

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA MICROALGA *Nannochloropsis gaditana* E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO OBTIDO

G. C. SILVA¹, A. J. F. SANTOS¹, E. H. BREDDA¹, P. C. M. DA RÓS¹

¹ Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: gabriel.cs@alunos.eel.usp.br

RESUMO – Visando otimizar as condições de cultivo da linhagem *Nannochloropsis gaditana* foi proposto um planejamento fatorial 2^2 , definindo como variáveis independentes a concentração (mg L^{-1}) de NaNO_3 (X_1) e concentração (g L^{-1}) de H_3CCOONa (X_2) no meio de cultivo. Como variável dependente foi considerada a produtividade celular ($\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) obtida ao final da etapa de cultivo (7 dias). As duas variáveis estudadas, inclusive a interação entre elas revelou forte influência nos valores de produtividade celular. As condições de cultivo que favorecem a obtenção de elevados valores de produtividade celular ($> 170 \text{ mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) encontram-se nos níveis alto (+1) tanto de NaNO_3 (225 mg L^{-1}) quanto de H_3CCOONa (6 g L^{-1}). A extração lipídica foi realizada para a biomassa cultivada nas condições ótimas do planejamento, fornecendo uma concentração de 185 mg L^{-1} de lipídeos. A caracterização do óleo revelou um índice de acidez de $36,62 \text{ mgKOH/g}$, índice de iodo de $77,89 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$ de óleo e o estudo reológico forneceu uma viscosidade de $58,40 \text{ cp}$.

1. INTRODUÇÃO

A demanda global por energia tem aumentado em grande escala devido ao rápido crescimento populacional e aumento da industrialização, comprometendo o uso de combustíveis fósseis. Prevê-se que nos próximos 20 anos, o consumo energético ainda aumente em 60%. Por este motivo pesquisas recentes focam em encontrar alternativas de energia limpa e renovável para atender a demanda global (Kiran *et al.*, 2014).

Com base neste contexto, surge o biodiesel de terceira geração, o qual é obtido a partir de óleos microbianos como fonte de matéria-prima lipídica na reação. Essa fonte de energia é vantajosa em relação à produção de biodiesel por oleaginosas tradicionais, como soja, canola e girassol por não competir com a cadeia alimentícia, além de resultar em menor ciclo de vida, cultivo independente da condição climática e não necessita de grandes áreas para cultivo (Yuzbasheva *et al.*, 2014). Além disso, a utilização desta nova fonte energética em todos os campos de aplicação aumentaria o uso de energia limpa e ajudaria a combater os problemas associados ao uso de combustíveis fósseis como o aquecimento global e poluição ambiental. Dentre os microrganismos oleaginosos, as microalgas se destacam, pois podem acumular até 75% em relação ao seu peso seco (Mubarak *et al.*, 2015).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo otimizar as condições de cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana* e caracterizar o óleo obtido visando sua aplicação na síntese de biodiesel de terceira geração.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microalga e condições de cultivo

Foi utilizada a linhagem *Nannochloropsis gaditana*, uma microalga marinha, gentilmente fornecida pelo Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Geográfico da Universidade de São Paulo – USP.

2.2. Otimização das condições de cultivo da linhagem

Visando determinar as melhores condições para o cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana* foi proposto um planejamento fatorial completo 2^2 , com três pontos centrais, definindo como variáveis independentes a concentração de NaNO_3 (X_1) e a concentração de H_3CCOONa (X_2). A produtividade de biomassa celular ($\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) obtida ao final da etapa de cultivo (sete dias) foi considerada como variável resposta. Os ensaios foram conduzidos em fotobiorreatores tipo tanque (15 cm de largura e 33 cm de altura), com capacidade total de 5 L, contendo 4 L de meio de cultivo (Guillard f/2 modificado de acordo com as condições do planejamento). Os fotobiorreatores foram borbulhados com ar estéril a 2,0 vvm, correspondendo a uma taxa de aeração de 4 L min^{-1} , mantidos a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sob intensidade de luz de 150klux. Ao final de cada cultivo, a biomassa foi recuperada por floculação, empregando uma solução de FeCl_3 ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$). A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se os programas: STATISTICA (versão 8.0) e DESIGN-EXPERT (versão 6.0). A Tabela 1 mostra os níveis empregados para cada variável independente estudada de acordo com a matriz proposta pelo planejamento.

Tabela 1 – Planejamento de experimentos fatorial completo 2^2 para o cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana*.

Variáveis		Níveis		
Real	Codificadas	-1	0	+1
Nitrogênio (NaNO_3) (mg L^{-1})	X_1	75	150	225
Carbono (CH_3COONa) (g L^{-1})	X_2	2	4	6

2.3. Extração de lipídeos

Nas condições ótimas estabelecidas pelo planejamento fatorial, foi realizada a extração dos lipídeos utilizando-se a metodologia modificada de Folch (1957), empregando-se uma mistura de solventes (clorofórmio e metanol) à biomassa. A quantificação da massa total dos lipídeos foi determinada por análise gravimétrica (Da Rós *et al.*, 2013).

2.4. Caracterização do óleo

Índice de acidez (IA) e teor de ácidos graxos livres (%AGL): O método AOCS (American Oil Chemist's Society, 2004) foi utilizado para a determinação do índice de acidez (IA) e teor de ácidos graxos livres totais (%AGL), que foi expressa em termos de ácido oleico livre (%).

