL, D.C.; KAMPEN, I.; KWADE, A.; WITTMANN, C. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 112-123, 2013.

KULKARNI, R.D.; DESHPANDE, P.S.; MAHAJAN, S.U.; MAHULIKAR, P.P. Epoxidation of mustard oil and ring opening with 2-ethylhexanol for biolubricants with enhanced thermo-oxidative and cold flow characteristics. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 586-592, 2013.

KUMAR, A.K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresource Bioprocess**, v.4, p.1-19, 2017.

KUMAR, M.; SUN, Y.; RATHOUR, R.; PANDEY, A.; THAKUR, I. S.; TSANG, D. C. W. Algae as potential feedstock for the production of biofuels and value-added products: Opportunities and challenges. **The Science of the Total Environment**, v. 716, p. 1-17, 2020.

KUO, C.-M.; LIN, T.-H.; YANG, Y.-C.; ZHANG, W.-X.; LAI, J.-T.; WU, H.-T.; CHANG, J.-S.; LIN, C.-S. Ability of an alkali-tolerant mutant strain of the microalga *Chlorella* sp. AT1 to capture carbon dioxide for increasing carbon dioxide utilization efficiency. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 243-251, 2017.

LEMÕES, J. S. **Síntese de Ésteres Graxos de *Chlorella* sp . utilizando os processos de Extração-Transesterificação e Transesterificação in situ**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, 2011.

LEONG, W-H.; LIM, J-W.; LAM, M-K.; UEMURA, Y.; HO, Y-C. Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 950-961, 2018.

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

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

MA, Y.; GAO, Z.; WANG, Q.; LIU, Y. Biodiesels from microbial oils: opportunity and challenges. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 631-641, 2018.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 84, p. 281-291, 2009.

MANTZOROU, A.; VERVERIDIS, F. Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 3187- 3201, 2019.

MASLOVA, O.; STEPANOV, N.; SENKO, O.; EFREMENKO, E. Production of various organic acids from different renewable sources by immobilized cells in the regimes of separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SFF). **Bioresource Technology**, v. 272, p. 1-9, 2019.

MASUDI, A.; MURAZA, O. Vegetable oil to biolubricants: review on advanced porous catalyts. **Energy & Fuels**, v. 32, p. 10295-10310, 2018.

METZ, B.; KOSSEN, N.W.F. The growth of molds in the form of pellets—A literature review. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 19, p. 781-799, 1977.

MIRANDA, A. F., TAHA, M., WREDE, D., MORRISON, P., BALL, A. S., STEVENSON, T., MOURADOV, A. Lipid production in association of filamentous fungi with genetically modified cyanobacterial cells. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 1-18, 2015.

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

MURADOV, N.; MOHAMED, T.; MIRANDA, A. F.; DIGBY, W.; KRISHNA, K.; AMIT, G.; TREVOR, S.; BALL, A. S.; MOURADOV, A. Fungal-assisted algal flocculation: application in wastewater treatment and biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, v.8, p.320-329, 2015.

NAGENDRAMMA, P.; KAUL, S. Development of ecofriendly/biodegradable lubricants: an overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 764-774, 2012.

OKORO, V.; AZIMOV, U.; MUNOZ, J.; HERNANDEZ, A.H.; PHAN, A. N. Microalgae cultivation and harvesting: Growth performance and use of flocculants - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 1-16, 2019.

OLAIZOLA, M., Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p. 459-466, 2003.

PADMAPERUMA, G.; KAPOORE, R. V.; GILMOUR, D. J.; VAIDYANATHAN, S. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, p. 690-703, 2018.

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

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 1031-1051, 2011.

PRAJAPATI, S. K.; KUMAR, P.; MALIK, A. Exploring pellet forming filamentous fungi as tool for harvesting non-flocculating unicellular microalgae, **BioEnergy Research**, v. 7, p. 1430-1440, 2014.

QIAO, S.; SHI, Y.; WANG, X.; LIN, Z.; JIANG, Y. Synthesis of biolubricant trimethylolpropane trioleate and its lubricant base oil properties. **Energy Fuels**, v. 31, p. 7185-7190, 2017.

RAJENDRAN, A.; FOX, T.; HU, B. Nutrient recovery from ethanol co-products by a novel mycoalgae biofilm: attached cultures of symbiotic fungi and algae. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 1766-1776, 2017.

RAJENDRAN, A.; HU, B. Mycoalgae biofilm: Development of a novel platform technology using algae and fungal cultures. **Biotechnology Biofuels**, v. 9, p. 1-13, 2016.

RAKESH, S.; SAXENA, S.; DHAR, D.W.; PRASANNA, R.; SAXENA, A.K. Comparative evaluation of inorganic and organic amendments for their flocculation efficiency of selected microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 399-406, 2014.

RAMARAJ, R.; UNPAPROM, Y.; DUSSADEE, N. Cultivation of green microalga, *Chlorella vulgaris* for biogas purification. **International Journal of New Technology and Research**, v. 2, p. 117-122, 2016.

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

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, v. 86, p.807-815, 2004.

REIS, C. E. R.; RAJENDRAN, A.; SILVA, M. B.; HU, B.; DE CASTRO, H. F. The application of microbial consortia in a biorefinery context: understanding the

importance of artificial lichens, In: SINGH, O., CHANDEL, A. (eds) Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy. New York: Springer, Cham, 2018, p. 423-437.

REIS, C.E.R.; BENTO, H.B.S.; CARVALHO, A.K.F.; RAJENDRAN, A.; HU, B.; DE CASTRO, H.F. Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, p. 555-570, 2019.

REIS, C.E.R.; VALLE, G.F.; BENTO, H.B.S.; CARVALHO, A.K.F.; ALVES, T.A.; DE CASTRO, H.F. Sugarcane by-products within the biodiesel production chain: vinasse and molasses as feedstock for oleaginous fungi and conversion to ethyl esters. **Fuel**, v. 277, p. 1-7, 2020.

RODRIGUEZ-GARCIA, I.; GUIL-GUERRERO, J. L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1023-1026, 2008.

SAINI, R.; HEGDE, K.; BRAR, S.K.; VEZINA, P. Advanced biofuel production and road to commercialization: an insight into bioconversion potential of *Rhodospiridium* sp. **Biomass Bioenergy**, v. 132, p. 1-11, 2020.

SHAHRYARI, Z.; FAZAEIPOOR, M.H.; GHASEMI, Y.; LENNARTSSON, P.R.; TAHERZADEH, M.J.; Amylase and xylanase from edible fungus *Neurospora intermedia*: production and characterization. **Molecules**, v. 24, p. 1-14, 2019.

SHARMA, B.K.; BIRESAW, G. **Environmental Friendly and Biobased Lubricants**. London: CRC Press, 2017.

SHU, C-H.; TSAI, C-C.; CHEN, K-Y.; LIAO, W-H.; HUANG, H-C. Enhancing high quality oil accumulation and carbon dioxide fixation by a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Taiwan Institute Chemical Engineering**, v. 44, p.936-942, 2013.

SHUBA, E. S.; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 743-755, 2018.

SIBI, G., SHETTY, V., MOKASHI, K. Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels - a review. **Journal of Energy Institute**, v. 89, p. 330-334, 2016.

SIDDIKI, S.K.; ARAFAT, Y.; MOFIJUR, M.; KUMAR P.S.; AHMED, S.F.; INAYAT, A.; KUSUMO, F.; BADRUDDIN, I.A.; KHAN, T.M.Y.; NGHIEM, L.D.; ONG, H.C.; MAHLIA, T.M.I. Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: an integrated biorefinery concept. **Fuel**, v. 307, p. 1-31, 2022.

SILABAN, A.; BAI, R.; GUTIERREZ-WING, M.T.; NEGULESCU I.I.; RUSCH, K.A. Effect of organic carbon, C:N ratio and light on the growth and lipid productivity of microalgae/cyanobacteria coculture. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, p. 47-56, 2014.

SIMSEK, S.; OZDALYAN, B. Improvements to the composition of fusel oil and analysis of the effects of fusel oil–gasoline blends on a spark-ignited (SI) engine's performance and emissions. **Energies**, v. 11, p. 1-13, 2018.

SINGH, D.; SHARMA, D.; SONI, S.L.; SHARMA, S.; SHARMA, P. K.; JHALANI, A. A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel. **Fuel**, v. 262, p. 1-15, 2020.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Microalgae harvesting techniques: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 217, p. 499-508, 2018.

SITEPU, I. R.; SESTRIC, R.; IGNATIA, L.; LEVIN, D.; GERMAN, J. B.; GILLIES, L. A.; ALMADA, L. A.; BOUNDY-MILLS, K.L. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 360-369, 2013.

SRINUANPAN, S.; CHEIRSILP, B.; PRASERTAN, P.; KATO, Y.; ASANO, Y. Photoautotrophic cultivation of oleaginous microalgae and co-pelletization with filamentous fungi for cost-effective harvesting process and improved lipid yield. **Aquaculture International**, v. 26, p. 1493-1509, 2018.

SUBRAMANIAM R.; DUFRECHE S.; ZAPPI M.; BAJPAI R. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1271-1287, 2010.

SUPARMANIAM, U.; LAM, M. K.; UEMURA, Y.; LIMB, J. W.; LEED, K. T.; SHUITE, S. H. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 1-23, 2019.

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

TALEBI, A.F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. BiodieselAnalyzer: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, v. 2, p. 55-57, 2014.

TANG, X.; CHEN, H.; CHEN, Y. Q.; CHEN, W.; GARRE, V.; SONG, Y.; RATLEDGE, C. Comparison of biochemical activities between high and low lipid-

producing strains of *Mucor circinelloides*: an explanation for the high oleaginicacy of strain WJ11. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1-12, 2015.

TINÔCO, D.; CASTRO, A.M.; SELDIN, L.; FREIRE, D.M.G. Production of (2R,3R)-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* PM 3605 from crude glycerol supplemented with sugarcane molasses. **Process Biochemistry**, v. 106, p. 88-95, 2021.

VALDOVINOS-GARCÍA, E.M.; BARAJAS-FERMÁNDEZ, J.; DE LOS ÁNGELES, O.-A. M.; PETRIZ-PRIETO, M.A.; GUZMÁN-LÓPEZ, A.; BRAVO-SÁNCHEZ, M.G.; PATEL, A.; MU, L.; SHI, Y.; ROVA, U. Isolation and characterization of two microalgal isolates from Vietnam with potential for food, feed, and biodiesel production. **Energies**, v. 13, p. 1-19, 2020.

VANHERCKE, T.; EL TAHCHY, A.; SHRESTHA, P.; ZHOU, X. R.; SINGH, S. P.; PETRIE, J. R. Synergistic effect of WRI1 and DGAT1 coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants. **FEBS Letters**, v. 587, p. 364-369, 2013.

VECHT-LIFSHITZ, S.E.; MAGDASSI, S.; BRAUN, S. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. **Biotechnology Bioenergie**, v. 35, p. 890-896, 1990.

VILAS BÔAS, R.N.; BIAGGIO, F.C.; GIORDANI, D.S.; DE CASTRO, H.F. Enzymatic synthesis of isopentyl caprylate using fúsel oil as feedstock. **Química Nova**, v. 40, p. 541-547, 2017.

VÖLZ, M. D. de A. **Biodiesel a partir de óleos de alta acidez: desenvolvimento de um processo catalítico homogêneo**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, v.129, p.7-11, 2013.

WREDE, D.; TAHA, M.; MIRANDA, A. F.; KADALI, K.; STEVENSON, T.; BALL, A. S.; MOURADOV, A. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. **PloS One**, v. 9, p. 1-22, 2014.

XIN, L.; HU, H. Y.; KE, G.; SUN, Y. X. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5494-5500, 2010.

XUE, F.; MIAO, J.; ZHANG, X.; TAN, T. A new strategy for lipid production by mix cultivation of *Spirulina platensis* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 498-503, 2010.

YEN, H-W.; CHEN, P-W.; CHEN, L-J. The synergistic effects for the cocultivation of oleaginous yeast-*Rhodotorula glutinis* and microalgae-*Scenedesmus obliquus* on the biomass and total lipids accumulation. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 148-152, 2015.

ZAMALLOA, C.; GULTOM, S. O.; RAJENDRAN, A.; HU, B. Ionic effects on microalgae harvest via microalgae fungi co-pelletization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 145-155, 2017.

ZHANG, J.; HU, B. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 529-535, 2012.

ZHANG, Z.; JI, H.; GONG, G.; ZHANG, X.; TAN, T. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 93-99, 2014.

ZHOU, W.; CHENG, Y.; LI, Y.; WAN, Y.; LIU, Y.; LIN, X.; RUAN, R. Novel fungal pelletization-assisted technology for algae harvesting and wastewater treatment. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.167, p. 214-228, 2012.

ZMAK, P. M.; PODGORNIK, A.; PODGORNIK, H.; KOLOINI T. Impact of pellet size on growth and lignin peroxidase activity of *Phanerochaete chrysosporium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1243-1249, 2006.

ZNIDARSIC, P.; PAVKO, A. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, p.237-252, 2001.

ZUCCARO, G.; DEL MONDO, A.; PINTO, G.; POLLIO, A.; DE NATALE, A. Biorefinery-based approach to exploit mixed cultures of *Lipomyces starkeyi* and *Chloroidium saccharophilum* for single cell oil production. **Energies**, v. 14, p. 1-20, 2021.

ZUROFF, T. R.; CURTIS, W. R. Developing symbiotic consortia for lignocellulosic biofuel production. **Applied Microbiology for Biotechnology**, v. 93, p. 1423-1435, 2012.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Microrganismos

Na primeira etapa da pesquisa foi utilizada a linhagem de microalga *Chlorella vulgaris* BMAK D07 doada pelo Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. Na sequência, investiu-se nos estudos com a espécie *Scenedesmus obliquus* CCMA-UFSCar 604, adquirida da Universidade Federal de São Carlos.

A linhagem do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* f. *griseo-cyanus* URM 4182 adquirida da coleção de culturas da Micoteca URM (CCB/Universidade Federal de Pernambuco), previamente selecionada como potencial produtora de *single cell oil* (CARVALHO *et al.*, 2015) foi utilizada em todas as etapas da pesquisa, para a formação de líquens artificiais com ambas espécies de microalgas.

3.1.2 Meios de cultivo

Para a realização de todos os experimentos, dois meios de cultivo distintos foram utilizados. Para o cultivo do fungo filamentoso *M. circinelloides* e da microalga *C. vulgaris*, foi empregado o meio de cultivo A, previamente estabelecido para estudos de liquenização (RAJENDRAN; HU, 2016), composto de: 2 g/L glicose, 1 g/L KNO₃, 0,075 g/L KH₂PO₄, 0,1 g/L K₂HPO₄, 0,5 g/L MgSO₄.2H₂O, 0,0625 g/L Ca(NO₃)₂.4H₂O, 0,01 g/L FeSO₄.7H₂O, 0,5 g/L extrato de levedura e solução de metais a 1 mL/L, composta de: 2,86 g/L H₃BO₃, 0,39 g/L Na₂MoO₄.2H₂O, 0,22 g/L ZnSO₄.7H₂O, 1,81 g/L MnCl₂.4H₂O, 0,079 g/L CuSO₄.5H₂O e 0,049 g/L Co(NO₃)₂.6H₂O.

Para o cultivo da espécie *S. obliquus*, foi utilizado o meio de cultivo WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972), composto de: 36,76 mg/L CaCl₂.2H₂O, 36,97 mg/L MgSO₄.7H₂O, 12,60 mg/L NaHCO₃, 8,71 mg/L K₂HPO₄, 85,01 mg/L NaNO₃, de solução de metais, composta de: 4,36 mg/L Na₂EDTA, 3,15 mg/L FeCl₃.6H₂O,

0,01 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,022 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,18 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,006 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0 mg/L H_3BO_3 e de solução de vitaminas composta de 0,1 mg/L Tiamina HCl, 0,5 $\mu\text{g/L}$ Biotina e 0,5 $\mu\text{g/L}$ Cobalamina. Todos os reagentes dosados a 1 ml/L de meio de cultivo.

3.1.3 Melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e nutrientes

O melaço de cana-de-açúcar (MC) foi utilizado como suplemento ao meio de cultivo WC da espécie *S. obliquus*.

Este suplemento foi fornecido pela empresa Melaço de Cana (Saltinho, SP, Brasil).

Sua principal composição consiste em açúcares totais (59,7%), sacarose (39,9%), frutose (7,5%), glicose (5,5%) e minerais: potássio, magnésio, sódio, ferro, manganês, cálcio, zinco, cobre e cobalto em menores proporções.

3.1.4 Catalisador químico

As reações de síntese de biolubrificante e biodiesel foram efetuadas empregando catalisador químico heteropoliácido suportado em óxido de nióbio ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}/\text{Nb}_2\text{O}_5$). O heteropoliácido ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) suportado por óxido de nióbio (Nb_2O_5) foi preparado pelo método de impregnação por umidade incipiente, descrito por Da Conceição *et al.* (2019). Para cada reação, 0,6 g do catalisador heteropoliácido foram dissolvidos em 0,72 mL de solução de álcool (70%) à temperatura ambiente.

A suspensão obtida foi misturada com 2,0 g do suporte (Nb_2O_5) para atingir uma concentração final de catalisador de 30% em peso. O sólido obtido foi seco a 100°C por 30 min e calcinado posteriormente. O procedimento de calcinação foi realizado em duas etapas, ambas sob temperatura de 300°C. A primeira etapa durou 1 hora e a segunda etapa, 3 horas.

Titulações ácido-base foram usadas para determinar a acidez da superfície do catalisador. Em uma medição típica, 0,1 g de sólido foi suspenso em 20 mL de NaOH 0,1 mol/L. A suspensão foi agitada por 3 horas a 25°C e titulada com 0,1

mol/L HCl na presença de fenolftaleína. A acidez superficial do catalisador foi expressa em mmol H⁺/g catalisador, segundo Da Conceição (2019).

3.1.5 Outros materiais

- ✓ Tela de fibra de algodão: lavada em água destilada, seca e cortada em peças nas dimensões 2,5 x 2,5 cm, utilizada como suporte para a formação de liquens.
- ✓ Hexano P.A.: usado como solvente na síntese de biolubrificante, na concentração 40% v/v.
- ✓ Óleo fúsel simulado: usado como receptor acila na síntese de biolubrificante, mistura de álcoois composta por 10% v/v de álcool etílico, 8% v/v de álcool butílico e 65% v/v de álcool isoamílico.
- ✓ Etanol 98,5% P.A.: utilizado como solvente e reagente na síntese de biodiesel.
- ✓ Amberlite BD10DRY: resina adsorvente utilizada na etapa de purificação do biolubrificante e biodiesel brutos, de acordo com o método descrito por Santos *et al.* (2017).

3.2 Metodologia experimental e analítica

3.2.1 Preparo de concentrados de células e de suspensão de esporos

Para obter células de *C. vulgaris* na quantidade necessária ao trabalho de pesquisa, foram efetuados cultivos em bancada, em erlenmeyers de 2L, sob iluminação de lâmpadas tubulares de led branco (100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) e aeração constantes, em meio de cultivo A isento de glicose, por aproximadamente 7 dias. Células destes cultivos foram semanalmente examinadas ao microscópio, para garantir sua integridade.

Para as células de *S. obliquus*, as mesmas condições de cultivo em bancada foram adotadas, exceto que o meio de cultivo utilizado para esta espécie foi o meio de cultivo WC. Para ambas as microalgas, as cepas foram preservadas em pequenos cultivos estáticos, abaixo de 20 ± 1 °C, renovados mensalmente e a

preparação dos concentrados de células foi efetuada de acordo com o protocolo estabelecido no laboratório de microalgas (LOURES *et al.*, 2018).

Os esporos do fungo filamentosos foram mantidos em tubos de ensaio em refrigerador em meio DPA (*Potato Dextrose Agar*), seguindo as práticas de rotina do laboratório de biocatálise (CARVALHO *et al.*, 2015).

3.2.2 Contagem de células microalgais e de esporos fúngicos

A contagem de células microalgais e de esporos suspensos em meio de cultivo foi realizada em microscópio ótico com câmara de Neubauer (CARVALHO, 2015).

3.2.3 Determinação da concentração de açúcares totais

A concentração de açúcares totais no meio de cultivo foi estimada pelo método colorimétrico Fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

3.2.4 Determinação da concentração de clorofila A

A concentração de clorofila A (Chl-a) foi determinada pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Rajendran e Hu (2016), que correlaciona as leituras de absorvância no comprimento de onda de 665 nm à biomassa de microalgas em miligramas.

3.2.5 Estratégias de cocultivo

Quatro estratégias de cocultivo foram avaliadas, para a formação de líquens com as espécies *C. vulgaris* e *M. circinelloides*, conforme descrito no Quadro 3.1.

Quadro 3.1- Estratégias de cocultivo de líquens.

Estratégia	Protocolo
I	100 mL de meio de cultura foram inoculados simultaneamente com $2,55 \times 10^8$ células de microalgas e $8,5 \times 10^5$ esporos de fungos e incubados por 180 h.
II	100 mL de meio de cultura foram inoculados simultaneamente com $2,55 \times 10^8$ células de microalgas e $8,5 \times 10^5$ esporos de fungos e incubados por 180 h com um suporte de tela de fibra de algodão.
III	100 mL de meio de cultura foram inoculados com $8,5 \times 10^5$ esporos fúngicos e incubados por 72 h. Após 72 h de crescimento do fungo, $2,55 \times 10^8$ células de microalgas foram adicionadas à cultura do fungo, permanecendo em incubação até completar 180 h.
IV	50 mL de meio de cultura foram inoculados com $4,25 \times 10^5$ esporos e, concomitantemente, em outro erlenmeyer, 50 mL de meio de cultura foram inoculados com $1,275 \times 10^8$ células de microalgas. Ambos os frascos foram incubados por 72 h, seguido da transferência das culturas isoladas para um único frasco de 250 mL, permanecendo em incubação até completar 180 h.

Fonte: Própria autora.

Posteriormente, a estratégia que apresentou melhores resultados em termos de contribuição de biomassa de algas na composição dos líquens, bem como, de eficiência de recuperação de células, foi reaplicada para a formação de líquens artificiais com as espécies *S. obliquus* e *M. circinelloides*.

