

ESTUDO DO CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO DE TRÊS CEPAS DE MICROALGAS VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

V. F. de ALMEIDA, L. F. RIOS, R. M. FILHO, M. R. W. MACIEL

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: van.ferreira18@gmail.com

RESUMO – Neste trabalho, estudou-se o crescimento de três diferentes cepas de microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus* sp e *Desmodesmus brasiliensis*, visando a produção de biodiesel. As microalgas foram crescidas em cultivo autotrófico, no meio de cultivo BG-11. As taxas de crescimento destas microalgas foram calculadas e comparadas entre estas três cepas. Quanto maior for a taxa de crescimento da microalga, mais interessante é seu uso na produção de biodiesel, e mais viável se torna o processo de produção deste biocombustível. As microalgas que apresentaram maiores taxas de crescimento e menores tempo de duplicação foram *Desmodesmus* sp e *Chlorella vulgaris*.

1. INTRODUÇÃO

Com a diminuição das reservas de petróleo e a necessidade de encontrar fontes de energias competitivas e ambientalmente amigáveis, as energias renováveis vêm sendo altamente estudadas (Almeida *et al.*, 2015). Dentre elas o biodiesel, um combustível biodegradável e não tóxico. Atualmente, há inúmeras opções de matéria prima para a produção de biodiesel. A microalga aparece como uma delas, e é bastante promissora, devido a sua alta atividade fotossintética, taxas de crescimento exponencial e alta produtividade de biomassa (Rios *et al.*, 2015). O biodiesel produzido a partir de microalgas é classificado biocombustível de terceira geração, apresentando a vantagem de não competir com matérias primas que poderiam ser utilizadas para a alimentação (Galafassi *et al.*, 2012). As microalgas acumulam lipídios em sua composição, que são extraídos e posteriormente esterificados, produzindo biodiesel (Francisco *et al.*, 2014). Recentemente, a microalga *Chlorella vulgaris* vem sendo altamente estudada para a produção de biodiesel (Al-lwayzy *et al.*, 2014; Farooq *et al.*, 2015; Josephine *et al.*, 2015), assim como a microalga *Desmodesmus* sp. (Rios *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2015). Porém, não se encontram dados na literatura sobre o cultivo da microalga *Desmodesmus brasiliensis* para a produção de biodiesel.

Neste trabalho, analisou-se o crescimento autotrófico destas três cepas de microalga: *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus* sp e *Desmodesmus brasiliensis*, comparando suas taxas de crescimento e visando a posterior produção de biodiesel. Um dos objetivos deste trabalho foi também avaliar o desempenho do crescimento da espécie *Desmodesmus brasiliensis* e comparar com as demais cepas de microalga, que já são conhecidas como sendo adequadas para a produção de biodiesel.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microalgas

As microalgas *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus brasiliensis* foram doadas pelo grupo de Ecologia Aquática do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) da Universidade Federal de São Carlos. Já a microalga *Desmodesmus* sp foi doada pelo Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA) do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/Paraná.

2.2. Meio de Cultivo

As microalgas cresceram em um sistema de cultivo autotrófico, isto é, utilizando apenas a luz como fonte de energia para a fixação do CO_2 e realizando fotossínteses para seu crescimento. Foi utilizado um sistema fechado para seu crescimento, ou seja, isoladas do meio externo e em recipientes transparentes. Utilizou-se o meio de cultivo líquido BG-11 (Rippka *et al.*, 1979), preparado pela misturando todos os sais, metais necessários e ajustando o pH para um valor igual a 7,5. O meio apresenta a seguinte composição em mg/L: NaNO_3 (1500 mg/L), K_2HPO_4 (40 mg/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (30 mg/L), Na_2CO_3 (19 mg/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8 mg/L), $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (7 mg/L), amônio, citrato férrico (6 mg/L), H_3BO_3 (3 mg/L), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 mg/L), $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.7 mg/L), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.4 mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 mg/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 mg/L) e $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.05 mg/L). Erlenmeyers, e demais elementos utilizados na preparação do meio de cultivo, e o próprio meio foram esterilizados em uma autoclave vertical (marca Phoenix Luferco, modelo AV-50 Plus) a uma temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

2.3. Reprodução das Microalgas

Cada cepa de microalga foi reproduzida no meio de cultivo BG-11 em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade e em duplicata, totalizando seis experimentos. Para garantir uma fonte de luz constante ($72 \mu\text{Em}^{-2}$) estas foram mantidas em uma câmara com um banco de luzes com luz por 24 horas.

2.4. Crescimento das Microalgas

O crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus* sp e *Desmodesmus brasiliensis* foi monitorado diariamente durante 14 dias através de um espectofotômetro UV/visível (marca Agilent Technologies, modelo Cary 60). As leituras foram feitas em comprimento de 682, 684 e 680 nm, para as espécies *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus* sp e *Desmodesmus brasiliensis*, respectivamente. Para determinar a densidade celular em mg/mL, uma curva de calibração foi construída.

2.5. Recuperação da Biomassa

Quando as microalgas atingiram 14 dias de crescimento, foram retiradas do meio de cultivo com a finalidade de evitar morte celular. Para retirar recuperar a biomassa proveniente das microalgas, foi utilizada uma centrífuga (marca eppendorf, modelo 5810R). O processo de centrifugação foi realizado a temperatura ambiente, a uma velocidade de rotação de 5000

rpm, por 30 minutos. Após a centrifugação, obtêm-se duas fases: a fase superior, composta pelo meio de cultivo, e a fase inferior que contém a biomassa. Em seguida, a biomassa foi separada e secada em uma estufa a temperatura de 104 °C, durante 24h, até a obtenção de um peso constante.

2.6. Determinação da Taxa de Crescimento das Microalgas

A taxa de crescimento das microalgas foi determinada pela linearização da curva de crescimento, plotando esta curva em um gráfico semilogarítmico. A taxa de crescimento foi calculada através da Equação 1.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \quad (1)$$

Na qual X é a concentração da célula (mg/mL), t é o tempo e μ é a taxa de crescimento específica. A definição de μ é dada na Equação 2 a seguir:

$$\mu = \frac{\ln \frac{X_t}{X_{t_0}}}{t - t_0} \quad (2)$$

Do gráfico semilogarítmico, pode-se obter a taxa de crescimento das microalgas pela inclinação da curva na fase de crescimento exponencial, como mostrado na Equação 3.

$$X = X_0 + \mu_t \quad (3)$$

2.7. Tempo de Duplicação das Microalgas

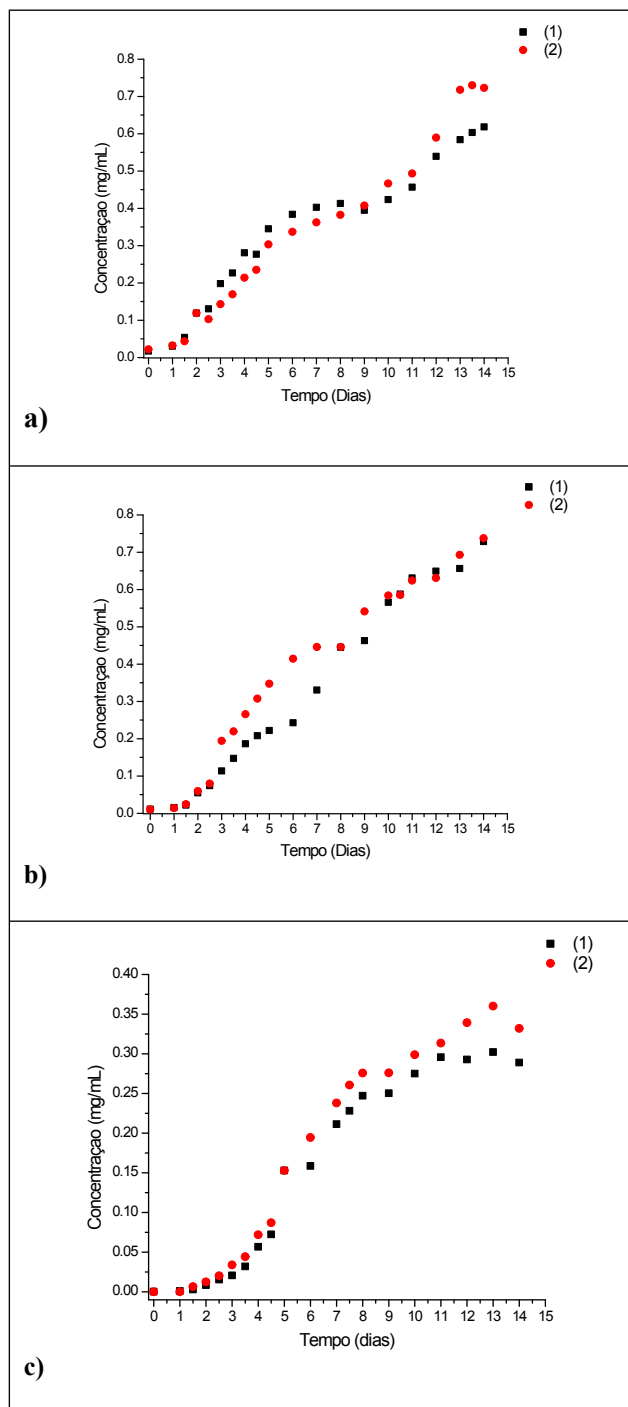
O tempo de duplicação das microalgas (t_d) é o tempo gasto para a divisão de uma célula da microalga. O cálculo de t_d é apresentado na Equação 4:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 abaixo apresenta as curvas de crescimento das microalgas. Em cada um dos gráficos **a**, **b** e **c** se encontram duas curvas, sendo que cada uma representa o crescimento da mesma cepa, crescidas em duplicata (1 e 2) em Erlenmeyer diferentes. Todas as curvas apresentam a forma característica de uma “curva S”, composta por quatro fases bem definidas: fase de latência, na qual as células se adaptam ao meio; uma fase de crescimento exponencial, na qual as células se multiplicam em sua taxa máxima; uma fase estacionária, na qual as células crescem em uma taxa igual a sua taxa de morte; e a fase de morte, na qual a taxa de crescimento de células decresce (não mostrado na Figura 1).