3.2.6 Parâmetros dos cultivos em *shaker* orbital para *C. vulgaris* e *M. circinelloides*

Os cultivos da microalga *C. vulgaris* e os cocultivos dos líquens com as espécies *C. vulgaris* e *M. circinelloides* foram efetuados em *shaker* orbital adaptado com iluminação de led branco, sob intensidade luminosa constante equivalente a $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a 140 rpm e temperatura de $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os cultivos do fungo filamentoso *M. circinelloides* foram efetuados em outro *shaker* orbital, a 250 rpm e temperatura de $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, porém, sem iluminação. A Figura 3.1 mostra o equipamento utilizado com um cultivo em andamento.

Figura 3.1- Aspecto do *shaker* orbital adaptado para o cultivo de microalgas.



Fonte: Própria autora.

3.2.7 Parâmetros dos cultivos em *shaker* orbital para *S. obliquus* e *M. circinelloides*

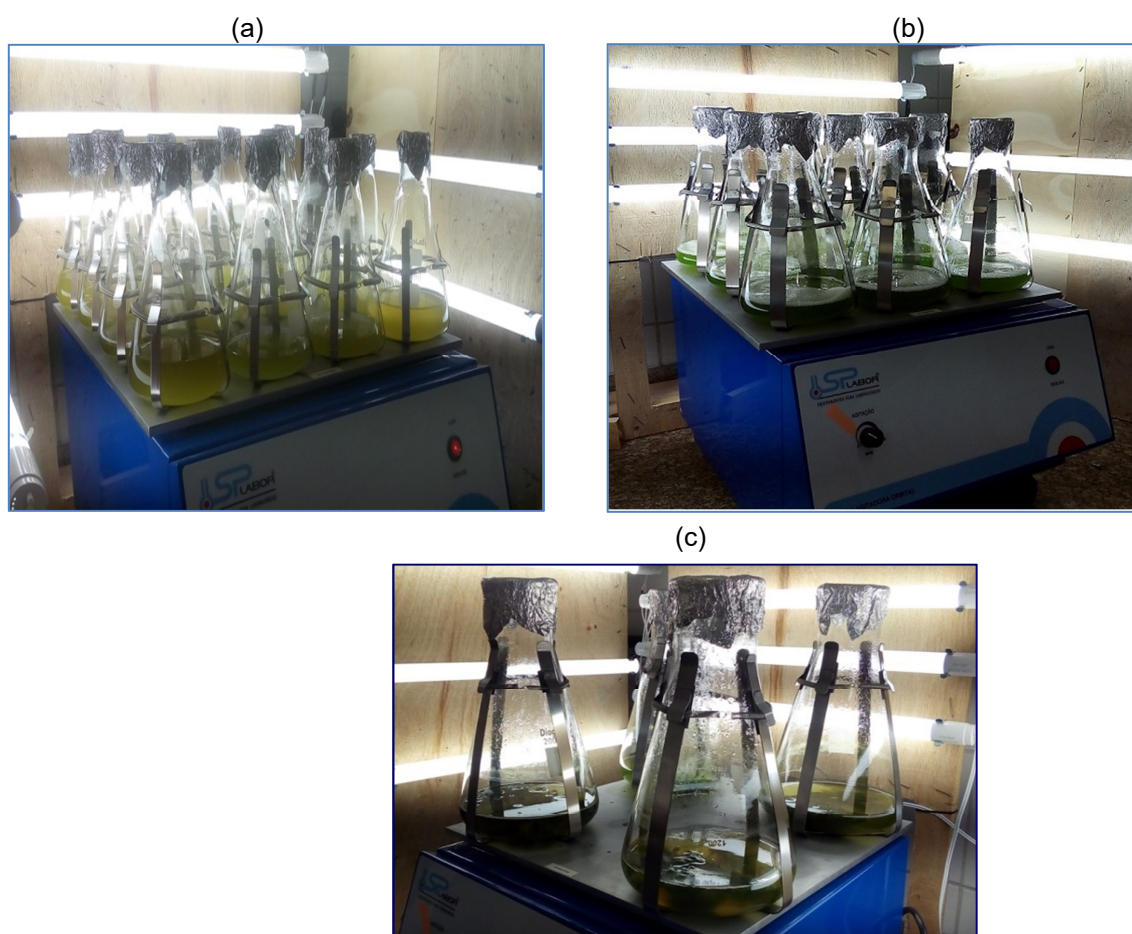
Para as culturas isoladas da microalga *S. obliquus* e do fungo filamentososo, foram utilizados dois *shakers* orbitais diferentes, com volume individual de 50 mL de meio de cultura em cada frasco de 250 mL e tempo de incubação de 72 h para ambos os microrganismos. As culturas de fungos foram realizadas a 250 rpm, $26 \pm 1^\circ\text{C}$, e as culturas de microalgas a 140 rpm, $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Para o crescimento de microalgas, o *shaker* orbital foi adaptado com iluminação LED branca ($150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$).

Para cada batelada de cultivos isolados, preparou-se um total de 0,9 L de meio de cultivo. Cada frasco de meio de cultivo A foi inoculado com $4,25 \times 10^5$ esporos e, para o cultivo de microalgas, cada frasco de meio de cultivo WC recebeu $1,275 \times 10^8$ células de microalgas. Após esse tempo, cada micélio cultivado com fungos (0,05 g de peso seco) foi colhido por filtração e adicionado a um único frasco de 250 mL contendo cultivo de células de microalgas e a incubação continuou por mais 108 h; ao final desse período, a biomassa dos consórcios foi colhida por filtração.

3.2.8 Parâmetros dos cultivos e cocultivos em mesa agitadora orbital

O equipamento mesa agitadora orbital analógica foi utilizado para o cultivo da espécie *S. obliquus*, e para os respectivos cocultivos desta espécie com o fungo filamentoso, na etapa final do trabalho de pesquisa (capítulo 6). Os parâmetros de cultivo e cocultivo neste equipamento foram: adaptação com iluminação de luz de led branca, intensidade luminosa constante equivalente a $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, a 140 rpm e temperatura ambiente de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. A Figura 3.2 ilustra o equipamento utilizado na etapa final da pesquisa, operando com os diferentes tamanhos de frascos.

Figura 3.2- Mesa agitadora orbital analógica para o cultivo da microalga *S. obliquus*, e para os cocultivos dos líquens, adaptada com painéis de lâmpadas tubulares de led, montados ao fundo e nas laterais, operando com diferentes tamanhos de frascos: (a) 14 frascos Erlenmeyers de 0,5 L, (b) 9 frascos Erlenmeyers de 1,0 L e 4 frascos erlenmeyers de 2,0 L.



Fonte: Própria autora.

Células da microalga *S. obliquus* foram inoculadas em frascos erlenmeyers de três tamanhos diferentes (500 mL, 1000 mL e 2000 mL), com os respectivos volumes de meio de cultivo: 100 mL, 200 mL e 400 mL. Em 100 mL de meio de cultivo WC e erlenmeyers de 500 mL, foram inoculadas $2,55 \times 10^8$ células por mL. Em 200 mL de meio de cultivo WC e erlenmeyers de 1000 mL, e, em 400 mL de meio de cultivo WC e erlenmeyers de 2000 mL, foram inoculadas respectivamente $5,10 \times 10^8$ células por mL e $10,2 \times 10^8$ células por mL.

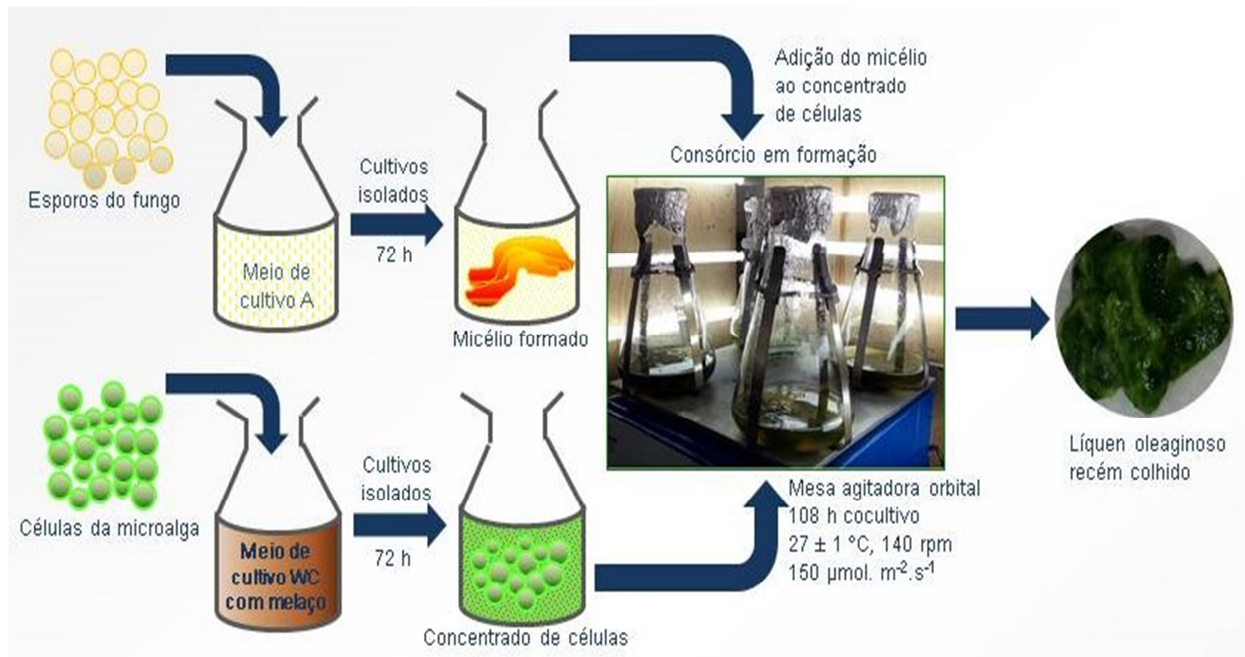
O melaço de cana-de-açúcar (MC) foi adicionado ao meio de cultivo WC, à proporção de 0,6 g/L, em todos os cultivos efetuados. O cultivo de fungos foi mantido em meio de cultivo A, a 250 rpm, 26 ± 1 ° C em *shaker* orbital.

Os frascos foram incubados separadamente por um período de 72 h. Após 72 h de incubação, os micélios fúngicos foram colhidos por filtração e adicionados aos frascos erlenmeyers contendo o cultivo de células de microalgas, permanecendo em incubação por mais 108 h.

Devido ao aumento do volume de meio de cultivo e da quantidade de células de microalgas, aumentou-se proporcionalmente a quantidade de micélios adicionados para a formação dos líquens: para 100 mL, foram adicionados 2 micélios fúngicos; para 200 mL, 4 micélios fúngicos e para 400 mL foram adicionados 8 micélios fúngicos. Ao final do período de 108 h, a biomassa dos consórcios (líquens) foi colhida por filtração. Todos os cultivos foram efetuados em triplicata.

A Figura 3.3 ilustra resumidamente as sequências descritas para a formação do consórcio microbiano.

Figura 3.3- Sequência de etapas para a formação de um consórcio alga:fungo entre as cepas de *S. obliquus* e *M. circinelloides*, em mesa agitadora orbital analógica.



Fonte: Própria autora.

3.2.9 Colheita da biomassa e determinação de massa seca

O micélio de fungo filamentososo e a biomassa de líquen (consórcio microbiano) foram colhidos do meio de cultivo por filtração simples. Para a determinação da massa seca, foi utilizada balança de secagem acoplada com infra-vermelho (modelo MOC63u, Shimadzu).

3.2.10 Cálculo de parâmetros bioquímicos com base em dados de cultivo

A biomassa de algas e de consórcio alga:fungo e os lipídios foram avaliados em termos de concentração e produtividade. De acordo com as equações 3.1 a 3.5, X significa a concentração de biomassa, em mg/L, P significa a concentração de lipídios, em mg/L, %P significa o percentual de lipídios sobre a biomassa seca. Os resultados também foram analisados considerando a produtividade volumétrica de biomassa (Qx), e de lipídios (Qp), expressa em mg/L.dia.

$$X = \frac{\text{biomassa seca (mg)}}{\text{volume de cultivo (L)}} \quad (3.1)$$

$$P = \frac{\text{lipídios em massa (mg)}}{\text{volume de cultivo (L)}} \quad (3.2)$$

$$\%P = \frac{\text{lipídios em massa (mg)}}{\text{biomassa seca (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$Qx = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (3.4)$$

$$Qp = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (3.5)$$

3.2.11 Contribuição das biomassas de alga e fungo na biomassa dos líquens

A contribuição da biomassa microalgal à biomassa liquenizada foi estimada indiretamente pela medição da concentração de clorofila A (Chl-a), por espectrofotometria UV-VIS (Varian Cary 5000) no comprimento de onda de 665 nm (RAJENDRAN; HU, 2016). Sabendo-se a contribuição da biomassa de algas, o valor da contribuição da biomassa fúngica foi calculado por diferença entre a biomassa total e a biomassa microalgal. Na estratégia de formação de líquens que empregou a tela de algodão como suporte, a massa seca da tela também foi subtraída, para o cálculo da contribuição da biomassa de algas e da biomassa fúngica.

3.2.12 Determinação da eficiência de recuperação de células (ER)

A eficiência de recuperação de células de microalgas é uma fórmula para se calcular a porcentagem de células de microalgas que foram retiradas do meio de cultivo, através do processo de formação do líquen. Após a colheita do líquen, uma alíquota do caldo restante foi coletada e efetuada a leitura da absorbância a 665 nm. Posteriormente, a leitura da absorbância foi correlacionada com a

biomassa em mg, através de equação de correlação (RAJENDRAN; HU, 2016). A biomassa suspensa no meio de cultivo corresponde ao total de células em suspensão que não foram recuperadas na formação do líquen.

A eficiência de recuperação (ER), em %, foi calculada de acordo com a equação 3.6:

$$ER (\%) = \frac{(Biomassa\ microalgas\ total - Biomassa\ microalgas\ suspensa)}{Biomassa\ microalgas\ total} \times 100 \quad (3.6)$$

3.2.13 Extração de lipídios das biomassas de algas, fungo e líquens

Os lipídios totais, nas amostras de biomassa contendo aproximadamente 70% de umidade, foram quantificados por extração realizada em um sistema de digestão com irradiação na região de micro-ondas (CEM Discover DU-8081) utilizando 0,5 g de biomassa (base seca) suspensa em 50 mL de etanol 96% como solvente, à temperatura de 60 °C, em três ciclos de 30 min, conforme metodologia descrita por Carvalho *et al.* (2015).

3.2.14 Composição em ácidos graxos dos óleos microbianos extraídos

A composição em ácidos graxos dos óleos extraídos da biomassa foi determinada pelo método adaptado AOCS Ce 1-62 via metilação, usando mistura de metanol/BF₃. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram identificados por um cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama (GC, PerkinElmer® - Clarus 580) usando uma coluna capilar de 30 m (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano fase estacionária) de 0,25 mm de diâmetro interno. O nitrogênio foi o gás transportador (1 mL/min). Os ésteres metílicos foram identificados pelo uso de um padrão de mistura de ésteres (MIX Supelco® FAME – C6:0 - ácido cáprico a C24:0 - ácido lignocérico) e quantificados relativamente pela normalização das áreas de pico calculadas.

3.2.15 Análises de caracterização

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier por refletância total atenuada (ATR-FTIR) foi usada para analisar as funções orgânicas de diferentes amostras de biomassas: da microalga e do fungo (obtidos em cultivos distintos) e do consórcio (biomassa de líquens formados após o cocultivo). O equipamento empregado foi o espectrômetro Shimadzu FTIR, modelo IRP PRESTIGE-21. Os espectros de ATR-FTIR das amostras foram obtidos a partir da acumulação de um total de 32 varreduras no intervalo de 4000 - 400 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} , empregando-se brometo de potássio (KBr) como matriz (ZORN *et al.*, 2020).

Detalhes da interação física entre a microalga e o fungo filamentosos foram estudados com um microscópio eletrônico de varredura (MEV) de mesa Hitachi TM 3000 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tóquio, Japão). Para esta análise, a biomassa do consórcio foi seca em dessecador a vácuo até peso constante. Em seguida, a umidade residual foi removida mantendo a amostra em um forno a 100°C por 60 min. As amostras de biomassa seca, em grãos, foram metalizadas com prata e levadas ao microscópio eletrônico de varredura (ZORN *et al.*, 2022).

Nas amostras de biolubrificante e biodiesel, os glicerídeos residuais (monoacilglicerol - MAG e diacilglicerol - DAG) foram analisados por cromatógrafo a líquido (HPLC) Agilent 1200 series (Agilent Technologies, EUA) equipado com um detector de dispersão de luz por evaporação e coluna Gemini C-18 (5 μm , 150 \times 4,6 mm, 110 Å) (CARVALHO *et al.*, 2018).

A viscosidade dinâmica foi medida a 40°C para a amostra de biolubrificante, usando um viscosímetro Brookfield LVDV-II (Brookfield Viscometers Ltd., Inglaterra, Reino Unido) Um banho de água circulante foi usado para manter a temperatura em cada análise a 40°C. As medidas de tensão de cisalhamento foram tomadas como função da taxa de cisalhamento e a viscosidade foi determinada como uma constante de inclinação. Amostras de 0,5 mL foram utilizadas e as medidas foram replicadas três vezes (CARVALHO *et al.*, 2018; CÉRON *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2020).

3.2.16 Reações de transesterificação *in situ*

Reações de transesterificação direta (*in situ*) da biomassa de consórcio microbiano (contendo pelo menos 20% em peso de lipídios sobre massa seca) foram realizadas, distintamente, para a obtenção de biolubrificante e de biodiesel. Para estas reações, foi utilizado o catalisador $H_3PMo_{12}O_{40}/Nb_2O_5$ (previamente ativado a 150 °C por 2 h). O meio de reação foi composto por 10% em peso do catalisador, referente aos lipídios presentes na biomassa. Todas as reações foram realizadas a 250°C e agitação de 300 rpm por 6 h, em um reator de aço inoxidável pressurizado (Parr Reatores Compactos HPCL Série 5500).

Para a síntese de biolubrificante, hexano foi usado como solvente (40% v/v) e óleo fúsel simulado, composto por 10% de álcool etílico, 8% de álcool butílico e 65% de álcool isoamílico, foi usado como receptor acila. A razão molar óleo/receptor acila foi fixada em 1:180.

O biolubrificante bruto foi purificado com o adsorvente Amberlite BD10DRY, de acordo com o método descrito por Santos *et al.* (2017).

A amostra do biolubrificante bruto e do adsorvente Amberlite foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL e colocadas em banho de ultrassom por 2 h. Em seguida, a amostra foi centrifugada (1570 x g por 15 min) e o solvente residual foi removido em um rotaevaporador a 80°C por 30 min.

Para a síntese do biodiesel, foi utilizado somente etanol 98,5%, como solvente e reagente, à razão molar óleo/álcool também fixada em 1:180.

Demais condições para a reação de transesterificação e purificação do biodiesel bruto foram idênticas às descritas para a síntese do biolubrificante.

3.2.17 Determinação de parâmetros de qualidade do biodiesel

Com base na composição em ácidos graxos, o *software* BiodieselAnalyzer© Versão 2.2 foi utilizado para prever os valores de alguns parâmetros de qualidade do biodiesel, produzido a partir da biomassa oleaginosa do consórcio alga:fungo (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014).

Os seguintes parâmetros de qualidade para o biodiesel foram avaliados: número de cetano, índice de iodo, estabilidade à oxidação a 110 °C, massa específica a 20 °C e viscosidade cinemática a 40 °C.

O *software* BiodieselAnalyzer© Versão 2.2 está disponível em <http://www.brteam.ir/biodieselanalyzer>.

REFERÊNCIAS

CARVALHO, A. K. F. **Avaliação do potencial do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* como fonte de lipase e lipídios para a produção de biodiesel dentro do conceito de biorrefinaria**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2015.

CARVALHO, A.K.F.; RIVALDI, J.D.; BARBOSA, J.C.; DE CASTRO, H.F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides* - A sustainable pathway for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 47-53, 2015.

CARVALHO, A.K.F.; BENTO, H.B.S.; RIVALDI, J.D.; DE CASTRO, H.F. Direct transesterification of *Mucor circinelloides* biomass for biodiesel production: Effect of carbon sources on the accumulation of fungal lipids and biofuel properties. **Fuel**, v. 234, p. 789-796, 2018.

CERÓN, A.A.; BOAS, R.N.V.; BIAGGIO, F.C.; DE CASTRO, H.F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass Bioenergy**, v. 119, p. 166-172, 2018.

DA CONCEIÇÃO, L.R.V.; REIS, C.E.R.; DE LIMA, R.; CORTEZ, D.V.; DE CASTRO, H.F. Keggin-structure heteropolyacid supported on alumina to be used in transesterification of high-acid feedstocks. **RSC Advances**, v. 9, p. 23450-23458, 2019.

DA SILVA, A.P.T.; BREDDA, E.H.; DE CASTRO, H.F.; DA RÓS, P.C.M. Enzymatic catalysis: an environmentally friendly method to enhance the transesterification of microalgal oil with fusel oil for production of fatty acid esters with potential application as biolubricants. **Fuel**, v. 273, p. 1-7, 2020.

DUBOIS, M.; GILLES, A.K.; HAMILTON, K.J.; REBERS, A.P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

GUILLARD, R.R.; LOREZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide C1,2. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

LOURES, C.C.A.; AMARAL, M.S.; DA RÓS, P.C.M.; ZORN, S.M.F.E.; DE CASTRO, H.F.; SILVA, M.B. Simultaneous esterification and transesterification of microbial oil from *Chlorella minutissima* by acid catalysis route: a comparison between homogeneous and heterogeneous catalysts. **Fuel**, v. 211, p. 261-268, 2018.

RAJENDRAN, A.; HU, B. Mycoalgae biofilm: Development of a novel platform technology using algae and fungal cultures. **Biotechnology Biofuels**, v. 9, p. 1-13, 2016.

SANTOS, F.D.; DA CONCEIÇÃO, L.R.V.; CÉRON, A.; DE CASTRO, H.F. Chamotte clay as potential low cost adsorbent to be used in the palm kernel biodiesel purification. **Applied Clay Science**, v. 149, p. 41-50, 2017.

TALEBI, A.F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. BiodieselAnalyzer: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, v. 2, p. 55-57, 2014.

ZORN, S.M.F.E.; REIS, C.E.R.; SILVA, M.B.; HU, B.; DE CASTRO, H.F. Consortium growth of filamentous fungi and microalgae: evaluation of different cultivation strategies to optimize cell harvesting and lipid accumulation. **Energies**, v. 13, p. 1-15, 2020.

ZORN S.; CARVALHO, A.; BENTO, H.; GAMBARATO, B.; PEDRO, G.; SILVA, A.; GONÇALVES, R.; DA RÓS, P.; SILVA, M. Use of fungal mycelium as biosupport in the formation of lichen- like structure: recovery of algal grown in sugarcane molasses for lipid accumulation and balanced fatty acid profile. **Membranes**, v. 12, p. 1-14, 2022.

4 AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE COCULTIVO

4.1 Introdução

Líquens estão entre os muitos tipos de relacionamento mútuo entre espécies. Os líquens existem como um sistema dinâmico entre fungos e algas ou cianobactérias, presentes nos mais variados *habitats* da crosta terrestre, principalmente por razões de troca de nutrientes e, portanto, para a sobrevivência mútua (RAJENDRAN; HU, 2016) e cerca de 25% de todas as espécies de fungos são conhecidas em sua forma liquenizada (LUTZONI, PAGEL; REEB, 2001).

Com base nesse sistema natural, a produção de consórcios microbianos compostos por algas e fungos (líquens artificiais) em biorrefinarias, pode representar uma alternativa bastante interessante na solução de diversas questões relacionadas à colheita de células, além de gerar valiosa biomassa oleaginosa.

Por exemplo, tais consórcios podem solucionar um gargalo comumente reportado na viabilidade dos processos microalgais, que está na etapa de colheita das células. As células de microalgas geralmente são cultivadas em suspensão, pois diferentemente dos organismos multicelulares, como fungos, as células de microalgas são pequenas e possuem valores de gravidade específicos próximos aos de seu meio de cultivo (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013). Os cultivos geralmente ocorrem de forma diluída, produzindo uma baixa razão de biomassa para líquido, aumentando não só o volume de água dependente nesse processo, mas também os requisitos necessários para a separação (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Por outro lado, fungos são relativamente mais fáceis de recuperar que as microalgas. Assim, com técnicas apropriadas, é possível promover adesão entre as hifas dos fungos e as células das microalgas, removendo efetivamente as microalgas do meio de cultivo (GULTOM; HU, 2013).

Neste sentido, este capítulo teve como principais objetivos, avaliar quatro diferentes estratégias de cocultivo para a formação de líquens artificiais e, selecionar a estratégia mais apropriada a uma elevada eficiência de recuperação de células e biomassa liquenizada com maior conteúdo lipídico. Além disso, o

efeito das diferentes estratégias de cocultivo sobre a acumulação lipídica foi demonstrado.

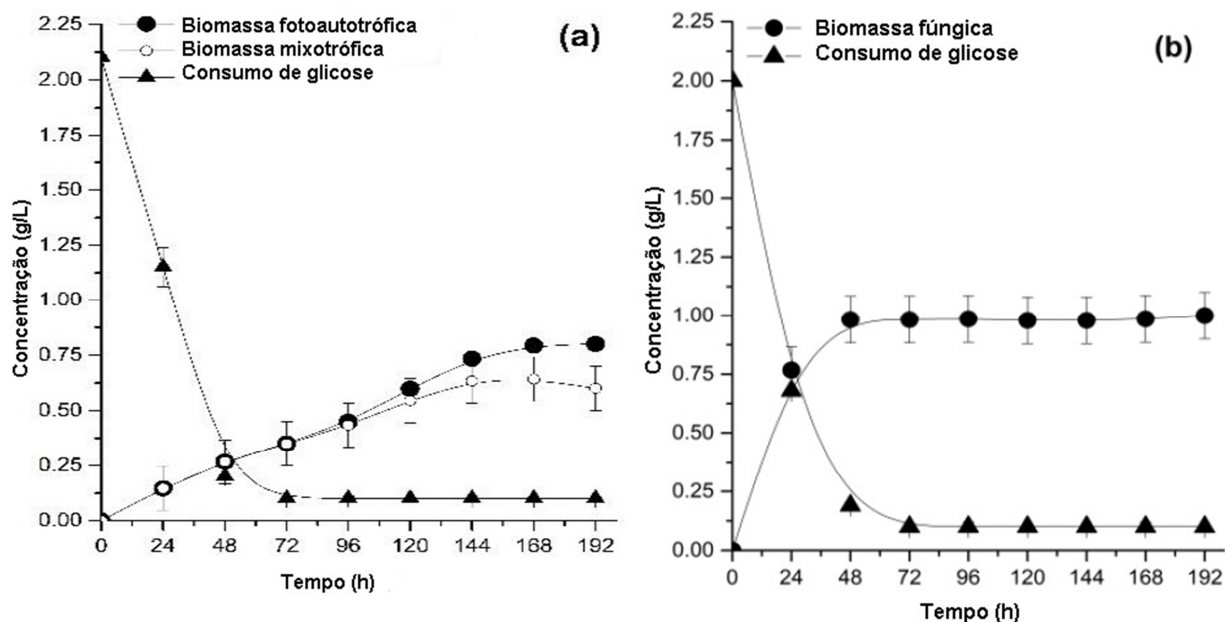
Os estudos foram realizados com a cepa fúngica *Mucor circinelloides* URM 4182, e a espécie *Chlorella vulgaris* BMAK D07, microalga considerada espécie modelo para os estudos de liquenização.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Efeitos do meio de cultivo e da glicose sobre as linhagens estudadas

Previamente ao estabelecimento das estratégias de cocultivo, foi efetuado um estudo do crescimento das células de *C. vulgaris* em meio de cultivo autotrófico e mixotrófico (sem e com glicose). Os dados também foram comparados ao crescimento do fungo filamentoso, cujo meio de cultivo A contém 2 g/L de glicose. Estes resultados foram sintetizados nas Figuras 4.1 (a) e (b).

Figura 4.1- (a) Curvas de crescimento de *C. vulgaris* em meio de cultivo autotrófico e mixotrófico, e o respectivo consumo de glicose pela microalga; (b) Curva de crescimento de *M. circinelloides* em meio heterotrófico e o respectivo consumo de glicose pelo fungo.



Fonte: Própria autora.

De acordo com os dados da Figura 4.1 (a), o cultivo de *C. vulgaris* em meio A na presença e ausência de glicose apresentou curvas de crescimento típicas e demonstrou uma concentração final de células semelhante no período de 180 h, embora um crescimento mais lento tenha sido observado no meio suplementado com 2 g/L de glicose nos primeiros dias de incubação. Por outro lado, de acordo com os dados da Figura 4.1 (b), o meio de cultivo A, suplementado com glicose, foi capaz de suportar totalmente a cepa URM 4182 do fungo filamentoso *M. circinelloides*, proporcionando uma rápida captação de glicose nas primeiras 24 horas de crescimento, que foi capaz de ser sustentada por todo o período avaliado de 180 h.

O meio de cultivo A, selecionado para este estudo, foi descrito na literatura para suportar totalmente o crescimento de diferentes cepas de *C. vulgaris*, como a UTEX 2714 (GULTOM; HU, 2013). O comportamento mixotrófico da microalga *C. vulgaris*, amplamente demonstrado em vários estudos (LIANG *et al.*, 2009; HEREDIA-ARROYO *et al.*, 2011), foi confirmado neste estudo para a cepa BMAK D07. No entanto, o cultivo de *C. vulgaris* em meio suplementado com glicose apresentou-se com aspecto turvo, bem como, observou-se a ocorrência de decantação de células, como também descrito por Zhang e Hu (2012). Considerando que as duas linhagens foram capazes de crescer no mesmo meio de cultivo, a seleção das características nutricionais do meio A foi considerada adequada para a avaliação de diferentes parâmetros envolvendo as interações entre as duas linhagens. Para a microalga, o meio de cultivo A sem glicose mostrou-se mais adequado.

4.2.2 Formação de líquens por inoculação simultânea de células e esporos: estratégia I

Os resultados em biomassa seca dos líquens formados conforme esta estratégia estão descritos na Tabela 4.1.

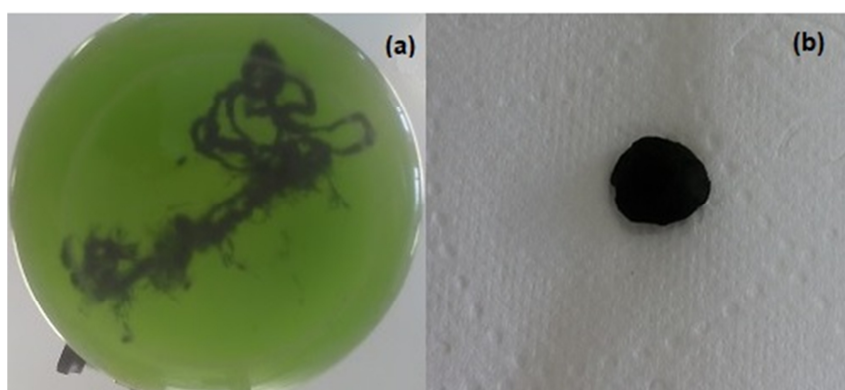
Tabela 4.1 – Quantificação das biomassas de líquens de *C. vulgaris* e *M. circinelloides*, contribuições das biomassas de alga e fungo na composição dos líquens e respectivos percentuais (estratégia I).

Amostras	Biomassa líquen (mg/L)	Biomassa microalga (mg/ L)	Biomassa fungo (mg /L)	%Algas	%Fungos
Líquén 1	1176,0	236,0	940,0	20,1	79,9
Líquén 2	1284,0	310,0	974,0	24,1	75,9
Líquén 3	1211,0	365,0	846,0	30,1	69,9
Médias	1223,7 ± 45,0	303,7 ± 52,9	920,0 ± 54,1	24,8 ± 4,1	75,2 ± 4,1

Fonte: Própria autora.

As contribuições de biomassas de *C. vulgaris* e *M. circinelloides* na formação dos líquens foram, respectivamente, de 25% e 75% em média. De acordo com este resultado, o líquen formado por inoculação simultânea de células da microalga e esporos do fungo não favoreceu a adesão de células microalgais ao micélio maduro. De fato, durante todo o período de incubação, observou-se que o meio de cultivo apresentou uma coloração verde intensa, o que indica a presença de muitas células de microalgas em suspensão no meio de cultivo, que não aderiram à biomassa fúngica no processo de formação do líquen. Portanto, pela inoculação simultânea de células e esporos, houve baixa aderência da biomassa microalgal ao micélio fúngico. A Figura 4.2 mostra a biomassa de líquen em meio de cultivo e logo após a colheita.

Figura 4.2- Aspectos dos cocultivos de acordo com a estratégia I: (a) Amostras de líquen em formação em meio de cultivo e (b) logo após a colheita.



Fonte: Própria autora.

O efeito de diferentes proporções de inoculação entre algas e fungos, pH, concentração inicial de glicose, entre outros fatores, foram avaliados por Gultom; Hu (2013) sobre a interação entre *Aspergillus niger* e *C. vulgaris*, e as condições ótimas sugeridas pelos autores foram adotadas para os ensaios envolvendo o crescimento de *M. circinelloides* e *C. vulgaris* neste trabalho. Portanto, esta primeira abordagem, sem uso de suporte, teve como objetivo avaliar uma inoculação simultânea de células de algas e esporos de fungos, com a hipótese de que o crescimento combinado seguiria os perfis de comportamento isolado de cada linhagem.

Os resultados observados para esta estratégia indicaram um potencial de desenvolvimento de consórcio entre as duas linhagens, embora tenha sido observada maior proporção de células fúngicas. Tal observação foge dos objetivos estabelecidos pelo presente estudo, a saber, promover biomassa recuperável e rica em células de algas, ao invés de uma biomassa predominantemente composta pelo componente fúngico.

4.2.3 Formação de líquens por imobilização sobre tela de fibra de algodão como suporte: estratégia II

Uma estratégia de imobilização foi levada em consideração para avaliar a performance de inoculação simultânea de células e esporos, usando uma tela de fibra de algodão como suporte. A decisão de testar a imobilização do cultivo de células em uma matriz externa deveu-se a descrições anteriormente promissoras de recuperação de algas em sistemas assistidos por células fúngicas apoiadas em materiais como telas de fibra de algodão e polipropileno (RAJENDREAN; HU, 2016). Os resultados avaliando o crescimento imobilizado da biomassa do consórcio, bem como os cultivos isolados de *C. vulgaris* e *M. circinelloides*, seguiram de forma semelhante à descrita por Rajendran e Hu (2016).

Os resultados em biomassa seca dos líquens formados conforme esta estratégia estão descritos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Quantificação das biomassas de líquens de *C. vulgaris* e *M. circinelloides* por imobilização sobre tela de algodão, contribuições das biomassas de alga e fungo na composição dos líquens e respectivos percentuais.

Amostras	Biomassa líquen (mg/L)	Biomassa microalga (mg/ L)	Biomassa fungo (mg /L)	%Algas	%Fungos
Líquen 1	1068,0	505,0	563,0	47,3	52,7
Líquen 2	1081,0	564,0	516,0	52,2	47,7
Líquen 3	1079,0	517,0	562,0	47,9	52,1
Médias	1076,0 ± 6,3	528,7 ± 6,0	547,0 ± 6,0	49,1 ± 2,7	50,9 ± 2,7

Fonte: Própria autora.

De acordo com estes resultados, as contribuições médias de biomassas na formação dos líquens foram de 49% e 51% em média, respectivamente para *C. vulgaris* e *M. circinelloides*, o que está bastante próximo dos dados reportados na literatura (RAJENDRAN; HU, 2016), ressaltando que tratam-se de linhagens distintas.

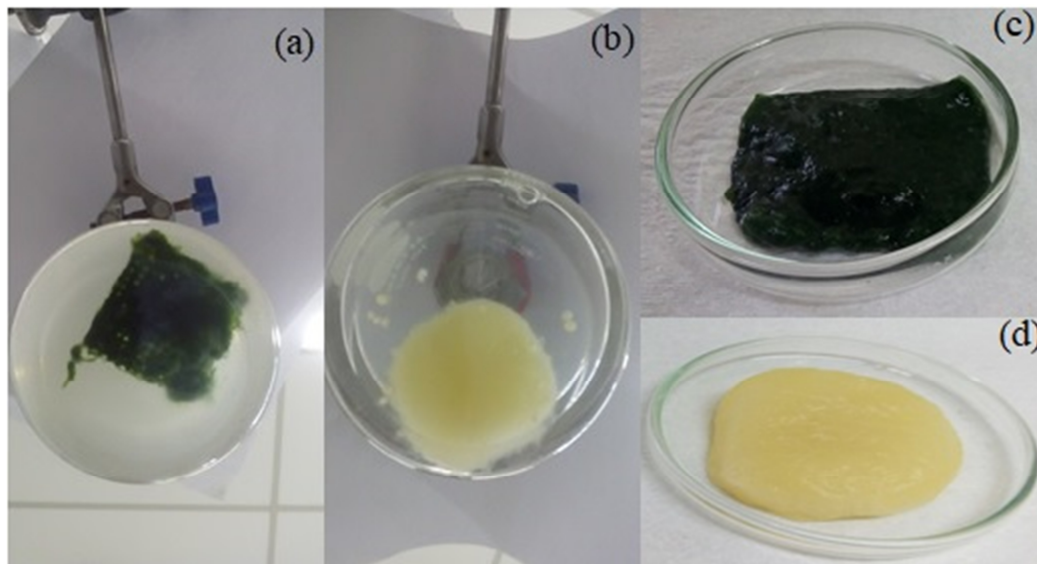
Rajendran e Hu (2016) avaliaram diferentes matrizes para a formação de biofilme tipo líquen constituído por microalgas e fungos filamentosos, resultando na recomendação do uso de uma matriz treliçada de polipropileno como suporte eficiente para o crescimento imobilizado da biomassa de consórcio microbiano.

A imobilização dos micélios fúngicos filamentosos e da biomassa do consórcio provavelmente decorreu da necessidade intrínseca das células de produzirem estruturas aderentes à superfície do algodão áspero, o que, apesar de ser um fenômeno complexo, está ligado à capacidade das células de produzirem enzimas celulolíticas, que são capazes de promover uma degradação inicial lenta da matriz do algodão, a partir da qual formam-se as estruturas proteína-carboidratos, ligando a celulose e as estruturas celulares (SHONG; DIAZ; COLLINS, 2012). Tanto o cultivo fúngico isolado quanto a biomassa do consórcio foram capazes de crescer aderidos à matriz treliçada de algodão, enquanto o cultivo isolado de *C. vulgaris* não aderiu adequadamente à matriz. A partir desses resultados, observou-se um padrão de crescimento similar ao crescimento sem utilização de matriz como suporte (estratégia I), em termos de acúmulo de biomassa e consumo de glicose para o fungo filamentoso. Portanto, a

performance de crescimento da estratégia II foi similar ao sistema sem adição de matriz, ou seja, a estratégia I. A composição da biomassa do consórcio microbiano foi maior em termos de algas, quando comparado ao crescimento não imobilizado (1224 mg x 1076 mg), contudo, na estratégia I, a contribuição em peso da biomassa de algas para a biomassa total foi muito menor que $50 \pm 1\%$, significando que a maioria da biomassa de líquen foi composta por micélio fúngico. Por outro lado, a biomassa do consórcio foi maior que o crescimento isolado das células fúngicas no cultivo com imobilização, durante todo o processo de cultivo. Em ambos os sistemas, imobilizado e não imobilizado, com inoculação simultânea de células e esporos, não foi possível distinguir se o consumo de glicose do meio de cultivo foi devido ao fungo ou à microalga. Portanto, os resultados obtidos pela estratégia II parecem não atender aos objetivos estabelecidos por este trabalho, mas podem representar uma indicação para aplicações em que a contribuição de biomassa algal para a biomassa total não seja tão importante, por exemplo, aquelas relacionadas à biorremediação de sistemas contaminados por algas. A aderência do sistema celular à matriz de algodão pode ser considerada como um processo irreversível do ponto de vista prático. Portanto, a estabilidade de consórcio imobilizado sobre uma matriz pode ser benéfica a aplicações nas quais tal habilidade é desejada, como as relacionadas a remoção de células de algas de sistemas aquosos.

A Figura 4.2 mostra diferentes aspectos das biomassas de líquen e da biomassa de fungo filamentosos cultivados como controle, durante a formação e ao final do período de cocultivo, ambos imobilizados sobre suporte de tela de fibra de algodão.

Figura 4.2- Aspectos de amostras empregando tela de fibra de algodão como suporte (estratégia II): (a) amostra de biomassa de líquen, em meio de cultivo; (b) biomassa de fungo filamentoso em meio de cultivo; (c) biomassa de líquen, logo após colheita; (d) biomassa de fungo filamentoso, logo após a colheita.



Fonte: Própria autora.

4.2.4 Formação de líquens por adição de inóculo de células sobre o micélio fúngico: estratégia III

A estratégia III consistiu em um cultivo isolado de *M. circinelloides*, que cresceu por 72 h, ao qual foi adicionado o concentrado de células de algas, levando a um tempo de crescimento do consórcio de 108 h.

A evolução dos resultados envolvidos neste crescimento baseou-se nos seguintes estágios: dispersão inicial das células da alga no meio de cultivo contendo o micélio do fungo, proporcionando uma fase líquida verde; em seguida, aproximadamente 24 h após a adição das células de *C. vulgaris*, o meio de cultivo ficou claro e transparente. Após 24 h, as células das algas estavam próximas da adesão total à biomassa fúngica. Após 24 horas iniciais de crescimento combinado, a biomassa do consórcio apresentou peso seco total constante. No entanto, a contribuição das células de algas para o peso seco total da biomassa do consórcio foi em média de 12%. A biomassa do consórcio, composta em grande parte por micélio fúngico, foi maior em termos de peso seco, se

comparada às estratégias anteriores, atingindo valores próximos a 2 g/L. Apesar de menores concentrações relativas de algas terem sido observadas neste crescimento específico, observou-se que os valores absolutos de concentração de algas foram semelhantes às estratégias descritas anteriormente (I e II), demonstrando que a maturação precoce dos micélios fúngicos, com a subsequente inoculação de algas em uma contagem de células mais baixa pode proporcionar um efeito positivo para as células fúngicas, mas um crescimento neutro ou negativo para as algas.

Os resultados em biomassa seca dos líquens formados conforme esta estratégia estão descritos na Tabela 4.3.

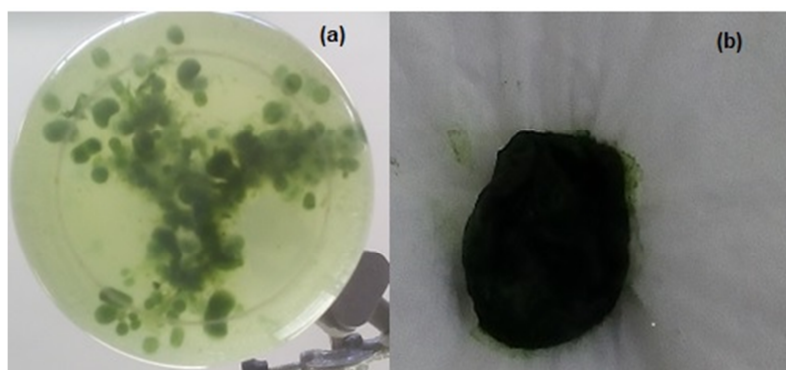
Tabela 4.3 - Quantificação das biomassas de líquens de *C. vulgaris* e *M. circinelloides*, contribuições das biomassas de alga e fungo na composição dos líquens e respectivos percentuais.

Amostras	Biomassa líquen (mg/L)	Biomassa microalga (mg/ L)	Biomassa fungo (mg /L)	%Algas	%Fungos
Líquén 1	2159,0	269,0	1890,0	12,5	87,5
Líquén 2	2115,0	218,0	1897,0	10,3	89,7
Líquén 3	2157,0	277,0	1880,0	12,8	87,2
Médias	2143,7 ± 20,3	254,7 ± 26,1	1889,0 ± 7,0	11,9 ± 1,1	88,1 ± 1,1

Fonte: Própria autora.

A Figura 4.4 mostra a biomassa do líquen, cultivado de acordo com a estratégia III, em meio de cultivo, e logo após a colheita.

Figura 4.4 - Aspectos dos cocultivos de acordo com a estratégia de adição de inóculos de células sobre o micélio fúngico: (a) amostras de líquen em formação em meio de cultivo e (b) biomassa logo após a colheita.



Fonte: Própria autora.

4.2.5 Formação de líquens por adição do micélio fúngico ao meio de cultivo com maior concentração inicial de células: estratégia IV

Os resultados em biomassa seca dos líquens formados conforme esta estratégia estão descritos na Tabela 4.4.