Figura 1 – Curva de crescimento das microalgas: **a)** *Chlorella vulgaris*, **b)** *Desmodesmus* sp e **c)** *Desmodesmus brasiliensis*.



As velocidades máximas de crescimento se encontram na fase exponencial. Para a *Desmodesmus* sp. e *Chorella* vulgaris estas se encontram entre os dias 2 a 5 do cultivo. Já para a *Desmodesmus* brasilienses entre os dias 4 e 7 de cultivo. Comparando a fase de crescimento exponencial, é possível observar que as microalgas das espécies *Chlorella* vulgaris e *Desmodesmus* sp. cresceram mais rápido que a microalga *Desmodesmus* brasiliensis. Para exemplificar, pode-se ver que no tempo de crescimento igual a 5 as espécies com taxa de crescimento mais rápida já haviam atingido a concentração que variava de 0,20 a 0,35 mg/mL, enquanto a microalga *Desmodesmus* brasiliensis só tinha atingido uma concentração de 0,15 mg/mL. No final do cultivo, as microalgas *Chlorella* vulgaris e

Desmodesmus sp. atingiram uma concentração máxima entre 0,60 a 0,75 mg/mL, enquanto a microalga *Desmodesmus* brasilienses chegou apenas em aproximadamente 0,30 mg/mL. Com isto, pode-se afirmar que as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus* sp atingiram maiores crescimentos celulares, quando cultivadas no meio BG-11. O valor da concentração de biomassa dessas algas foi aproximadamente o dobro em concentração do que a cepa *Desmodesmus* brasilienses. A seguir, na Tabela 1 são mostradas as taxas de crescimento máximas e o tempo de duplicação das três cepas de microalgas.

Tabela 1 – Taxa de crescimento máximo e tempo de duplicação das microalgas.

| Dados | Cultivo | <i>Chlorella vulgaris</i> | <i>Desmodesmus</i> sp | <i>Desmodesmus</i> brasiliensis |
|-----------------------------------|---------|---------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| μ_{\max} (dia ⁻¹) | 1 | 0,076 | 0,089 | 0,061 |
| | 2 | 0,103 | 0,113 | 0,078 |
| | Média | 0,089 | 0,101 | 0,070 |
| t_d (h) | 1 | 219,76 | 187,13 | 272,71 |
| | 2 | 161,51 | 147,22 | 213,28 |
| | Média | 190,63 | 167,17 | 242,30 |