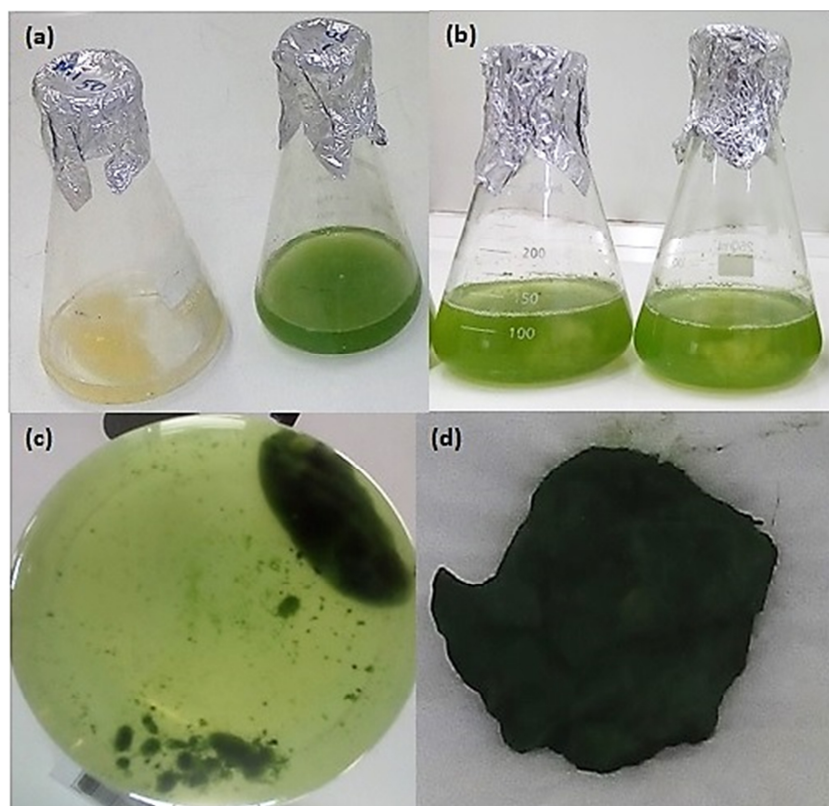
Tabela 4.4 - Quantificação das biomassas de líquens de *C. vulgaris* e *M. circinelloides*, contribuições das biomassas de alga e fungo na composição dos líquens e respectivos percentuais.

Amostras	Biomassa líquen (mg/L)	Biomassa microalga (mg/ L)	Biomassa fungo (mg /L)	%Algas	%Fungos
Líquen 1	1828,0	1440,0	388,0	78,8	21,2
Líquen 2	1869,0	1464,0	405,0	78,3	21,7
Líquen 3	1894,0	1504,0	391,0	79,4	20,6
Médias	1863,7 ± 27,2	1469,3 ± 26,4	394,7 ± 7,4	78,8 ± 0,4	21,2 ± 0,4

Fonte: Própria autora.

De acordo com a estratégia IV, as células da microalga e esporos fúngicos cresceram em cultivos isolados por 72 h; após este período, o micélio foi colhido e adicionado ao cultivo contendo as células da microalga, levando a um tempo de maturação do consórcio de 108 h. Nesta estratégia, os esporos do fungo consumiram a glicose do meio de cultivo antes do desenvolvimento da biomassa de líquen, bem como, a microalga desenvolveu-se em um meio de cultivo autotrófico, alcançando uma concentração de aproximadamente 350 mg/L ± 4,1, conforme registrado na Figura 4.1(a). De acordo com os resultados desta estratégia, o percentual de biomassa da microalga na composição dos líquens foi de 79%, que é 40% superior à biomassa da microalga verificada na composição dos líquens cultivados na presença de tela fibra de algodão como suporte. A Figura 4.5 mostra diversas etapas do processo de formação de líquens de acordo com o protocolo da estratégia IV.

Figura 4.5 - Aspectos de cocultivos de acordo com a estratégia IV: (a) cultivos isolados de *C. vulgaris* e de *M. circinelloides*; (b) frascos logo após a unificação dos cultivos isolados; (c) aspecto do líquen em formação em meio de cultivo; (d) aspecto do líquen formado após colheita.

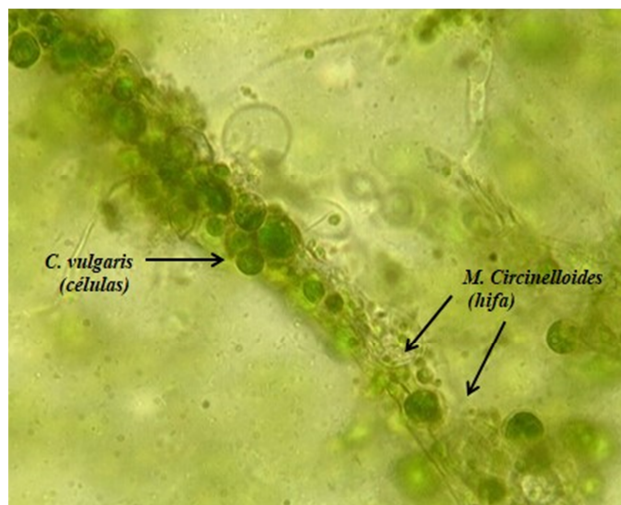


Fonte: Própria autora.

Esta estratégia foi a que melhores resultados apresentou, em termos de contribuição da biomassa de algas na composição da biomassa liquenizada. Em comparação às estratégias avaliadas anteriormente, verificou-se que os cultivos isolados por 72 h foram possivelmente um fator positivo determinante para favorecer a formação de biomassa liquenizada com elevada proporção de biomassa de algas, tanto para a formação do micélio maduro, como para o cultivo autotrófico das células da microalga. Durante 72 h, não houve competição entre as linhagens, que puderam desenvolver-se em seus respectivos meios de cultivo, absorvendo completamente os nutrientes disponíveis.

A Figura 4.6 mostra a interação entre as hifas do fungo filamentoso *M. circinelloides* e as células da microalga *C. vulgaris*, captadas em uma porção de biomassa liquenizada úmida recém colhida, que foi cultivada de acordo com o protocolo da estratégia IV, vista ao microscópio óptico.

Figura 4.6- Microfotografia de estrutura do líquen formado em biomassa colhida após incubação conforme protocolo da estratégia IV, onde estão assinaladas células de *C. vulgaris* aderidas sobre as hifas do fungo filamentoso *M. circinelloides*.



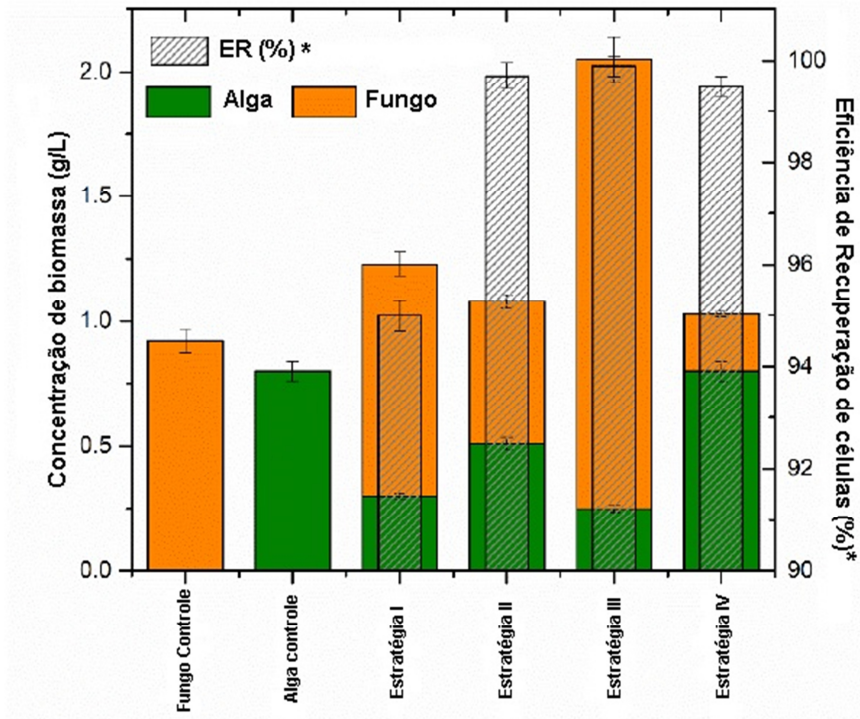
Fonte: Própria autora.

4.2.6 Avaliação da eficiência de recuperação de células (ER)

Após a colheita dos líquens formados, determinou-se a quantidade de células de microalgas presentes no meio de cultivo restante, conforme estabelecido em 3.2.12.

Os percentuais de eficiência de recuperação de células e os respectivos resultados em concentração de biomassa e proporção entre biomassa fúngica e microalgal de todas as estratégias de cocultivo avaliadas estão sintetizados na Figura 4.7.

Figura 4.7 – Resumo de resultados de acordo com a concentração de biomassa e distribuição: fungos (laranja), algas (verde) e % de recuperação de células de algas (cinza).



Fonte: Própria autora.

De acordo com os dados da Figura 4.7, na estratégia I, a eficiência de recuperação de células de microalgas foi de 95%, demonstrando que aproximadamente 5% da contagem total de células de algas foi encontrada na fase líquida ao final do período total analisado, o que foi visualmente observado pela coloração verde presente no meio de cultivo (Figura 4.2), indicativo de muitas células em suspensão, correlacionado com uma baixa contribuição de biomassa de algas na composição do líquen formado por esta estratégia. Com a estratégia II, de imobilização sobre o suporte de tela de fibra de algodão, a eficiência de recuperação de células subiu para 99,7% indicando um avanço em termos de recuperação de células, e, em acordo com o aspecto observado do caldo de cultivo, este apresentou-se mais límpido em comparação ao constatado na primeira estratégia, indicando a presença de menor quantidade de células suspensas no meio de cultivo (Figura 4.3).

Considerando a recuperação de células de algas como um dos objetivos deste trabalho, os resultados obtidos confirmaram que a utilização de glicose pela microalga é indesejada. O crescimento fúngico, limitado pela disponibilidade de

açúcar no meio de cultivo, pode ainda ser parcialmente limitado pelo consumo de açúcar pelas microalgas, o que possivelmente explica a baixa contribuição fúngica de biomassa no consórcio, de 560 mg/L, correspondendo a aproximadamente $52 \pm 1\%$ da biomassa do consórcio, quando comparado ao seu resultado isolado no mesmo meio de cultivo, que atingiu concentrações de biomassa na faixa de 880 mg/L. Neste sentido, os resultados de eficiência de recuperação de células obtidos para a estratégia II, embora não atendam aos objetivos deste trabalho, podem representar uma indicação para aplicações nas quais a contribuição de células de algas na biomassa total não seja tão relevante, tais como em processos de biorremediação, em sistemas contaminados por excesso de algas.

Quanto à estratégia III, esta apresentou uma eficiência de recuperação de 99,9%, contudo, a contribuição de biomassa de algas foi de somente 11,9%, o que também pode ser interessante para aplicações na área ambiental. Finalmente, a estratégia IV resultou em uma eficiência de recuperação de células bastante satisfatória em comparação às demais estratégias (99,5%) aliada a uma contribuição de biomassa de algas de 79% na biomassa de líquen, o que é bastante significativo, levando-se em conta os objetivos desta pesquisa.

Os dados aqui apresentados estão em consonância com alguns relatos da literatura. A Tabela 4.5 resume as estratégias utilizadas para alguns trabalhos recentes, demonstrando que, para os objetivos de colheita de células de algas, conforme verificado neste trabalho, a utilização de uma biomassa fúngica madura em vez de germinação e crescimento simultâneo de esporos fúngicos com as células de algas, pode fornecer melhores resultados.

Tabela 4.5 – Comparação de recuperação de células de microalgas, biomassa de consórcio e distribuição mássica, com dados da literatura.

Espécie fúngica	Espécie de microalga	Meio de cultivo	Matrix de imobilização	Recuperação de Microalga (%)	Biomassa de Líquen (mg/L)	Contribuição em massa no Líquen microalga:fungo	Referência
<i>Mucor indicus</i> ATCC 24905	<i>C. vulgaris</i> UTEX 2714	Meio A suplementado com amônia Concentrações de amônia variando de 0 a 100 mg/L	Tela de polipropileno e algodão	61,26 – 97,70 ([NH ₄ ⁺]-específico)	657,2 – 1125,0 ([NH ₄ ⁺]-específico)	19,72:80,28 – 80:99-19,01 ([NH ₄ ⁺]- específico)	BARNHARST et al., 2018
<i>Mortierella isabellina</i> , <i>Fusarium equiseti</i> , <i>Fusarium lateritarum</i> , <i>Nigrospora oryzae</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium equiseti</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , and <i>Mucor circinelloides</i>	<i>C. vulgaris</i> UTEX 2714	Meio A	Tela de polipropileno e algodão	34,85 ± 8,1 - 99,94 ± 0,02 (específico por cepa)	611,6 ± 11,9 – 1243,0 ± 37 (específico por cepa)	4,9:95,1 – 48,96:51,04	RAJENDRAN; HU, 2016
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>C. vulgaris</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Thraustochytrid</i> sp., <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Nannochloris oculata</i> , <i>Tetraselmis chuii</i> , and <i>Pyrocystis lunula</i>	Caldo de crescimento fúngico suplementado com glicose ou palha de trigo pré-tratada com ácido e várias diluições de águas residuais de lagoa suína digerida anaerobicamente	Peletização fúngica	Aproximadamente 25 - >95 (cepa e meio específicos)	110 – 1060 (cepa e meio específicos)	Não especificado	WREDE et al., 2014
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Chorella vulgaris</i>	Águas residuais de melaço pré-tratadas	Não divulgado	>95	Até 4125 (condição específica)	26,3:73,7 – 95,2:4,8 (condição específica)	YANG; LI; WANG, 2019
<i>Mortierella elongata</i> AG 77	<i>Nannochloropsis oceanica</i> CCMP 1779	Meio Guillard F/2	Não divulgado	>60	-	Não especificado	DU et al., 2018
<i>M. circinelloides</i> URM 4182	<i>C. vulgaris</i> BMAK D07	Meio A	Peletização Fúngica	99,5	1828 - 1894	79:21	Este trabalho

Fonte: Própria autora.

Considerando os múltiplos objetivos descritos na literatura com os dados aqui apresentados, diversos autores descrevem a eficiência de colheita e a composição da biomassa do consórcio como fatores determinantes para seus fins. Por exemplo, Barnharst *et al.* (2018) verificaram a aplicação de líquens artificiais utilizando *C. vulgaris* e *Mucor indicus* em processo de biorremediação intensiva em aquicultura; observaram uma redução de fosfato e amônia total a limites indetectáveis, enquanto cultivos isolados eram adequados para a remoção alvo de apenas nitrogênio ou fósforo. Rajendran, Fox e Hu (2017) verificaram a eficácia de líquens entre *C. vulgaris* e *M. circinelloides* empregando uma malha de polipropileno e fio de algodão na indústria de coprodutos de etanol, em que a alta concentração dos nutrientes fósforo (818 mg/L) e nitrogênio (924 mg/L) nas amostras foram recuperados na biomassa de microalgas em 55,7% e 74%, respectivamente, com redução de DQO em até 65,6%. Yang, Li e Wang (2019) também propuseram a recuperação de amônia e sólidos totais, por líquens de *Chorella sp.* e *Aspergillus sp.* em águas residuais de melaço, bem como alcançando uma eficiência de recuperação de microalgas superior a 97%.

4.2.7 Efeito das diferentes estratégias para a acumulação lipídica

Tanto a microalga quanto a cepa fúngica avaliadas neste estudo foram relatadas na literatura como micro-organismos acumuladores de óleo (XIA *et al.*, 2011; TRAN *et al.*, 2012), o que as torna aptas, por exemplo, a algumas aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de biodiesel e outras modificações de lipídios microbianos para finalidades nutracêuticas. O meio de cultivo A não contém os nutrientes para um crescimento ideal que proporcione acúmulo de óleo, devido a um balanço inadequado de carbono e nitrogênio no sistema, bem como, uma baixa concentração de glicose, o que prejudica altas concentrações celulares de fungos. Portanto, considerando o crescimento de *M. circinelloides*, enquanto a conversão de glicose em biomassa foi moderadamente alta, como demonstrado na Tabela 4.6, pode-se ver facilmente que as rotas metabólicas que levam ao acúmulo de óleo foram insuficientes, atingindo teores lipídicos na faixa de 7,1 a 0,2% em relação ao peso da biomassa seca na cultura isolada, enquanto que a mesma linhagem fúngica tem registros de acúmulo de

lipídios em concentrações superiores a 40% em outros meios de cultivo (CARVALHO *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2018).

A Tabela 4.6 sintetiza os dados de acumulação lipídica das diferentes estratégias de cocultivo avaliadas neste trabalho.

Tabela 4.6 – Resumo de dados de acumulação lipídica das diferentes estratégias de cocultivo com a microalga *C. vulgaris* e o fungo *M. circinelloides*

Condição de Cultivo	Lipídios totais (%)	Lipídios totais (mg/ L)	Q_L (mg /L. dia)
Isolado, <i>C. vulgaris</i>	23,8 ± 1,0	190,4 ± 1,0	25,4 ± 1,0
Isolado, <i>M. circinelloides</i>	7,1 ± 0,2	63,9 ± 0,8	8,5 ± 0,8
Estratégia I	22,7 ± 0,4	272,4 ± 0,5	36,3 ± 0,5
Estratégia II	23,5 ± 0,8	253,8 ± 1,0	33,8 ± 0,5
Estratégia III	19,0 ± 0,5	190,0 ± 0,5	22,0 ± 0,5
Estratégia IV	22,2 ± 0,4	230,8 ± 0,5	30,8 ± 0,5

Fonte: Própria autora.

O crescimento fotoautotrófico isolado de *C. vulgaris*, no entanto, não é dependente de açúcares disponíveis no meio de cultivo (HEREDIA-ARROYO *et al.*, 2011) e, apesar de apresentar menor acúmulo de biomassa quando comparado aos fungos, o acúmulo de lipídios em relação ao peso de biomassa seca ficou dentro da faixa de 20% como também visto na Tabela 4.6, próximo aos valores anteriormente relatados para a mesma espécie em outros meios de cultivo fotoautotróficos (HEREDIA-ARROYO *et al.*, 2011).

Os dados de acumulação lipídica obtidos das biomassas resultantes das diferentes estratégias de cocultivo demonstraram que, não somente os lipídios totais aumentaram em todas as estratégias de consórcios, quando comparadas aos cultivos isolados, mas a produtividade lipídica de todas as estratégias foi pelo menos 20% maior quando comparado ao crescimento fotoautotrófico isolado de *C. vulgaris* sob as mesmas condições. Em relação à cepa fúngica, a produtividade lipídica poderia ser aumentada em mais de quatro vezes quando comparado ao crescimento isolado de *Mucor circinelloides* em meio A.

Embora a produtividade lipídica (Q_L) obtida pela estratégia IV tenha sido inferior à produtividade das estratégias I e II, o crescimento do consórcio utilizando a estratégia IV foi selecionado como o mais adequado para os objetivos

de recuperação de células e contribuição de células de microalgas para o peso total da biomassa, conforme discutido nas seções anteriores.

Nesse sentido, foi realizada uma triagem do tempo de processo para avaliar a estabilidade da composição no período de até 384 h.

O fator tempo de cultivo prolongado foi estudado para avaliar os efeitos individualizados no crescimento da biomassa total, na distribuição de algas e fungos no peso total da biomassa, na recuperação de células de microalgas e nos lipídios, que foram caracterizados em termos de lipídios totais e na distribuição de ácidos graxos. Os dados estão sumarizados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Resumo de dados de acumulação lipídica em diferentes tempos de incubação da biomassa de líquens gerados conforme a estratégia IV.

Parâmetros	Tempo de cocultivo (dias)				
	8	10	12	14	16
Biomassa do consórcio (mg/L)	1037 ± 7	806 ± 8	932 ± 7	1025 ± 7	1150 ± 6
Eficiência de recuperação (%)	99,4 ± 0,2	98,8 ± 0,2	98,5 ± 0,2	98,3 ± 0,2	98,0 ± 0,2
Lipídios totais (%)	31,1 ± 0,5	32,8 ± 0,5	31,6 ± 0,5	30,1 ± 0,5	30,5 ± 0,5
Ácidos graxos	Contribuição em massa para o total de ácidos graxos (%)				
C 12:0 láurico	1,25	1,12	1,27	1,11	1,01
C 14:0 mirístico	0,91	0,87	0,90	0,76	0,71
C 15:0 pentadecanóico	6,79	6,67	6,78	7,27	7,06
C 16:0 palmítico	26,58	26,79	25,56	23,81	26,25
C 17:0 margárico	1,7	1,62	1,28	2,68	2,22
C 18:0 esteárico	1,31	1,29	1,63	1,79	2,03
C 16:1 araquídico	0,91	0,92	0,86	0,87	0,97
C 18:1 oleíco	32,98	33,06	35,0	31,34	30,07
C 18:2 linoleíco	11,81	11,72	12,14	11,74	11,55
C 18:3 α -linolênico	15,76	15,93	14,57	18,64	18,13

Fonte: Própria autora.

Apesar de pequenas flutuações no peso seco do consórcio terem sido observadas durante os experimentos, a biomassa total foi aproximadamente constante durante todo o período e a contribuição da biomassa de algas para a massa total do consórcio foi de $79 \pm 0,4\%$, o que sugere que a estratégia IV

parece ser eficiente para obtenção de biomassa rica em algas em sistemas de cocultivo.

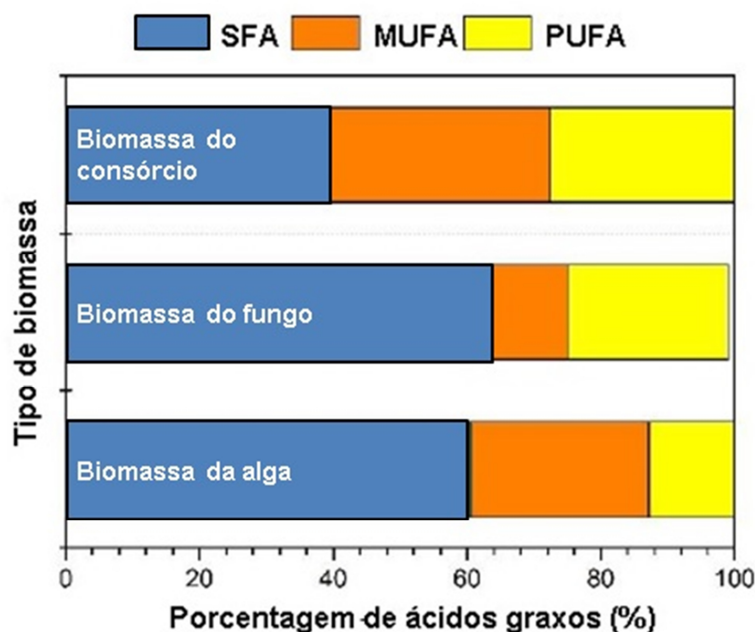
Os dados demonstraram alguns pontos importantes, a saber, que a colheita do sistema fungo-alga em um momento precoce pode ser preferível para evitar a proliferação e dominância do fungo ao consórcio (ZAMALLOA *et al.*, 2017; RAJENDRAN *et al.*, 2018), e o sistema do consórcio está possivelmente fornecendo um estresse celular para ambas as cepas, devido ao aumento do teor de lipídios em relação às culturas isoladas, seguindo um efeito semelhante ao relatado por Reis *et al.* (2018).

Com relação ao conteúdo lipídico do consórcio, observou-se que o teor de lipídios da biomassa permaneceu aproximadamente constante ao longo do período de avaliação de 16 dias. O perfil de ácidos graxos, como também demonstrado na Tabela 4.7, apresentou, em todos os tempos de crescimento, um perfil de ácidos graxos variando de C12 a C18, com maior concentração dentro dos ácidos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1), de 60%. Sabe-se que o grau de saturação dos ácidos graxos tem impacto direto nas propriedades dos lipídios saponificáveis e seus consequentes produtos modificados, como o biodiesel. Por exemplo, elevados graus de saturação geralmente estão ligados à maior viscosidade e densidade dos produtos de biodiesel (TALEBI *et al.*, 2013).

A abundância de ácidos graxos insaturados também é conhecida por diminuir a estabilidade oxidativa do biodiesel. Nesse sentido, espera-se que a distribuição dos ácidos graxos, que se aproxima de alguns dos valores também relatados por Talebi *et al.* (2013) promoverá um bom equilíbrio entre as propriedades de fluidez e viscosidade, que são potencializadas pela presença de ácidos graxos insaturados, e a estabilidade oxidativa, devido à presença de ácidos graxos saturados.

A Figura 4.8 ilustra a distribuição de ácidos graxos da biomassa do consórcio microbiano, utilizando a estratégia IV aos oito dias de cultivo.

Figura 4.8- Distribuição dos ácidos graxos de acordo com sua categoria na biomassa do consórcio (estratégia IV aos oito dias de incubação), onde SFA: ácidos graxos saturados, MUFA: ácidos graxos monoinsaturados e PUFA: ácidos graxos poliinsaturados.



Fonte: Própria autora.

De acordo com os dados apresentados na Figura 4.8, a distribuição de ácidos graxos demonstrou que a biomassa do consórcio apresentou menor contribuição de ácidos graxos saturados quando comparados aos controles isolados de biomassa de fungos e algas usando o mesmo meio de cultivo. Embora esses resultados não possam distinguir quais são as contribuições individuais de cada espécie para a caracterização dos ácidos graxos totais, o perfil de ácidos graxos obtido para o consórcio apresenta algumas características típicas quando comparado a outras referências envolvendo o crescimento de *M. circinelloides*, ou seja, um equilíbrio entre ácidos graxos saturados e ácidos graxos insaturados, como visto na Figura 4.8.

Existe uma ampla gama de fatores que afetam a distribuição de ácidos graxos de *M. circinelloides*. Esta espécie de fungo filamentoso é conhecida por produzir lipídios com características comparáveis aos óleos vegetais, sendo assim considerada um potencial candidato para o estabelecimento de biodiesel microbiano em biorrefinarias (REIS *et al.*, 2019). De fato, o fator de estresse relacionado à razão carbono/nitrogênio disponível no meio de cultivo regula o conteúdo e a distribuição de ácidos graxos para a espécie *M. circinelloides*,

conforme descrito por Wynn *et al.* (2001). Conforme demonstrado aqui, o acúmulo de lipídios no sistema de consórcio tem como fator regulador, dadas as condições experimentais, a presença das algas, o que prejudica a disponibilidade de nitrogênio para as células fúngicas, promovendo assim uma maior relação carbono x nitrogênio eficaz, ou seja, enquanto a concentração de nitrogênio é a mesma nos sistemas isolado e consorciado, o consumo de nitrogênio é maior em um sistema com duas espécies competindo pela mesma fonte de nitrogênio, o que induz maior acúmulo de lipídios pelos fungos. É importante ressaltar que o meio de cultivo aqui selecionado não foi definido como um meio com características que induzam alto acúmulo de lipídios pelo fungo filamentosos; de fato, esta observação pode ser concluída tanto pelas baixas produtividades lipídicas quanto pela caracterização bastante anormal dos ácidos graxos de *M. circinelloides* quando comparadas às diversas aplicações na literatura (REIS *et al.*, 2019), que muitas vezes é descrita com concentrações relativamente mais altas de ambos ácidos graxos mono- e poliinsaturados. O mesmo fundamento vale para a composição dos ácidos graxos por *C. vulgaris*, que muitas vezes apresenta-se como uma biomassa rica em ácidos graxos poliinsaturados (HULTBERG *et al.*, 2014). Portanto, é provável que a biomassa do consórcio introduza alguns fatores de estresse que induzam menor acúmulo de ácidos graxos saturados por ambas as espécies e, simultaneamente, maiores produtividades lipídicas, possivelmente por diminuir a disponibilidade de nitrogênio para ambas as linhagens envolvidas no cultivo.

Embora existam múltiplos fatores que afetam o acúmulo de lipídios e a distribuição de ácidos graxos, pode-se prever que a aplicação do crescimento do consórcio poderia induzir as características necessárias para resultados que possam fornecer lipídios com uma distribuição de ácidos graxos, como visto na Figura 4.8, mais próxima do que seria esperado para aplicações na cadeia produtiva do biodiesel. Nesse sentido, diante das oportunidades apresentadas neste estudo, há potencial para implantação de sistemas de consórcio de algas e fungos com possível controle da distribuição de ácidos graxos, dadas as condições de estresse a que cada cepa está submetida.

4.3 Conclusões

Os resultados apresentados neste capítulo mostraram que é possível recuperar células de microalgas usando uma abordagem simples baseada no cocultivo com um fungo filamentoso. A partir de uma triagem inicial de quatro estratégias diferentes para realizar o sistema de consórcio, com base no efeito de desenvolvimento simultâneo *versus* separado de esporos fúngicos e células de algas, e a presença de uma matriz de suporte, os resultados demonstraram que todas as estratégias estabelecidas obtiveram valores promissores iniciais na recuperação de células de algas do caldo de cultivo.

Os resultados indicaram elevadas taxas de recuperação, todas superiores a 95%, e um efeito sinérgico no acúmulo de lipídios por ambas as espécies estudadas, principalmente considerando o aumento de quatro vezes observado no teor de lipídios pelo sistema de consórcio quando comparado ao crescimento fúngico isolado. A distribuição de ácidos graxos do sistema de consórcio apresentou contribuições de ácidos graxos saturados, mono e poliinsaturados que poderiam ser aplicados para a produção de biodiesel.

REFERÊNCIAS

BARNHARST, T., RAJENDRAN, A., HU, B. Bioremediation of synthetic intensive aquaculture wastewater by a novel feed-grade composite biofilm. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p. 131-142, 2018.

CARVALHO, A.K.F.; RIVALDI, J.D.; BARBOSA, J.C.; DE CASTRO, H.F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides* - A sustainable pathway for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 47-53, 2015.

CARVALHO, A.K.F.; BENTO, H.B.S.; RIVALDI, J.D.; DE CASTRO, H.F. Direct transesterification of *Mucor circinelloides* biomass for biodiesel production: Effect of carbon sources on the accumulation of fungal lipids and biofuel properties. **Fuel**, v. 234, p. 789-796, 2018.

DU, Y.Z.; ALVARO, J.; HYDEN, B.; ZIENKIEWICZ, K.; BENNING, N.; ZIENKIEWICZ, A.; BONITO, G.; BENNING, C. Enhancing oil production and harvest by combining the marine alga *Nannochloropsis oceanica* and the oleaginous fungus *Mortierella elongata*. **Biotechnology Biofuels**, v. 11, p. 1-16, 2018.

GULTOM, S.; HU, B. Review of microalgae harvesting via co-pelletization with filamentous fungus. **Energies**, v.6, p. 5921-5939, 2013.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass Bioenergy**, v. 35, p. 2245-2253, 2011.

HULTBERG, M.; JÖNSSON, H.L.; BERGSTRAND, K.J.; CARLSSON, A.S. Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 465-467, 2014.

LIANG, F.; JIN, F.; LIU, H.; WANG, Y.; CHANG, F. The molecular function of the yeast polo-like kinase Cdc5 in Cdc14 release during early anaphase. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, p. 3671-3679, 2009.

LUTZONI, F., PAGEL, M., REEB, V. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. **Nature**, v. 411, p. 937-940, 2001.

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.

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

RAJENDRAN, A.; FOX, T.; HU, B. Nutrient recovery from ethanol co-products by a novel mycoalgae biofilm: attached cultures of symbiotic fungi and algae. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 1766-1776, 2017.

RAJENDRAN, A.; FOX, T.; REIS, C.R.; WILSON, B.; HU, B. Deposition of manure nutrients in a novel mycoalgae biofilm for nutrient management. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 120-128, 2018.

RAJENDRAN, A.; HU, B. Mycoalgae biofilm: Development of a novel platform technology using algae and fungal cultures. **Biotechnology Biofuels**, v. 9, p. 1-13, 2016.

REIS, C. E. R.; BENTO, H. B. S.; CARVALHO, A. K. F.; RAJENDRAN, A.; HU, B.; DE CASTRO, H. F. Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context, **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, p. 555-570, 2019.

REIS, C. E. R.; RAJENDRAN, A.; SILVA, M. B.; HU, B.; DE CASTRO, H. F. The application of microbial consortia in a biorefinery context: understanding the importance of artificial lichens, In: SINGH, O., CHANDEL, A. (eds) Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy. New York: Springer, Cham, 2018, p. 423-437.

SHONG, J.; DIAZ, M.R.J.; COLLINS, C.H. Towards synthetic microbial consortia for bioprocessing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 798-802, 2012.

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

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.

WREDE, D.; TAHA, M.; MIRANDA, A. F.; KADALI, K.; STEVENSON, T.; BALL, A. S.; MOURADOV, A. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-22, 2014.

WYNN, J.P.; HAMID, A.A.; LI, Y.; RATLEDGE, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. **Microbiology**, v. 147, p. 2857-2864, 2001.

XIA, C.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: Cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. **Biotechnology Biofuels**, v. 4, p. 1-15, 2011.

YANG, L.; LI, H.; WANG, Q. A novel one-step method for oil-rich biomass production and harvesting by co-cultivating microalgae with filamentous fungi in molasses wastewater. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 35-43, 2019.

ZAMALLOA, C.; GULTOM, S. O.; RAJENDRAN, A.; HU, B. Ionic effects on microalgae harvest via microalgae fungi co-pelletization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 145-155, 2017.

ZHANG, J.; HU, B. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 529-535, 2012.

5 AVALIAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE FORMAÇÃO DE LIQUENS POR ADIÇÃO DE MICÉLIO FÚNGICO AO MEIO DE CULTIVO COM MAIOR CONCENTRAÇÃO INICIAL DE CÉLULAS DE *S. obliquus*

5.1 Introdução

A integração do cultivo fúngico com o microalgal vem sendo considerada como alternativa à solução de problemas comumente encontrados na recuperação de células de microalgas (REIS *et al.*, 2019), dada à grande demanda de energia e ao emprego de produtos químicos envolvidos nos processos clássicos de colheita da biomassa.

Os resultados apresentados no Capítulo 4 indicaram uma estratégia de cocultivo, empregando micélio fúngico maduro e o cultivo autotrófico isolado de células microalgais, que resultou na formação de biomassa liquenizada com elevada proporção de biomassa de algas (79%) em sua composição, bem como, eficiência de recuperação de células de 99,5%. Este resultado indica a possibilidade de utilização de uma nova plataforma para a recuperação de células, por uma técnica limpa, ao mesmo tempo que pode fornecer biomassa rica em lipídios para diferentes aplicações. No entanto, esta estratégia de cocultivo precisa ser aplicada a outras espécies de microalgas, para validação dos resultados.

A microalga de água doce *S. obliquus* CCCMA-UFSCar 604 foi escolhida para este estudo, para a formação de consórcio com o fungo filamentoso, por ser uma espécie robusta, com características de fácil crescimento e manutenção e boa produtora de *single cell oil* (SCO) (DARKI; SEYFABADI; FAYAZI, 2017; CHEUNG *et al.*, 2020; LOGANATHAN *et al.*, 2020). Neste aspecto, pode-se inferir que esta espécie tem características em comum com a espécie modelo *Chlorella vulgaris*, a qual foi a base para os estudos de liquenização.

Além disso, no que se refere a biorrefinarias, há diversas matérias primas e coprodutos, gerados em grande quantidade, que podem ser integrados, com o potencial de melhorar a qualidade da biomassa microbiana (BENTO *et al.*, 2020). Dentre estas matérias-primas, o melaço de cana-de-açúcar (MC) destaca-se como um subproduto valioso. O MC é amplamente produzido no Brasil, assim como na Índia, Tailândia, China e Paquistão, sendo utilizado como matéria-prima

ou suplemento rico em diferentes segmentos dentro e fora de biorrefinarias (JIRU *et al.*, 2018; BENTO *et al.*, 2020; TINÔCO *et al.*, 2021).

O presente capítulo avaliou a estratégia IV, estabelecida no capítulo anterior, em cocultivos com as espécies *Scenedesmus obliquus* e *M. circinelloides* URM 4182. O efeito da adição do melaço de cana-de-açúcar como suplemento adicionado ao meio de cultivo da microalga e sua influência no aumento da biomassa liquenizada e na acumulação lipídica também foi avaliado. A interação física entre algas e fungos foi registrada em microfotografias efetuadas com auxílio de microscopia eletrônica de varredura.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Formação de líquens entre *S. obliquus* e *M. circinelloides*

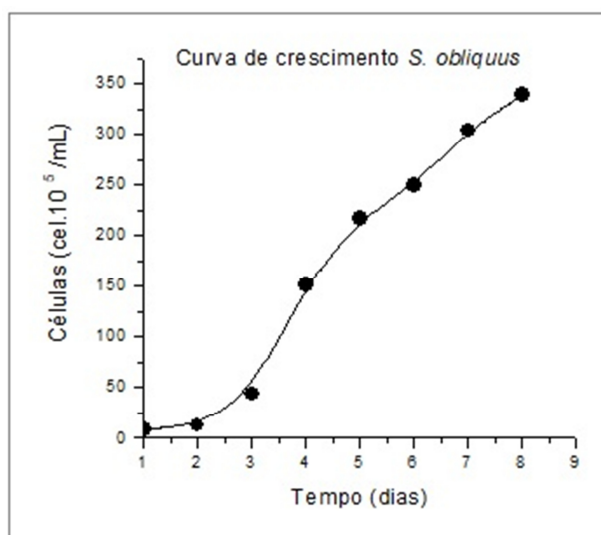
Em cultivos exploratórios, reaplicou-se a estratégia IV, que gerou os melhores resultados anteriormente (capítulo 4), para o cocultivo entre *S. obliquus* e *M. circinelloides*. A eficiência de recuperação de células alcançou 95,5%, contudo, a biomassa liquenizada foi composta por somente 12% de biomassa da microalgas, resultados bastante diferentes aos obtidos para esta estratégia quando aplicada ao consórcio *C. vulgaris* e *M. circinelloides* (79 % de biomassa de *C. vulgaris* na composição da biomassa de líquen e 99,5% de eficiência de recuperação de células).

O meio de cultivo do consórcio em formação apresentou cor verde pronunciada, indicativo de muitas células de microalgas em suspensão, durante todo o período de incubação; tal aspecto refletiu-se nos baixos percentuais de biomassa microalgal na composição da biomassa do consórcio microbiano (12%), bem como na eficiência de recuperação de células (95,5%). Um único meio de cultivo (meio de cultivo A) havia sido utilizado para ambas as espécies componentes (fungo e alga) na formação dos líquens. O meio de cultivo é um dos fatores que influencia fortemente a taxa de crescimento das espécies cultivadas, variando de espécie para espécie (CONVERTI *et al.*, 2009).

Verificado que para a espécie *S. obliquus*, o meio de cultivo A não favoreceu seu desenvolvimento, buscou-se uma nova avaliação, modificando este parâmetro. A escolha do novo meio de cultivo WC (GUILLARD; LORENZEN,

1972) foi efetuada após comparação com dados na literatura (SRINUANPAN *et al.*, 2018; ABOMOHRA *et al.*, 2016). Cultivos estáticos foram realizados, para avaliar o seu desenvolvimento. A curva de crescimento de células de *S. obliquus* em meio de cultivo WC demonstrou que as células iniciam a fase de crescimento exponencial com 3 dias de incubação, permanecendo por pelo menos mais 6 dias nesta fase, o que pode favorecer a etapa posterior, de formação do consórcio com o fungo filamentososo. A Figura 5.1 ilustra a curva de crescimento das células de *S. obliquus* inoculadas em meio de cultivo WC.

Figura 5.1 – Curva de crescimento de células de *S. obliquus* em meio WC.

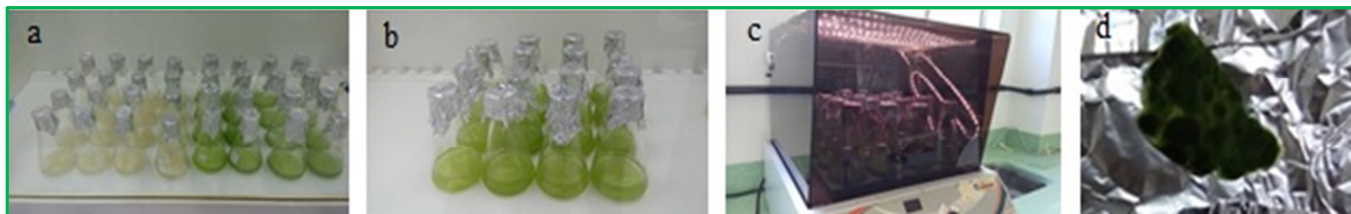


Fonte : Própria autora.

Com a utilização de meio de cultivo WC para a incubação das células de *S. obliquus* e o meio de cultivo A para os esporos do fungo filamentososo, obteve-se uma biomassa liquenizada composta por 51% de biomassa de algas, e eficiência de recuperação de células de 99,5%. Estes resultados foram bastante similares aos obtidos quando a estratégia II, de imobilização sobre suporte de tela de fibra de algodão, avaliada para as cepas de *C. vulgaris* e *M. circinelloides*.

A Figura 5.2 ilustra as principais etapas da formação de líquens com diferentes meios de cultivo para *S. obliquus* e *M. circinelloides*.

Figura 5.2 – Etapas principais da formação dos líquens: (a) frascos contendo micélios fúngicos e suspensão de células após incubação por 72 h (b) aspecto dos cocultivos formados logo após adição do micélio fúngico ao meio de cultivo das microalgas (c) incubação dos frascos em shaker orbital (d) aspecto do líquen após a colheita.



Fonte: Própria autora.

De acordo com esses resultados, houve substancial incremento na contribuição de biomassa de algas na composição dos líquens formados (aumento de 39%), com a incubação das células em meio de cultivo WC, em comparação aos resultados obtidos quando as células de *S. obliquus* foram cultivadas em meio de cultivo A. Quanto à eficiência de recuperação de células de microalgas, esta também aumentou em 4%.

Estes resultados mostraram que o meio de cultivo WC foi mais adequado ao cultivo da espécie *S. obliquus*, em comparação com o meio de cultivo A. Tais evidências também confirmam que, na formação de consórcios microbianos, a escolha do meio de cultivo pode ser significativa para o resultado do processo.

5.2.2 Avaliação do conteúdo lipídico e do efeito da suplementação do meio de cultivo com melado de cana-de-açúcar

Ambos os microrganismos aqui avaliados foram amplamente descritos como microrganismos produtores de lipídios (XIA *et al.*, 2011; TRAN *et al.*, 2012). No presente trabalho, a cepa de *Scenedesmus obliquus* desenvolveu-se inicialmente em meio de cultivo A. Da biomassa de algas obteve-se $22,3 \pm 0,2$ % em lipídios totais, confirmando que trata-se de uma espécie oleaginosa (lipídios totais acima de 20%). Essa constatação é interessante, pois torna a espécie promissora para aplicações industriais, como matéria-prima para biodiesel ou intermediários de química fina. Após a substituição do meio de cultivo da microalga para WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972), os lipídios totais da biomassa de algas foram novamente quantificados, resultando em $28,5 \pm 0,3$ % e os lipídios totais da biomassa liquenizada resultaram em $23,0 \pm 0,4$ %.

Cultivos foram realizados com suplementação de MC ao meio de cultivo da microalga *S. obliquus*, com a finalidade de avaliar o efeito sobre a biomassa e conteúdo lipídico. A Tabela 5.2 resume os parâmetros bioquímicos de cultivo obtidos para as microalgas e os respectivos resultados para os consórcios formados sem e com a suplementação de MC.

Tabela 5.2- Parâmetros bioquímicos resultantes do cultivo da microalga *S. obliquus*, do fungo *M. circinelloides* e os consórcios formados - sem e com adição de melaço de cana-de-açúcar (MC) ao meio de cultivo de microalgas.

Parâmetros	Cultivo sem MC		Cultivo com MC		Fungo filamentoso
	Consórcio	Microalga	Consórcio	Microalga	
X (mg/L)	1000 ± 0,7	524 ± 0,7	1270 ± 0,7	1042 ± 0,7	900 ± 0,5
P (mg/L)	230,0 ± 0,3	149,2 ± 0,3	482,6 ± 0,3	322,0 ± 0,3	64,8 ± 0,3
P (%)	23,0 ± 0,4	28,5 ± 0,3	38,2 ± 0,5	30,9 ± 0,4	7,2 ± 0,3
Q _x (mg/L.dia)	133,3 ± 0,4	69,8 ± 0,4	169,3 ± 0,4	138,9 ± 0,4	120 ± 0,4
Q _p (mg/L.dia)	30,7 ± 0,4	19,9 ± 0,4	64,4 ± 0,5	42,9 ± 0,4	8,6 ± 0,4

Fonte: Própria autora.