As cepas de microalgas foram crescidas em duplicata no mesmo meio de cultivo (BG-11), sendo cada cepa de uma mesma espécie identificada pelos números “1” e “2”. A partir da Tabela 1, pode-se observar que todas as cepas de microalgas numeradas como “1” obtiveram menores taxa de crescimento e maiores tempo de duplicação, comparando-se com microalgas da mesma espécie numeradas como “2”. Calculando-se a média dos valores obtidos para uma mesma espécie, a microalga *Desmodesmus* brasilienses apresentou taxas de crescimento e tempo de duplicação menos favoráveis dentre as três cepas. Já a microalga *Desmodesmus* sp. apresentou os valores mais favoráveis de taxas de crescimento e tempo de duplicação, seguida da microalga *Chlorella vulgaris*.

5. CONCLUSÃO

Na média, as microalgas com maior taxa de crescimento e menor tempo de divisão são as cepas de *Desmodesmus* sp. e *Chlorella vulgaris*, sendo que a microalga *Desmodesmus* sp., mostrou melhor crescimento no meio BG-11. A microalga *Desmodesmus* brasiliensis, obteve a menor taxa de crescimento e o maior tempo de divisão celular, isto quer dizer que esta cepa não tem um bom desempenho no meio BG-11. Com base nestes resultados obtidos, foi possível concluir que as espécies de microalga mais adequadas no crescimento em meio de cultivo BG-11 visando a produção de biodiesel são a *Desmodesmus* sp. e *Chlorella vulgaris*. Contudo, também se deve levar em consideração a porcentagem de lipídios contidos nas microalgas, visto que o lipídio é a matéria prima deste biocombustível. Portanto, a microalga *Desmodesmus* brasiliensis ainda não deve ser descartada para a sua utilização na produção de biodiesel. Além disso, também seria possível fazer o estudo do crescimento de esta cepa em meio mixotrófico, isto é, com fonte de luz e de carbono, para analisar se suas taxas de crescimento e tempo de duplicação apresentariam melhores resultados.

4. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo número 2014/10064-9.

5. REFERÊNCIAS

AL-LWAYZY, S. H.; YUSAF, T.; AL-JUBOORI, R. A. Biofuels from the fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* (FWM-CV) for diesel engines. *Energies*, v. 7, p. 1829-1851, 2014.

ALMEIDA, V. F. de.; GARCÍA-MORENO, P. J.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Biodiesel production from mixtures of waste fish oil, palm oil and waste frying oil: Optimization of fuel properties. *Fuel Processing Technology*, v. 133, p. 152-160, 2015.

FAROOQ, W.; MOON, M.; RYU, B. G.; SUH, W. I.; SHRIVASTAV, A.; PARK, M. S.; MISHRA, S. K.; YANG, J. W. Effect of harvesting methods on the reusability of water for cultivation of *Chlorella vulgaris*, its lipid productivity and biodiesel quality. *Algal Research*, v. 8, p. 1-7, 2015.

FRANCISCO, É. C.; FRANCO, T. T.; MARONEZE, M. M.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Produção de biodiesel de terceira geração a partir de microalgas. *Ciência Rural*, v. 45, p. 349-355, 2015.

GALAFASSI, S.; CUCCHETTI, D.; PIZZA, F.; FRANZOSI, G.; BIANCHI, D.; COMPAGNO, C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource technology*, v. 111, p. 398-403, 2012.

JI, F.; ZHOU, Y.; PANG, A.; NING, L.; RODGERS, K.; LIU, Y.; DONG, R. Fed-batch cultivation of *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater for improved nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource technology*, v. 184, p. 116-122, 2015.

JOSEPHINE, A.; NIVEDITHA, C.; RADHIKA, A.; SHALI, A. B.; KUMAR, T. S.; DHARANI, G.; KIRUBAGARAN, R. Analytical evaluation of different carbon sources and growth stimulators on the biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris*—Implications for biofuels. *Biomass and Bioenergy*, v. 75, p. 170-179, 2015.

RIOS, L. F.; KLEIN, B. C.; LUZ, L. F.JR.; MACIEL, M. R. W.; FILHO, R. M. Influence of Culture Medium on *Desmodesmus* sp. Growth and Lipid Accumulation for Biodiesel. *Production Chemical Engineering Transactions*, v. 43, 2015.

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