O melaço de cana-de-açúcar não foi adicionado ao meio de cultivo dos fungos, conseqüentemente, não houve variações nos parâmetros bioquímicos dos fungos em cultivo isolado, relacionadas ao MC.

Os resultados obtidos demonstraram que os lipídios aumentaram 3,5 vezes sem o uso de melaço nas biomassas de líquen e 7,5 vezes quando o MC foi utilizado, em comparação com os parâmetros das cepas fúngicas. Em relação ao rendimento lipídico específico (%), esse aumento foi de 3,2 e 5,3 vezes, respectivamente, em relação aos parâmetros da linhagem fúngica, atingindo 23% e 38% em peso de biomassa seca, respectivamente.

Os resultados da taxa volumétrica de produção de biomassa (Q_x) demonstram que as taxas de crescimento para os microrganismos avaliados foram diferentes. Como a cepa do fungo cresce mais rápido, podem ser esperados valores mais altos de Q_x para o fungo que para a microalga no cultivo, e isso de fato ocorreu onde a microalga foi cultivada sem a suplementação de MC no meio de cultivo. Por outro lado, as taxas de crescimento das microalgas foram maiores que as do fungo, quando os cultivos foram realizados com

suplementação de MC, pois, nessas condições, o cultivo de algas tornou-se mixotrófico, com consumo tanto de gás CO₂, quanto de fontes orgânicas de carbono. A baixa concentração de glicose no meio de crescimento fúngico (2 g/L) não forneceu a relação C/N ideal para a produção de lipídios fúngicos. A fonte de carbono foi quase totalmente consumida em 24 h de incubação, o que explica o resultado de 7,2 ± 0,3% em relação ao peso da biomassa seca, que foi muito inferior a outros valores relatados na literatura (CARVALHO *et al.*, 2019; REIS *et al.*, 2020). Por outro lado, notou-se que o meio de cultivo WC mostrou-se adequado para o acúmulo de lipídios pela espécie *S. obliquus*, cujo rendimento lipídico atingiu 28,5 ± 0,3% em cultivo isolado. Além disso, a suplementação de MC no cultivo de algas favoreceu notavelmente tanto a biomassa (1042 mg/L algas / 1270 mg/L líquen) quanto o acúmulo de lipídios (322 mg/L algas / 482,6 mg/L líquen) pelas cepas de microalgas e pelo consórcio, em comparação aos cultivos sem MC. A influência positiva do MC como meio de suplementação para aumentar a produção de biomassa e lipídios para a linhagem de *M. circinelloides* foi demonstrada por Bento *et al.* (2020).

No presente trabalho, o foco foi a formação de um consórcio entre algas e fungos, onde as microalgas foram o vetor para acúmulo de biomassa e lipídios e o micélio do fungo filamentosos serviu como bio-suporte para a ancoragem das células das microalgas.

As microalgas são capazes de sintetizar e acumular lipídios em suas células para armazenamento de energia. Esses lipídios são biossintetizados pelo acúmulo de NADH e L- α -fosfoglicerol derivados da via glicolítica, que ocorre quando a atividade da enzima citrato é inibida por uma baixa taxa fotossintética ou baixa disponibilidade de nitrogênio, impedindo a acetil-CoA de reagir no ciclo TCA. A acetil-CoA acumulada ativa a respectiva enzima carboxilase, causando a transferência de resíduos acila que atuam em conjunto com a L-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase, gerando malonil-CoA e ácido L- α -fosfático, bem como outros fosfolipídios, diacilgliceróis e triacilgliceróis (HUANG *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2016).

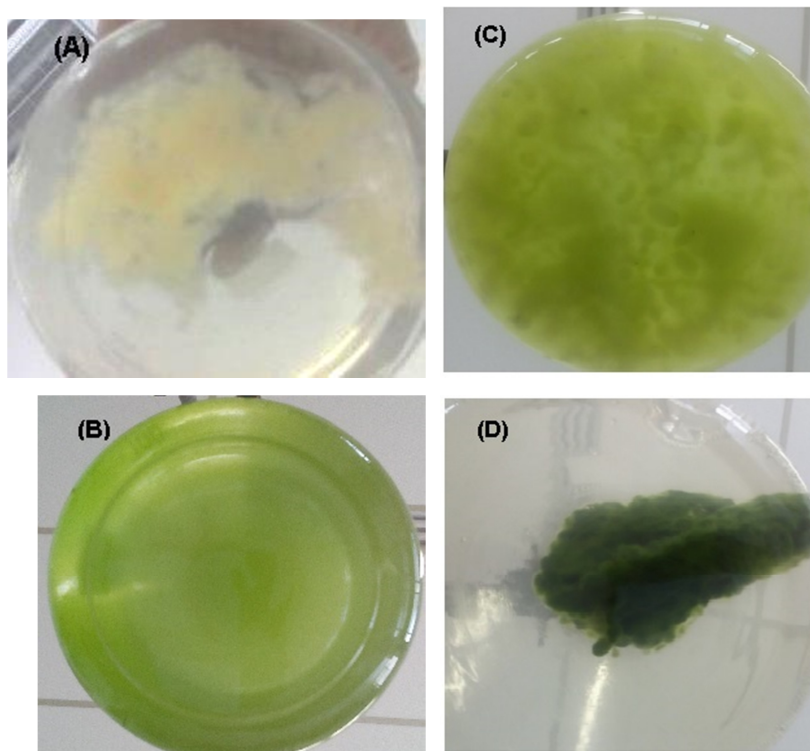
Com a suplementação do meio de cultivo com MC, o crescimento celular tornou-se mixotrófico e, além da luz para a fotossíntese, as espécies de algas metabolizaram carbono de açúcares presentes no MC. Os açúcares totais no caldo do cultivo imediatamente antes da incubação com adição de MC ao meio de

cultivo, foram quantificados, resultando em 0,360 g/L. Após 180 h de incubação, os açúcares restantes totalizaram 0,013 g/L, confirmando que praticamente todo o açúcar foi consumido.

O fato de o cultivo de microalgas com MC apresentar aumento na quantidade de biomassa (Tabela 5.2) indica que a maioria dos açúcares adicionados foi assimilada pelas microalgas, contribuindo para a produção de biomassa e lipídios no consórcio.

A Figura 5.3 mostra imagens das etapas de formação da estrutura tipo líquen, detalhando os aspectos do micélio fúngico isolado e do cultivo de células de microalgas isolado, seguido do aspecto do micélio fúngico adicionado ao meio de algas e, finalmente, a formação da estrutura semelhante ao líquen após 108 h. Visualmente foi possível observar que a maioria das células de algas aderiu às hifas/micélios do fungo, tornando o meio de cultivo bastante límpido, projetando-se uma alta eficiência de colheita a ser alcançada.

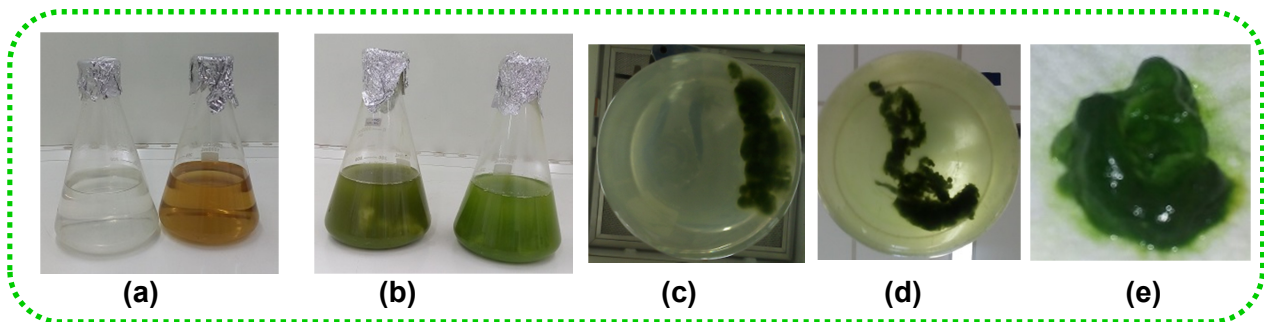
Figura 5.3 – Imagens das diferentes etapas de formação da estrutura tipo líquen e o processo de liquenização: Em (A), aspecto do micélio fúngico em cultivo isolado, em (B) aspecto do concentrado de células de microalga em cultivo isolado, em (C), o micélio fúngico adicionado ao meio de cultivo da microalga, em (D) aspecto da formação da estrutura tipo líquen após 108 h; nota-se, visualmente, que a maioria das células de algas aderiu às hifas/micélio do fungo, o que pode resultar em uma alta eficiência de colheita.



Fonte: Própria autora.

A Figura 5.4 ilustra os diferentes aspectos da estratégia experimental de formação dos líquens, mostrando desde os meios de cultivo sem e com adição de melaço de cana-de-açúcar, até a biomassa liquenizada após a colheita.

Figura 5.4 - Diferentes aspectos da estratégia experimental de liquenização: (a) meio de cultivo WC sem MC (à esquerda) e com MC (à direita); (b) aspectos dos frascos com células de *S. obliquus* e fungo *M. circinelloides* com MC (à esquerda) e sem MC (à direita), logo após adição do micélio ao cultivo de algas; (c) e (d) aspectos dos líquens formados após 7,5 dias: à esquerda líquen formado com adição de MC e à direita líquen formado sem adição de MC; (e) aspecto do líquen formado com adição de MC, logo após a colheita.



Fonte: Própria autora.

5.2.3 Caracterização lipídica: avaliação do perfil em ácidos graxos

Os resultados apresentados na Tabela 5.3 descrevem a composição em ácidos graxos de lipídios da microalga *S. obliquus*, com e sem suplementação de MC, e também o perfil em ácidos graxos dos consórcios gerados entre a microalga e o fungo filamentoso.

Tabela 5.3 - Composição em ácidos graxos do material lipídico das biomassas de microalga (*S. obliquus*), fungo (*M. circinelloides*) e líquens cultivados em *shaker* orbital por 7,5 dias.

Ácidos graxos	Cultivo sem MC		Cultivo com MC		Fungo
	Consórcio	Microalga	Consórcio	Microalga	
C 8:0 Caprílico	3,7 ± 0,17	10,7 ± 0,18	0,4 ± 0,25	0,1 ± 0,25	18,1 ± 0,23
C 16:0 Palmítico	30,7 ± 0,15	31,7 ± 0,30	18,9 ± 0,18	33,1 ± 0,18	24,0 ± 0,29
C 18:0 Esteárico	0	0	1,6 ± 0,18	1,5 ± 0,18	4,2 ± 0,17
SFA Ácidos graxos saturados	34,4	42,4	20,9	34,7	46,3
C 16:1 Palmitoleico	0	0	9,7 ± 0,18	1,2 ± 0,25	0
C 18:1 Oleico	15,3 ± 0,22	13,5 ± 0,31	22,1 ± 0,31	30,6 ± 0,30	0
MUFA Ácidos graxos Monosaturados	15,3	13,5	31,8	31,7	0
C 18:2 Linoleico	31,1 ± 0,20	36,9 ± 0,18	16,1 ± 0,25	12,5 ± 0,30	22,9 ± 0,16
C 18:3 Linolenico	19,2 ± 0,20	7,2 ± 0,18	31,3 ± 0,25	21,0 ± 0,30	30,8 ± 0,27
PUFA Ácidos graxos Poli-insaturados	50,3	44,1	47,4	33,5	53,7

Fonte: Própria autora.

Em relação à composição dos ácidos graxos obtidos da biomassa sem suplementação de MC, o consórcio microbiano apresenta um perfil em ácidos graxos variando de C8 a C18, com distribuição equilibrada entre ácidos graxos saturados monoinsaturados e poli-insaturados. Os valores totais obtidos foram SFA = 34,4%, MUFA = 15,3% e PUFA = 50,3%. As propriedades dos lipídios saponificáveis e dos produtos gerados, como o biodiesel, estão diretamente relacionadas ao perfil de ácidos graxos. Por exemplo, a viscosidade e densidade mais elevadas em produtos de biodiesel geralmente estão associadas a maiores graus de saturação; por outro lado, os ácidos graxos insaturados, em abundância, podem reduzir a resistência do biodiesel à oxidação (TALEBI *et al.*, 2013). Portanto, em comparação com o que tem sido relatado por diferentes autores (TALEBI *et al.*, 2013), para essa distribuição de ácidos graxos, espera-se um bom equilíbrio entre as propriedades de fluxo e viscosidade, em decorrência também da presença de ácidos insaturados, bem como estabilidade à oxidação, devido aos ácidos graxos saturados na composição.

Em relação à composição de ácidos graxos para o consórcio cultivado com suplementação de MC, há uma menor contribuição em ácidos graxos saturados,

porém, uma maior contribuição em ácidos graxos monoinsaturados, devido à ocorrência de ácido palmitoléico, além do ácido oléico. Em suma, SFA + MUFA resultaram em 52,7%, enquanto os ácidos graxos poliinsaturados totalizaram 47,4%. Esses valores são bastante próximos da composição em ácidos graxos sem suplementação de MC, contudo, observa-se no grupo de ácidos graxos poliinsaturados da biomassa suplementada com MC, a predominância de ácido linolenico, que ocorre em proporção bem maior que o ácido linoleico. Observa-se também no grupo dos ácidos graxos poli-insaturados, valores muito próximos à composição em ácidos graxos dos lipídios do fungo filamentosos.

Assim, notou-se que o perfil lipídico da composição do consórcio microbiano e o perfil da microalga cultivada com MC apresentaram composições bastante similares. Embora o uso da suplementação com MC tenha resultado em um aumento substancial na biomassa e lipídios totais, a composição em ácidos graxos não foi significativamente diferente. Esses primeiros resultados sugerem positivamente que o uso do MC em cocultivo é positivo e merece ser mais explorado.

5.2.4 Avaliação da eficiência de colheita e composição da biomassa do consórcio microbiano

Considerando as microalgas do gênero *Scenedesmus*, poucos relatos têm descrito a eficiência de colheita por operações não convencionais, principalmente via formação de um consórcio alga:fungo.

A Tabela 5.4 registra resultados obtidos por diferentes autores.

Tabela 5.4 - Eficiências de recuperação (ER) de consórcios microalga:fungo descritas na literatura e no presente trabalho.

Espécies de microalgas	Espécies de fungos	ER (%)	Referências
<i>Scenedesmus</i> sp	<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	>94	SRINUANPAN <i>et al.</i> , 2018a
<i>Scenedesmus obliquus</i> SIT06	<i>Cunninghamella echinulata</i> TPU 4652	92,7	SRINUANPAN <i>et al.</i> , 2018b
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	>90	WREDE <i>et al.</i> , 2014
<i>Scenedesmus</i> sp	<i>Aspergillus niger</i>	99,4	PEI <i>et al.</i> , 2021
<i>Scenedesmus obliquus</i> CCCMA-UFSCar 604	<i>Mucor circinelloides</i> URM 4182	99,7	Este trabalho

Fonte: Própria autora.

Srinuampan *et al.* (2018a) estudaram a formação de líquens por *Scenedesmus* sp e *Trichoderma reesei* QM 9414, e mostraram elevada eficiência de colheita (> 94%). Em um outro estudo, Srinuampan *et al.* (2018b) alcançaram eficiência de recuperação acima de 92,7% das células de *Scenedesmus obliquus* SIT06 por *Cunninghamella echinulata* TPU 4652. Um consórcio obtido por *Scenedesmus quadricauda* e *Aspergillus fumigatus* também resultou em uma elevada eficiência de colheita (>90%) em um estudo realizado por Wrede *et al.* (2014).

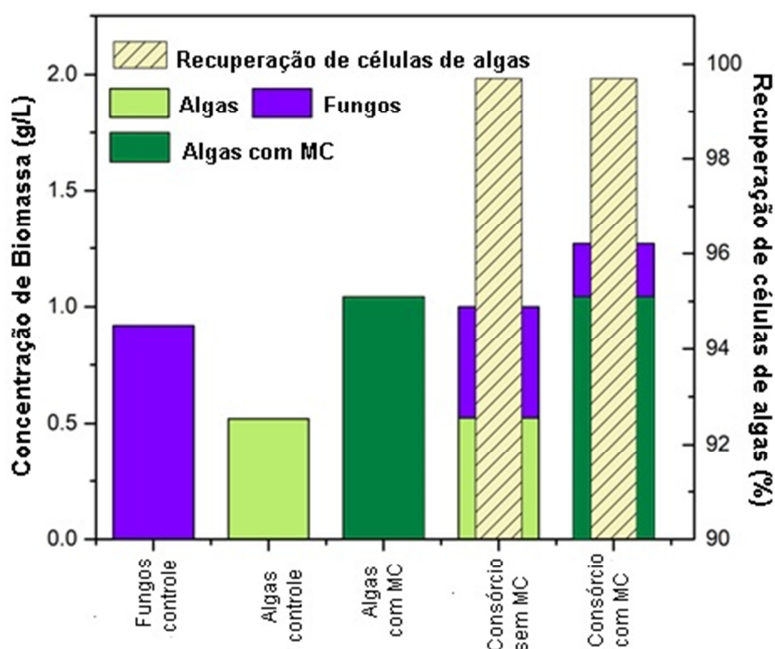
Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram uma elevada eficiência de colheita de *Scenedesmus obliquus* pelo *M. circinelloides* URM 4182, alcançando mínimo de 99,7%. Um resultado similar foi demonstrado por Pei *et al.* (2021) em um consórcio composto por *Scenedesmus* sp. e *Aspergillus niger*, com uma colheita de células de 99,4%. Esses estudos juntos são uma boa referência para sugerir o potencial de bioprocesso aqui proposto, em atender algumas necessidades de biorrefinaria à base de fungos e algas, como elevada eficiência de colheita combinada com alta produção de lipídios.

Quanto à contribuição em biomassa de microalgas no consórcio, a estratégia experimental empregando suplementação de MC ao meio de cultivo

resultou em uma contribuição de 80% de biomassa de algas ao consórcio alga-fungo, bastante superior em relação ao resultado obtido anteriormente (50%), e equiparável ao resultado obtido com a espécie *Chlorella vulgaris* (78 - 79%) em etapas anteriores do presente estudo (ZORN *et al.*, 2020).

A Figura 5.5 distingue os resultados alcançados, onde verifica-se que a adição de MC favoreceu o aumento da biomassa de microalgas no cultivo isolado da espécie algal e no respectivo consórcio, alcançando igual eficiência de colheita nos consórcios com e sem melação de cana-de-açúcar (99,7%).

Figura 5.5 – Síntese de resultados de acúmulo e distribuição de biomassa: de fungos (em roxo), de algas como controle (em verde claro), de algas com MC (em verde escuro) e % recuperação de células de algas (listrado).



Fonte: Própria autora.

Esses dados sugerem uma integração potencial da agroindústria da cana-de-açúcar em biorrefinarias sustentáveis baseadas em algas, o que pode promover novas alternativas de destaque para bioprocessos integrados e eficientes.

5.3 Conclusões

Os microrganismos *S. obliquus* e *M. circinelloides* compuseram uma estrutura tipo líquen que resultou em uma biomassa rica em lipídios única (38,2% em peso), na qual um micélio fúngico maduro desempenhou o papel de bio-suporte às células de microalgas. A suplementação do meio de crescimento de algas com MC contribuiu para o aumento da biomassa e teor de lipídios nesta estrutura. Uma composição equilibrada de ácidos graxos, potencialmente adequada como matéria-prima para a produção de biodiesel e outros bioprodutos de valor agregado, bem como uma elevada eficiência de colheita de células foi apresentada (99,7%), o que demonstra uma alternativa ecologicamente correta para a colheita de biomassa de algas.

REFERÊNCIAS

ABOMOHRRA, A. EL-F.; JIN, W.; EL-SHEEKH, M. Enhancement of lipid extraction for improved biodiesel recovery from the biodiesel promising microalga *Scenedesmus obliquus*. **Energy Conversion and Management**, v. 108, p. 23-29, 2016.

BENTO H.B.S.; CARVALHO, A.K.F.; REIS, C.E.R.; DE CASTRO, H.F. Single cell oil production and modification for fuel and food applications: Assessing the potential of sugarcane molasses as culture medium for filamentous fungus. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 1-7, 2020.

CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B. S.; REIS, C. E. R.; DE CASTRO, H. F. Sustainable enzymatic approaches in a fungal lipid biorefinery based in sugarcane bagasse hydrolysate as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 269-275. 2019.

CHEUNG, S. L.; ALLEN, D. G.; SHORT, S. M.; Specific quantification of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* in mixed-species algal biofilms. **Bioresource Technology**, v. 295, p. 1-9, 2020.

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

DARKI, B.Z.; SEYFABADI, J.; FAYAZI, S. Effect of nutrients on total lipid content and fatty acids profile of *Scenedesmus obliquus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 1-12, 2017.

GUILLARD, R. R.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide C1,2. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

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

JIRU, T.M.; STEYN, L.; POHL, C.; ABATE, D. Production of single cell oil from cane molasses by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 as a biodiesel feedstock. **Chemistry Central Journal**, v. 12, p. 1-7, 2018.

LOGANATHAN, B.G.; ORSAT, V.; LEFSRUD, M.; WU, B.S. A comprehensive study on the effect of light quality imparted by lightemitting diodes (LEDs) on the physiological and biochemical properties of the microalgal consortia of *Chlorella variabilis* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in dairy wastewater. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 1445-1455, 2020.

PEI, X.-Y.; REN, H.-Y.; LIU, B.-F. Flocculation performance and mechanism of fungal pellets on harvesting of microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 1-6, 2021.

REIS, C. E. R.; BENTO, H. B. S.; CARVALHO, A. K. F.; RAJENDRAN, A.; HU, B.; DE CASTRO, H. F. Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context, **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, p. 555-570, 2019.

REIS, C.E.R.; VALLE, G.F.; BENTO, H.B.S.; CARVALHO, A.K.F.; ALVES, T.A.; DE CASTRO, H.F. Sugarcane by-products within the biodiesel production chain: vinasse and molasses as feedstock for oleaginous fungi and conversion to ethyl esters. **Fuel**, v. 277, p. 1-7, 2020.

SINGH, P.; KUMARI, S.; GULDHE, A.; MISRA, R.; RAWAT, I.; BUX, F. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. **Renew Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 1-16, 2016.

SRINUANPAN, S.; CHAWPRAKNOI, A.; CHANTARIT, S.; CHEIRSILP, B.; PRASERTAN, P. A rapid method for harvesting and immobilization of oleaginous microalgae using pellet-forming filamentous fungi and the application in phytoremediation of secondary effluent. **International Journal of Phytoremediation**, v. 20, p. 1017-1024, 2018a.

SRINUANPAN, S.; CHEIRSILP, B.; PRASERTAN, P.; KATO, Y.; ASANO, Y. Photoautotrophic cultivation of oleaginous microalgae and co-pelletization with filamentous fungi for cost-effective harvesting process and improved lipid yield. **Aquaculture International**, v. 26, p. 1493-1509, 2018b.

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

TINÔCO, D.; CASTRO, A.M.; SELDIN, L.; FREIRE, D.M.G. Production of (2R,3R)-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* PM 3605 from crude glycerol supplemented with sugarcane molasses. **Process Biochemistry**, v. 106, p. 88-95, 2021.

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.

WREDE, D.; TAHA, M.; MIRANDA, A. F.; KADALI, K.; STEVENSON, T.; BALL, A. S.; MOURADOV, A. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. **PloS ONE**, v. 9, p. 1-22, 2014.

XIA, C.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: Cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. **Biotechnology Biofuels**, v. 4, p. 1-15, 2011.

ZORN, S.M.F.E.; REIS, C.E.R.; SILVA, M.B.; HU, B.; DE CASTRO, H.F. Consortium growth of filamentous fungi and microalgae: evaluation of different cultivation strategies to optimize cell harvesting and lipid accumulation. **Energies**, v. 13, p. 1-15, 2020.

6 AVALIAÇÃO DE LIQUENS ARTIFICIAIS PRODUZIDOS EM MESA AGITADORA ORBITAL

6.1 Introdução

As microalgas são matéria prima para a geração de bioenergia, pois são capazes de sintetizar elevadas quantidades de ácidos graxos e triacilgliceróis (SIBI *et al.*, 2016). De outro lado, associado à robustez inerente, leveduras e fungos podem ser considerados como fábricas de células ideais para a síntese de produtos em biorrefinarias (REIS *et al.*, 2019). Unindo o potencial de microalgas e fungos, a cocultura, através dos consórcios microbianos, é uma alternativa para minimizar o custo de produção de biocombustíveis, especificamente por reduzir o custo de investimento na etapa de colheita, uma vez que os fungos filamentosos atuam como agentes biofloculantes (WREDE *et al.*, 2014).

Os resultados apresentados no capítulo 5 confirmaram que os consórcios microbianos são capazes de gerar uma biomassa rica em lipídios, e a formação de uma biomassa composta é possível por meio de um método simples, de baixo custo e sustentável.

No presente capítulo, avaliou-se o cocultivo realizado em um novo equipamento, a mesa agitadora orbital. Foram realizadas análises de caracterização da biomassa: microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia na região de infravermelho por transformada de Fourier por refletância total atenuada (ATR-FTIR). A incubação efetuada em mesa agitadora propiciou a obtenção de biomassa em maior quantidade, para realização de reações de transesterificação *in situ*, para a síntese de biolubrificante e de biodiesel.

Os biolubrificantes podem ser uma alternativa atraente aos lubrificantes, feitos a partir de frações de petróleo, pois possuem elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade, podendo ser produzidos a partir de várias fontes renováveis (MOBARAK *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2020; BOLINA; GOMES; MENDES, 2021). Das diversas fontes disponíveis para produzir biolubrificantes, os óleos vegetais são uma primeira alternativa (MOBARAK *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2020; BOLINA; GOMES; MENDES, 2021), contudo, diversos óleos vegetais possuem quantidades excessivas de ácidos graxos poliinsaturados, o que reduz a

estabilidade térmica do biolubrificante resultante (DE SOUZA *et al.*, 2012; QIAO *et al.*, 2017). O óleo de microalgas apresenta-se como uma boa alternativa aos óleos de origem vegetal, por apresentar diferentes tipos de composição, dependendo da espécie de microalga e dos parâmetros de cultivo (BREDDA *et al.*, 2018; HAWROT-PAW *et al.*, 2021; PATEL *et al.*, 2021). Esta variação de composição é possível também em óleos extraídos de biomassas liquenizadas. Além do biolubrificante, o biodiesel pode ser sintetizado a partir da biomassa oleaginosa de microalgas ou de fungos (CHEN *et al.*, 2021; HAWROT-PAW *et al.*, 2021), portanto, tem-se uma fonte interessante, considerando os consórcios microbianos compostos com essas espécies.

Com base na composição em ácidos graxos, obtida da metilação do óleo extraído da biomassa microbiana, algumas propriedades para o biodiesel foram preditas.

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Parâmetros de crescimento das espécies microbianas e dos líquens artificiais

A estratégia de cocultivo validada no capítulo anterior, de formação de líquens com as espécies *S. obliquus* e *M. circinelloides* em *shaker* orbital, com suplementação de MC adicionado ao meio de cultivo WC, foi efetuada em mesa agitadora orbital.

Três diferentes tamanhos de frascos erlenmeyers (500 mL, 1000 mL e 2000 mL) foram utilizados, em diferentes cultivos, onde os respectivos volumes de meio de cultivo WC: 100 mL, 200 mL e 400 mL foram adicionados.

O objetivo destes cocultivos foi a avaliação dos parâmetros bioquímicos de concentração de biomassa e acumulação lipídica, neste novo equipamento. Observando-se que a formação dos líquens iniciou-se quando da junção do micélio fúngico com o concentrado de células das microalgas (após 72 h em cultivos isolados), para os cálculos dos parâmetros bioquímicos neste trabalho foi considerada a produtividade do processo com um tempo total de 7,5 dias, o que contabilizou o tempo desde o início em que células e esporos foram inoculados separadamente.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos e de produtividade dos cocultivos efetuados em mesa agitadora foram comparados aos mesmos parâmetros obtidos previamente em *shaker* orbital. Estes resultados estão registrados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1- Parâmetros bioquímicos de consórcios alga:fungo, resultantes dos cocultivos efetuados em mesa agitadora orbital com diferentes volumes de erlenmeyers, comparados aos parâmetros obtidos de cocultivos em *shaker* orbital.

Parâmetros	Cocultivos com volumes variados			
	Mesa agitadora orbital			<i>Shaker orbital</i>
	500 mL	1000 mL	2000 mL	250 mL
X (g/L)	3,21 ± 0,3	2,55 ± 0,4	2,38 ± 0,5	1,27 ± 0,7
P (g.L)	1,03 ± 0,3	0,82 ± 0,4	0,76 ± 0,5	0,48 ± 0,3
Q _x (g/L.dia)	0,43 ± 0,3	0,34 ± 0,5	0,32 ± 0,5	0,17 ± 0,4
Q _p (g/L.dia)	0,14 ± 0,3	0,11 ± 0,5	0,10 ± 0,5	0,06 ± 0,5

Fonte: Própria autora.

Os valores médios para os parâmetros obtidos em mesa agitadora orbital foram $2,72 \pm 0,4$ g/L para concentração de biomassa, $0,87 \pm 0,4$ g/L para concentração lipídica, $0,36 \pm 0,4$ g/L.dia para a produtividade mássica e $0,12 \pm 0,4$ g/L.dia para a produtividade lipídica. Estes resultados demonstraram que as concentrações em biomassa e lipídios, bem como as produtividades mássica e lipídicas dobraram em comparação aos valores obtidos em *shaker* orbital.

Os volumes de meio de cultivo e quantidades de células manipulados foram maiores em comparação aos que foram ensaiados em *shaker* orbital, o que pode ter contribuído para a redução de possíveis perdas durante o processo, resultando em maiores valores de concentrações de biomassa, acúmulo de lipídios e as respectivas produtividades. Contudo, o lipídios totais dos líquens formados resultaram em $32,0 \pm 0,5\%$, valor inferior ao obtido em cocultivo em *shaker* ($38,0\% \pm 0,4\%$). Tal resultado pode ser considerado coerente, levando-se em consideração alguns fatores de maior exposição dos microrganismos a variações de temperatura e iluminação, durante o processo de formação dos líquens em mesa agitadora.

Durante o período de incubação em mesa agitadora, a variação de temperatura foi da ordem de ± 2 °C, uma maior variação de temperatura, pois o equipamento utilizado não é provido de termostato e o controle de temperatura restringiu-se ao ambiente laboratorial. No capítulo 2, seção 2.6, foram descritos os principais fatores que influenciam sobre a produtividade dos lipídios, dentre estes fatores, a variação de temperatura, que pode levar a condições de desequilíbrio celular, inibindo a taxa de crescimento e acumulação lipídicas (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013; VANHERCKE *et al.*, 2013).

Outro fator influente, também referenciado na seção 2.6, a intensidade de luz, que modula a composição bioquímica de microalgas, especificamente quanto a produção de lipídios e carboidratos. A intensidade luminosa foi medida e mantida em $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, porém, por tratar-se de um equipamento composto por uma plataforma aberta ao ambiente, pode ter ocorrido determinada variação de luminosidade na superfície dos frascos ou no seu interior, influenciando o metabolismo dos microrganismos durante o processo de incubação.

Uma restrição encontrada nessa etapa do trabalho foi quanto ao aumento da quantidade de esporos para corresponder proporcionalmente à quantidade de células de algas. Não foi possível realizar o cultivo com maiores quantidades de esporos, pois o *shaker* orbital para a incubação de esporos do fungo filamentosos permite somente a utilização de frascos erlenmeyers de 250 mL. Sendo assim, decidiu-se por aumentar a quantidade de micélios fúngicos proporcionalmente aos volumes de meio de cultivo e de células de algas. Não foi possível avaliar o processo de liquenização com um único micélio fúngico, formado a partir de um maior número de esporos inoculados juntos.

A Figura 6.1 mostra a biomassa de líquen cultivado em mesa agitadora orbital, logo após a colheita.

Figura 6.1 – Imagem da biomassa liquenizada, obtida em cocultivo realizado em mesa agitadora orbital, logo após a colheita.



Fonte: Própria autora.

6.2.2 Avaliação de eficiência de colheita de células e da composição da biomassa

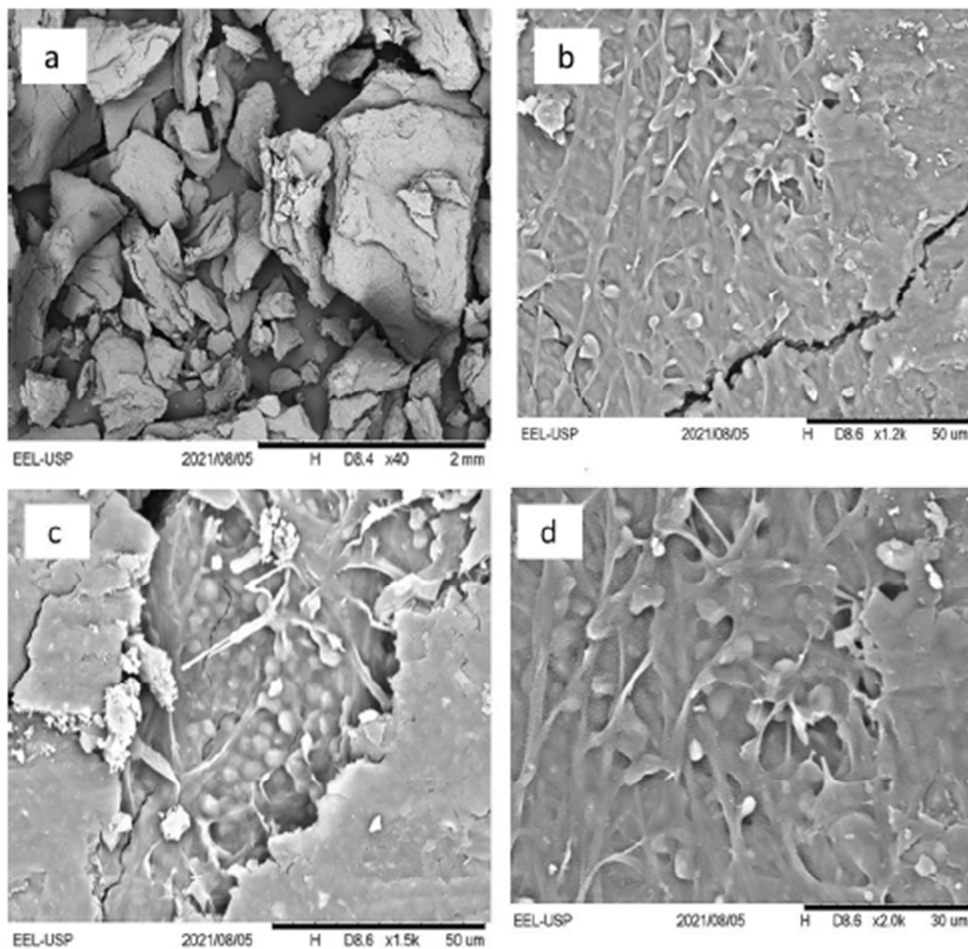
Os resultados de cocultivos obtidos por incubação em mesa agitadora orbital mantiveram-se com uma elevada eficiência de colheita de *Scenedesmus obliquus* pelo *M. circinelloides* URM 4182, alcançando 99,8%. Este resultado de eficiência de colheita de células equipara-se ao resultado anteriormente obtido em cocultivos realizados em *shaker* orbital (capítulo 5), cuja eficiência de recuperação de células alcançou 99,7%.

Quanto à contribuição em biomassa de microalgas no consórcio alga:fungo, esta resultou em uma contribuição média de 61 ± 2 % de biomassa de algas na composição do consórcio microbiano. Esses resultados revelaram uma menor contribuição da biomassa de algas na composição da biomassa de líquen, em comparação com estudos anteriores (ZORN *et al.*, 2020), contudo, houve uma compensação quanto à maior quantidade de biomassa e produtividades obtidas, conforme discutido em 6.2.1.

6.2.3 Avaliação dos líquens artificiais por microscopia eletrônica de varredura

As microfotografias na Figura 6.2 mostram a estrutura tipo líquen composta por células de *S. obliquus* e hifas de micélio formado por *M. circinelloides*, obtida após cocultivo em *shaker* orbital, que foi observada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV); nesta estrutura observaram-se várias células de microalgas aderidas às hifas fúngicas.

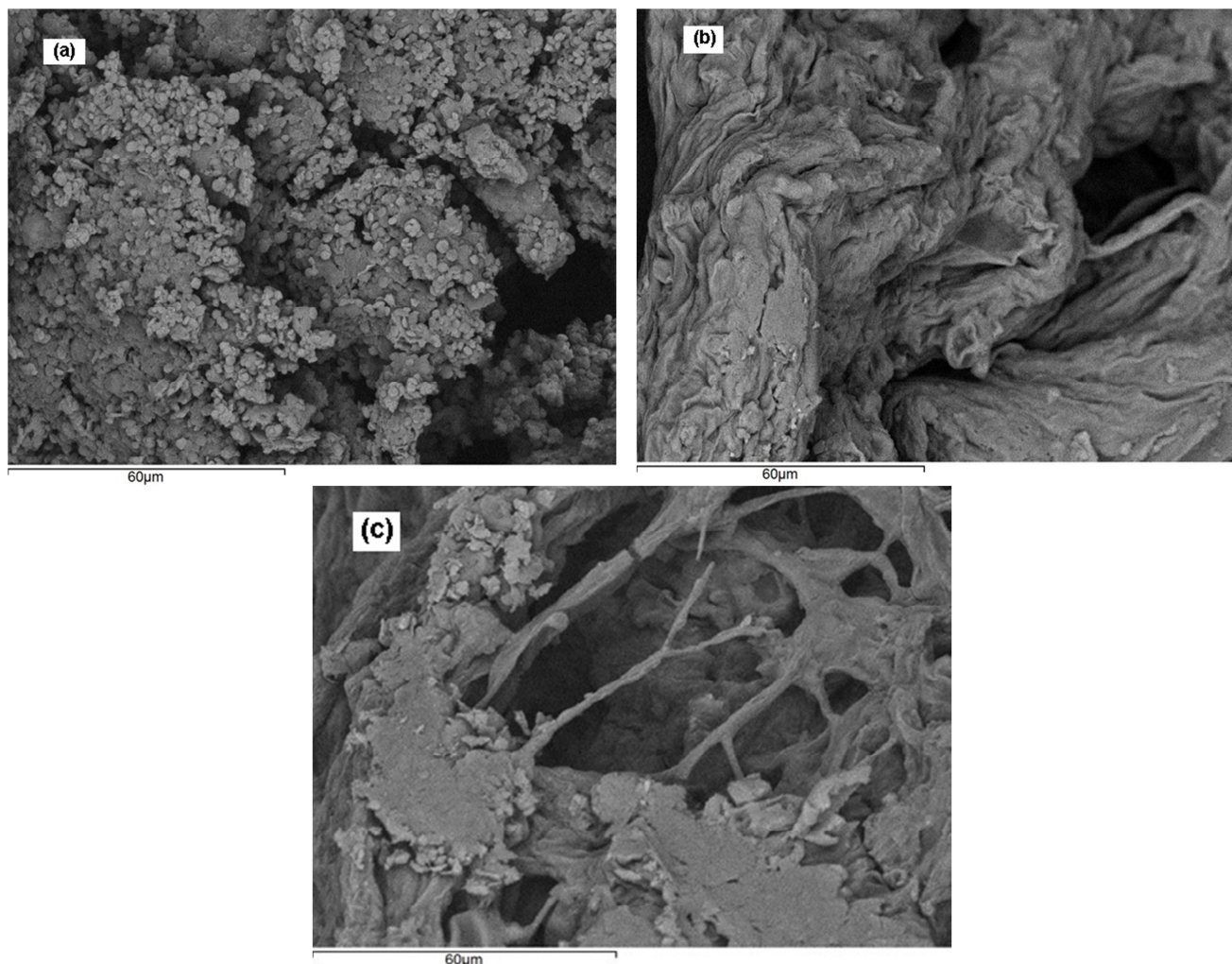
Figura 6.2 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da estrutura semelhante a líquen composta por micélio de *M. circinelloides* e células de *S. obliquus* em diferentes ampliações: (a) 40×, (b) 1200×, (c) 1500×, (d) 2000 ×. Em (a), pode-se observar a imagem de um grão de biomassa da estrutura tipo líquen. Em (b–d), a fixação de células de algas (formas de pequenas gotas de cor branca) e hifas de fungos (em formato de ramificação, com cor cinza claro, podem ser bem visualizados. Em (c), especificamente, existem aglomerados de células de algas em determinados locais onde o micélio fúngico ramificado também predomina e forma uma estrutura de ninho. Em (c,d), pode-se observar que algumas algas estão interligadas entre as hifas dos fungos filamentosos.



Fonte: Própria autora.

As microfotografias na Figura 6.3 mostram as imagens: da biomassa de microalga *S. obliquus* em cultivo isolado, da biomassa do fungo filamentososo *M. circinelloides* em cultivo isolado e da estrutura tipo líquen composta por *S. obliquus* e *M. circinelloides*, obtida após cocultivo em mesa agitadora orbital, observadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV); nesta última imagem, destacam-se as hifas e várias células de microalgas ligadas às hifas fúngicas.

Figura 6.3 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das biomassas: de alga (a), e de fungo filamentososo (b); e da estrutura tipo líquen (c), formada em cocultivo em mesa agitadora orbital, composta de micélios de *M. circinelloides* e células de *S. obliquus* aderidas sobre os micélios do fungo filamentososo. Imagens ampliadas 1500 vezes.



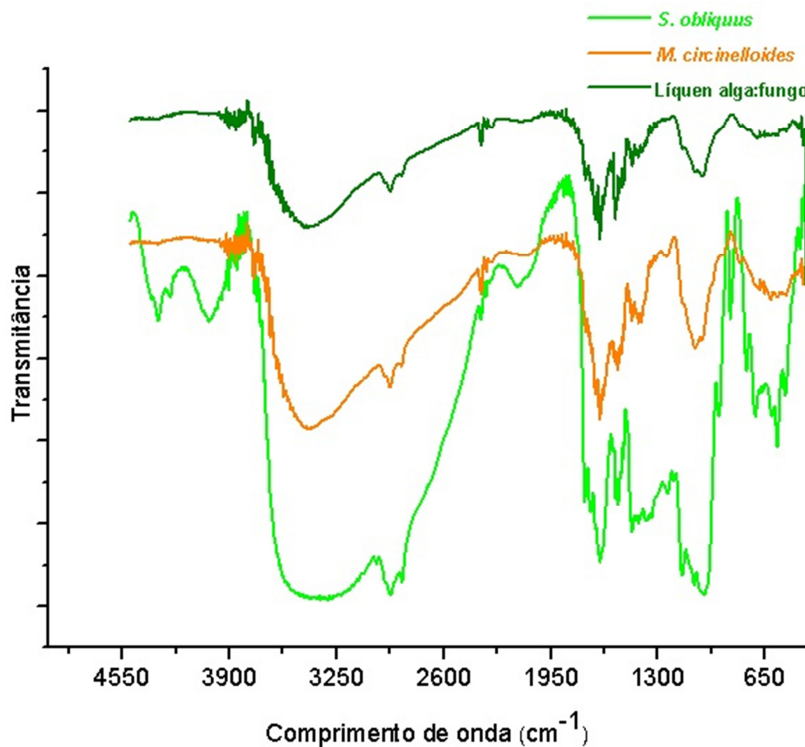
Fonte: Própria autora.

As imagens destas microfotografias demonstraram a interação física, a nível microscópico, entre hifas do micélio fúngico e células de algas, que macroscopicamente constituíram uma biomassa única.

6.2.4 Avaliação dos líquens artificiais por análise de espectroscopia na região de infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR)

A análise de espectroscopia na região de infravermelho por transformada de Fourier por refletância total atenuada (ATR-FTIR) possibilitou avaliar a contribuição das biomassas de alga e fungo filamentoso na formação da biomassa de líquen, através da identificação dos principais grupos funcionais aparentes em cada um dos três espectros: espectro oriundo da biomassa da microalga *S. obliquus*, do fungo filamentoso *M. circinelloides*, ambos em cultivos isolados, e o espectro oriundo da biomassa de líquen, obtido do cocultivo alga:fungo, de acordo com os protocolos estabelecidos neste trabalho. A Figura 6.4 ilustra os espectros de FTIR das amostras de biomassa de alga, fungo e líquen.

Figura 6.4 – Espectros de FTIR - amostras de biomassa da microalga *S. obliquus*, do fungo *M. circinelloides* e do líquen composto por ambos.



Fonte: Própria autora.

Uma leitura completa dos espectros ATR-FTIR mostrou que, para todas as amostras, uma banda forte entre 3400 e 3500 cm^{-1} , a presença de hidroxila ($-\text{OH}$), provavelmente devido à atividade residual da água nas amostras

(MOVASAGHI *et al.*, 2008). Nenhuma diferença em particular foi observada nas outras regiões das bandas amida I e amida II, entre 1480 e 1550 cm^{-1} , caracterizadas por um alongamento C=O específico da amida, nem entre 1445 e 1395 cm^{-1} , característica das vibrações de $\text{CH}_2 / \text{CH}_3$, C=O, C-N, N-H, que constituíram as principais estruturas proteicas (parte significativa das paredes celulares) e as vibrações de alongamento do C-O-C entre os números de onda de 1045 a 1030 cm^{-1} , o que pode representar alguma diferença estrutural nos polissacarídeos que constituíram a biomassa (SZEGJALMI *et al.*, 2007).

Lipídios, que podem ser identificados em amostras semelhantes pelas bandas relacionadas às vibrações de alongamento do C-H (DEAN *et al.*, 2010) (alongamento do =C-H na região de 3010 cm^{-1} , alongamento do C-H em $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ em 2855 e 2920 cm^{-1}) também foram encontrados nas três amostras. Entre 2927 e 2842 cm^{-1} , observou-se um alongamento característico de ácidos graxos com alongamento simétrico de $-\text{CH}_2$ e alongamento assimétrico de $-\text{CH}_2$ (DEAN *et al.*, 2010). Outros grupos característicos relacionados à presença de componentes lipídicos foram os grupos éster: alongamento C=O na região de 1740 cm^{-1} e alongamento C-O-C (1070-1250 cm^{-1}). As vibrações de estiramento C=O também foram características das ligações éster de ácidos graxos, encontradas em todas as amostras entre 1629 e 1657 cm^{-1} . Curiosamente, notou-se uma semelhança entre os perfis dos espectros do fungo filamentoso e do líquen formado; esta similaridade pode estar relacionada ao fato de o micélio do fungo servir como um biosuporte para a ancoragem das células das microalgas no processo de cocultivo para formação do líquen. Estes resultados estão em consonância com os espectros demonstrados por Rajendran e Hu (2016), considerando um consórcio composto pelo fungo filamentoso *Mucor* sp. e a microalga *Chlorella vulgaris* e o estudo realizado com o consórcio composto por *Mucor circinelloides* URM 4182 e a espécie *Chlorella vulgaris* BMAK 007, realizado por Zorn *et al.* (2020).

6.2.5 Aplicação da biomassa de líquens artificiais para síntese de biolubrificante e biodiesel

A biomassa oleaginosa do líquen composto pela microalga *S. obliquus* e o fungo *M. circinelloides*, cultivada em mesa agitadora orbital, foi avaliada quanto à sua adequação para as sínteses de biolubrificante e biodiesel.

Os lipídios foram extraídos da biomassa do consórcio microbiano e posteriormente efetuou-se a metilação e análise da composição em ácidos graxos por cromatografia a gás.

Os resultados da Tabela 6.2 descrevem a composição em ácidos graxos de lipídios do consórcio microbiano composto por *S. obliquus* – *M. circinelloides*.

Tabela 6.2 – Composição em ácidos graxos de lipídios do consórcio microbiano *S. obliquus* – *M. circinelloides*, de biomassa obtida de cultivo em mesa agitadora orbital.

Perfil em ácidos graxos		Consórcio microbiano
C 8:0	Caprílico	0,20 ± 0,17
C 10:0	Cáprico	0,27 ± 0,15
C 12:0	Laurico	0,65 ± 0,15
C 14:0	Mirístico	0,90 ± 0,15
C 16:0	Palmitico	29,77 ± 0,17
C 18:0	Esteárico	1,89 ± 0,15
SFA	Ácidos graxos saturados	33,69
C 16:1	Palmitoleico	4,55 ± 0,15
C 18:1	Oleico	29,69 ± 0,15
MUFA	Ácidos graxos Monosaturados	34,23
C 18:2	Linoleico	14,60 ± 0,20
C 18:3	Linolenico	17,55 ± 0,20
PUFA	Ácidos graxos Poli-insaturados	32,08

Fonte: Própria autora.

Os lipídios do consórcio microbiano foram compostos por conteúdo relevante de ácidos graxos saturados (33,69%) e monoinsaturados (34,23%), enquanto os ácidos graxos poli-insaturados corresponderam a um total de

32,08%. Considerando que o conteúdo em ácido oleico (C18:1) destacou-se como principal contribuidor dentre os ácidos graxos monoinsaturados (29,69% em média), o material lipídico apresenta potencial à geração de biolubrificantes.

A biomassa do consórcio microbiano foi preparada para a reação de transesterificação *in situ*, empregando como catalisador o heteropoliácido suportado em nióbio ($H_3PMo_{12}O_{40}/Nb_2O_5$) e uma mistura de álcoois similar ao óleo fúsel (óleo fúsel simulado), como receptor acila. A reação de transesterificação resultou em teor de ésteres de 96,8%, com baixos teores residuais de Monoetilenoglicol (MAG) e Dietilenoglicol (DAG) na amostra purificada (respectivamente, 2,30% e 0,90%). A viscosidade do produto foi de 5,1 mm²/s. Esses resultados foram comparados ao de outro óleo de origem microbiana, da microalga *Dunaliella salina* (ZORN *et al.*, 2022). A reação de transesterificação *in situ* efetuada com a biomassa de *D. salina* com o mesmo catalisador, empregando também óleo fúsel simulado, resultou em um teor de ésteres de 97,58% e 2,42% de MAG (DAG não detectado) e viscosidade de 5,0 mm²/s. Em comparação aos resultados encontrados para esta microalga, cultivada por Bredda *et al.* (2018), a qual contém uma composição em ácidos graxos com elevados teores de ácidos graxos saturados (34,27%) e monoinsaturados (46,74%) e um menor conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (18,99%), os resultados alcançados com a biomassa do consórcio microbiano são bastante promissores à aplicação como biolubrificante.

A biomassa do consórcio microbiano, contendo a composição em ácidos graxos conforme a Tabela 6.2, também foi avaliada quanto ao seu potencial como matéria-prima à produção de biodiesel, através de reação de transesterificação direta, com o catalisador heteropoliácido suportado em óxido de nióbio e somente etanol como solvente e reagente.

Conforme diversos autores, a qualidade do biodiesel pode ser determinada pela proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados. Isso se deve ao fato de que os ácidos graxos saturados são mais resistentes à degradação e à oxidação (KNOTHE, 2014; TALEBI *et al.*, 2013). A composição em ácidos graxos é influenciada pelas condições climáticas e principalmente pelo meio de cultivo, mas depende também do potencial de cada linhagem de

microrganismo (RAMOS *et al.*, 2009; RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLO-JACOB, 2012).

De acordo com a composição em ácidos graxos e seu impacto relacionado às propriedades do biodiesel, diversos autores registram que os ácidos monoinsaturados, palmitoléico (C16:1) e oleíco (C18:1) são mais favoráveis à produção de biodiesel (RAMOS *et al.*, 2009; HULATT *et al.*, 2017). Contudo, as proporções dos demais ácidos (monoinsaturados e poli-insaturados) devem ser consideradas.

A reação de transesterificação direta resultou em 98,8% em teor de ésteres etílicos, o que atende aos limites estabelecidos pela ANP, que estabelece o limite de mínimo 96,5% para o teor de ésteres (ANP, 2014). Os teores de MAG e DAG totalizaram 1,2% em massa, pouco acima dos limites estabelecidos pela ANP que são: MAG < 0,8% e DAG < 0,2% (ANP, 2014). Estes primeiros resultados comprovam o potencial da reação de transesterificação *in situ* da biomassa de líquens artificiais em ésteres etílicos e sua aplicação como biodiesel.

6.2.6 Avaliação de propriedades do biodiesel com base na composição em ácidos graxos

O consórcio microbiano apresentou um perfil em ácidos graxos com distribuição equilibrada entre ácidos graxos saturados (33,69%), monoinsaturados (34,23%) e poliinsaturados (32,08%). As propriedades dos lipídios saponificáveis e dos produtos gerados, como o biodiesel, estão diretamente relacionadas ao perfil de ácidos graxos (TALEBI *et al.*, 2013). Com base nesta composição em ácidos graxos (Tabela 6.2) as seguintes propriedades para o biodiesel foram avaliadas: número de cetano, índice de iodo, estabilidade à oxidação a 110 °C, massa específica a 20 °C e viscosidade cinemática a 40 °C.

A Tabela 6.3 sintetiza os resultados preditos para essas propriedades, com base na composição em ácidos graxos do óleo extraído da biomassa de líquens, empregando-se o software 'BiodieselAnalyser' versão 2.2 (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014).

Tabela 6.3- Propriedades para o biodiesel com base na composição em ácidos graxos do óleo extraído da biomassa de líquen *S. obliquus* – *M. circinelloides*.

Propriedades	Consórcio alga-fungo	Limites*
Número de Cetano (adimensional)	48,8	45 - 51
Índice de Iodo (g Iodo/100 g amostra)	105,7	Máx. 120
Estabilidade à oxidação a 110 °C (h)	6,3	Min. 12
Massa específica a 20°C (g/cm ³)	0,879	0,850 – 0,900
Viscosidade cinemática a 40°C (mm ² /s)	3,55	3 - 6

*Limites de acordo com o Regulamento Técnico ANP N° 3/2014, estabelecido pela Resolução ANP N° 45, de 25/08/2014. Fonte: Própria autora.

De acordo com os dados da Tabela 6.3, o biodiesel proveniente da biomassa de líquen atendeu aos limites do Regulamento Técnico ANP N° 3/2014, estabelecido pela Resolução ANP N° 45, de 25/08/2014, para as propriedades: número de cetano, índice de iodo, massa específica e viscosidade cinemática.

Números de cetano de acordo com essas especificações garantem uma boa performance de início a frio e um funcionamento suave do motor (RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLO-JACOB, 2012; TALEBI *et al.*, 2013). Talebi *et al.* (2013) e Hawrot-Paw *et al.* (2021) pesquisaram o número de cetano para o biodiesel microbiano de diversas espécies e encontraram valores variando entre 43,77 para *Dunaliella sp* até 62,33 para *Amphora sp*.

O índice de iodo é outro parâmetro chave para o estabelecimento da qualidade dos biocombustíveis, visto que limita os ácidos graxos insaturados, que podem gerar a polimerização dos triacilgliceróis, levando à formação de depósitos ou deterioração do lubrificante no motor (RAMOS *et al.*, 2009; HAWROT-PAW *et al.*, 2021). O valor encontrado para o índice de iodo do biodiesel sintetizado da biomassa de líquen microbiano atendeu aos limites especificados pela ANP (ANP, 2014).

Quanto às propriedades massa específica e viscosidade cinemática, ambas atenderam aos parâmetros especificados pela ANP (ANP, 2014). Viscosidade e massa específica mais elevadas em produtos de biodiesel geralmente estão associadas a maiores graus de saturação (TALEBI *et al.*, 2013; HAWROT-PAW *et*

al., 2021). Os resultados encontrados estão coerentes com a composição em ácidos graxos (Tabela 6.2) que apresentou um equilíbrio entre ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

Observou-se que a propriedade estabilidade à oxidação, cujo resultado foi 6,3 h, não atendeu ao limite especificado pela ANP, de mínimo 12 h (ANP, 2014). Este resultado pode estar relacionado aos ácidos graxos poliinsaturados presentes na composição do óleo microbiano. De acordo com diferentes autores (RAMOS *et al.*, 2009; TALEBI *et al.*, 2013; HAWROT-PAW *et al.*, 2021), os ácidos graxos poliinsaturados influenciam na diminuição da estabilidade oxidativa. Este parâmetro pode ser corrigido pela adição de substâncias antioxidantes, tais como o alfa-tocoferol, que prolongam a estabilidade à oxidação (RAMOS *et al.*, 2009). Outra alternativa para prolongar a estabilidade à oxidação consiste em cuidar das condições ambientais de armazenamento, tais como temperatura e umidade no local.

As diferentes propriedades do biodiesel devem ser analisadas de forma conjunta, com o objetivo de uma avaliação final mais assertiva de sua qualidade do produto (ANP, 2014).

Esses dados sugerem uma integração potencial da agroindústria da cana-de-açúcar em biorrefinarias sustentáveis baseadas em microorganismos (algas e fungos), o que pode ser capaz de promover novas alternativas de destaque para bioprocessos integrados e eficientes.

6.3 Conclusões

Em um contexto de biorrefinaria, faz-se necessária a inovação biotecnológica e o total aproveitamento de recursos.

Os cocultivos efetuados no equipamento mesa agitadora orbital, permitiram a avaliação de consórcios microbianos em diferentes volumes de meio de cultivo, quantidades de células e de micélios. A eficiência de recuperação de células manteve-se em 99,7%, com 61,0% de biomassa de algas em média na composição dos líquens e o conteúdo lipídico na biomassa do consórcio foi de 32%. O uso deste equipamento possibilitou obter o dobro de biomassa de biomassa de líquens *Scenedesmus obliquus* – *Mucor circinelloides*, em comparação ao cocultivos efetuados em *shaker* orbital.

As interações físicas entre microrganismos que formam uma estrutura semelhante a líquen (líquen artificial) foram confirmadas microscopicamente, por microscopia eletrônica de varredura, onde diferentes imagens comprovaram a ancoragem das células da microalga sobre as hifas dos fungos filamentosos (em micélios e hifas), formando uma única estrutura liquenizada.

Foram realizadas análises de espectroscopia na região de infravermelho por transformada de Fourier por refletância total atenuada (ATR-FTIR) nas biomassas de alga, fungo e líquen, que distinguiram os principais grupos funcionais presentes nas respectivas biomassas.

Com a biomassa do consórcio alga:fungo produziu-se biolubrificante e biodiesel, em reações de transesterificação *in situ*. em ambas as reações o catalisador químico heteropoliácido suportado por óxido de nióbio foi avaliado com excelentes resultados em teores de ésteres: 96,8% como biolubrificante e 98,8% como biodiesel (ésteres etílicos) e algumas propriedades preditas para o biodiesel foram estimadas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As biorrefinarias, bem como outras instalações geradoras de bioprodutos e bioenergia, devem constantemente inovar-se e aprimorar-se, pois são diversas e cada vez mais relevantes, as questões relacionadas à geração de energia limpa e processos completamente autossustentáveis.

Este trabalho uniu os potenciais de duas linhagens de microalgas e uma linhagem de fungo filamentosos, explorando diferentes estratégias de cocultivo, compondo consórcios microbianos (liquens artificiais).

Com a espécie *C. vulgaris* e o fungo filamentosos, foi demonstrado que é possível a recuperação de células de algas do meio de cultivo, por uma técnica isenta da adição de produtos químicos, bem como, a obtenção de uma biomassa composta, rica em lipídios. A estratégia selecionada, dentre outras que foram avaliadas, forneceu liquens artificiais compostos por 79% de biomassa de algas, com uma eficiência de recuperação de células de 99,5%. Esta estratégia foi reaplicada com sucesso na formação de liquens artificiais entre as espécies *S. obliquus* e *M. circinelloides*. Para os liquens artificiais formados nesta segunda etapa, os resultados foram: 99,7% de eficiência de recuperação de células, acumulação lipídica na biomassa entre 32 e 38% e biomassa de liquens composta por 61 a 80% de biomassa de algas, dependendo do equipamento utilizado.

Aproveitando coprodutos da agroindústria nacional, avaliou-se o efeito do melaço de cana-de-açúcar (MC) aplicado ao cultivo da espécie *S. obliquus*, cujo resultado foi dobrar a produtividade em biomassa e aumentar em 1,5 vezes o acúmulo de lipídios, em comparação com cultivos realizados sem suplementação de MC.

Análises de caracterização da biomassa de liquens (MEV, ATR-FTIR) comprovaram a interação física entre as espécies, ao nível microscópico. A biomassa oleaginosa foi aplicada para as sínteses de biolubrificante e biodiesel; em específico para a síntese de biolubrificante, foi utilizado um outro coproduto agroindustrial, o óleo fúsel simulado. Teores de ésteres de 96,8% para biolubrificante e 98,8% para biodiesel, foram obtidos, pelas reações de transesterificação *in situ* realizadas.

Visto isso, com o presente trabalho abrem-se novas alternativas para a utilização conjunta de diferentes espécies microbianas em biorrefinarias, tanto para a colheita de células, como para a obtenção de biomassa oleaginosa para diferentes aplicações comerciais.

Como sugestão para trabalhos futuros recomenda-se:

Avaliar a formação de consórcios microbianos entre outras espécies de microalgas e de fungos filamentosos.

Reaplicar as estratégias apresentadas neste trabalho para outras finalidades, tais como, biorremediação.

Avaliar o efeito de outros coprodutos e/ou fontes de carbono e nutrientes, adicionados ao cultivo fúngico e/ou ao cultivo microalgal, na formação de líquens artificiais.

Sintetizar e avaliar outros metabólitos de interesse industrial, tais como: proteínas, carotenoides e carboidratos, a partir do cultivo de líquens artificiais.

REFERÊNCIAS

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução ANP N° 45 DE 25/08/2014. **DOU 26.8.2014**, 2014.

BOLINA, I.C.A.; GOMES, R.A.B.; MENDES, A.A. Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: current scenario and future perspectives. **Bioenergy Research**, v. 14, p. 1039-1057, 2021.

BREDDA, E.H.; DA RÓS, P.; PEDRO, G.A.; DE CASTRO, H.F.; SILVA, M.B. *Nannochloropsis gaditana* and *Dunaliella salina* as feedstock for biodiesel production: lipid production and biofuel quality. **Journal of advances in biology & biotechnology**, v. 20, p. 1-10, 2018.

CHEN, Y.; NIE, X.; YE, J.; WANG, Y.; CHEN, J.; XU, J. Biodiesel from Microorganisms: A Review. **Energy Technology**, v. 9, p. 1-12, 2021.

DA SILVA, A.P.T.; BREDDA, E.H.; DE CASTRO, H.F.; DA RÓS, P.C.M. Enzymatic catalysis: an environmentally friendly method to enhance the transesterification of microalgal oil with fusel oil for production of fatty acid esters with potential application as biolubricants. **Fuel**, v. 273, p. 1-7, 2020.

DE SOUZA, E.C.; BELINATO, G.; OTERO, R.L.S.; SIMÊNCIO, E.C.A.; AUGUSTINHO, S.C.M.; CAPELUPI, W.; CONCONI, C.; CANALE, L.C.F.; TOTTEN, G.E. Thermal oxidative stability of vegetable oils as metal heat treatment quenchant. **Journal of ASTM International**, v. 9, p. 1-30, 2012.

DEAN, A.P.; SIGEE, D.C.; ESTRADA, B.; PITTMAN, J.K. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4499-4507, 2010.

HAWROT-PAW, M.; RATOMSKI, P.; KONIUSZY, A.; GOLIMOWSKI, W.; TELESZKO, M.; GRYGIER, A. Fatty acid profile of microalgal oils as a criterion for selection of the best feedstock for biodiesel production. **Energies**, v. 14, p. 1-14, 2021.

HULATT, C. J.; WIJFFELS, R.H.; BOLLA, S.; KIRON V. Production of fatty acids and protein by nannochloropsis in flat-plate photobioreactors. **PLOS ONE**, v. 12, p. 1-17, 2017.

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

KNOTHE, G. A comprehensive evaluation of the cetane numbers of fatty acid methyl esters. **Fuel**, v. 119, p. 6-13, 2014.

MOBARAK, H.; MOHAMAD, E.N.; MASJUKI, H.; KALAM, A.; AL MAHMUD, K.; HABIBULLAH, M.; ASHRAFUL, A. The prospects of biolubricants as alternatives in automotive applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 34-43, 2014.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN U. I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p. 134-179, 2008.

PATEL, A.; MU, L.; SHI, Y.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P.; MATSAKAS, L. Single-cell oils from oleaginous microorganisms as green bio-lubricants: studies on their tribological performance. **Energies**, v. 14, p. 1-17, 2021.

QIAO, S.; SHI, Y.; WANG, X.; LIN, Z.; JIANG, Y. Synthesis of biolubricant trimethylolpropane trioleate and its lubricant base oil properties. **Energy Fuels**, v. 31, p. 7185-7190, 2017.

RAJENDRAN, A.; HU, B. Mycoalgae biofilm: Development of a novel platform technology using algae and fungal cultures. **Biotechnology Biofuels**, v. 9, p. 1-13, 2016.

RAMÍREZ-VERDUZCO, L.F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.E.; JARAMILLO-JACOB, A.D.R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**, v. 91, p. 102-111, 2012.

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

REIS, C.E.R.; BENTO, H.B.S.; CARVALHO, A.K.F.; RAJENDRAN, A.; HU, B.; DE CASTRO, H.F. Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, p. 555-570, 2019.

SIBI, G., SHETTY, V., MOKASHI, K. Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels - a review. **Journal of Energy Institute**, v. 89, p. 330-334, 2016.

SZEGHALMI, A.; KAMINSKYJ, S.; GOUGH, K.M. A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1779-1789, 2007.

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

TALEBI, A.F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. BiodieselAnalyzer: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, v. 2, p. 55-57, 2014.

VANHERCKE, T.; EL TAHCHY, A.; SHRESTHA, P.; ZHOU, X. R.; SINGH, S. P.; PETRIE, J. R. Synergistic effect of WR11 and DGAT1 coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants. **FEBS Letters**, v. 587, p. 364-369, 2013.

WREDE, D.; TAHA, M.; MIRANDA, A. F.; KADALI, K.; STEVENSON, T.; BALL, A. S.; MOURADOV, A. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. **PloS One**, v. 9, p. 1-22, 2014.

ZORN, S.M.F.E.; REIS, C.E.R.; SILVA, M.B.; HU, B.; DE CASTRO, H.F. Consortium growth of filamentous fungi and microalgae: evaluation of different cultivation strategies to optimize cell harvesting and lipid accumulation. **Energies**, v. 13, p. 1-15, 2020.

ZORN S.M.F.E.; DA SILVA, A.P.T.; BREDDA, E.H.; BENTO, H.B.S.; PEDRO, G.A.; CARVALHO, A.K.F.; SILVA, M.B.; DA RÓS, P.C.M. In situ transesterification of microbial biomass for biolubricant production catalyzed by heteropolyacid supported on niobium. **Energies**, v. 15, p. 1-12, 2022.