Índice de iodo: Para o teste de iodo, utilizou-se a metodologia de Hubl de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Pesou-se 0,25 g da amostra e adicionou-se 10 ml de clorofórmio e 20 ml de uma mistura (1:1) de solução alcoólica de iodo 5% m/v e solução alcoólica de cloreto de mercúrio 6% m/v. O excesso de I₂ foi titulado com solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ empregando solução de amido (1,0%) como indicador. O índice de iodo foi calculado de acordo com a equação 1.

$$\text{Índice de iodo} \left(\frac{gI_2}{g} \right) = \frac{(V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) * C_{\text{tio}} * MM_{I_2} * 0,1}{2 * m_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Influências das concentrações de nitrogênio e carbono no cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana*

Com a finalidade de estabelecer as melhores condições de cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana*, foi proposto um planejamento fatorial 2², definindo como variáveis independentes as concentrações de nitrogênio (X₁) e carbono orgânico (X₂), considerando a produtividade celular de biomassa (mg L⁻¹ dia⁻¹) como variável resposta. A matriz experimental juntamente com os resultados obtidos é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial 2² utilizado para otimizar o cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana*.

Ensaio	Variável				Produtividade de biomassa (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)
	Codificada		Real		
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	
1	-1	-1	75	2	88,26
2	-1	1	75	6	97,01
3	1	-1	225	2	111,03
4	1	1	225	6	188,93
5	0	0	150	4	144,21
6	0	0	150	4	146,95
7	0	0	150	4	147,62

X₁- Concentração de NaNO₃ (mg L⁻¹)

X₂- Concentrações de H₃CCOONa (g L⁻¹)

Os resultados apresentados mostram que os valores de produtividade celular obtidos ao final de sete dias de cultivo variaram entre 88,26 a 188,93 mg L⁻¹ dia⁻¹. Notou-se que a disponibilidade de uma maior concentração de carbono e de nitrogênio (ensaio 4) proporcionaram uma maior produtividade, de 188,93 mg L⁻¹ dia⁻¹. Por outro lado, quando se empregou uma menor concentração desses nutrientes (ensaio 1), o menor valor de

produtividade foi obtido, $88,26 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Os ensaios realizados no ponto central (5, 6 e 7) produziram valores intermediários. A análise estatística para a resposta produtividade celular ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) está apresentada na forma de gráfico de Pareto e superfície de resposta (Figuras 1 e 2, respectivamente).

Figura 1 - Efeitos das variáveis estudadas sobre a produtividade celular ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) para um nível de confiança de 95% ($p < 0,5$).

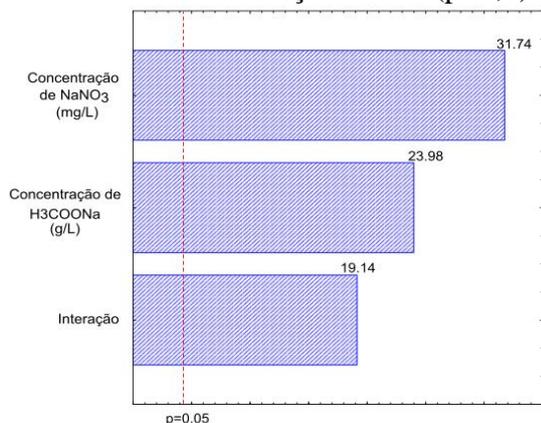
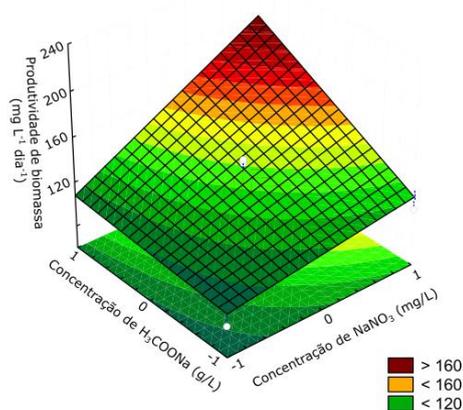


Figura 2 - Superfície de resposta para a produtividade celular ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) da microalga *Nannochloropsis gaditana*.

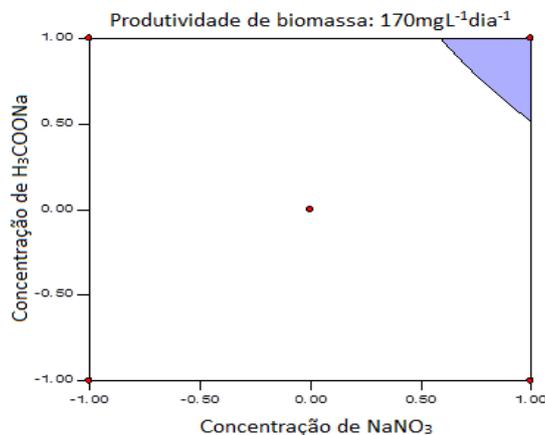


A análise estatística dos efeitos das variáveis independentes, observada pelo gráfico de Pareto, revelou que ambas as variáveis bem como sua interação foram significativas ao nível de 95% de confiança. Verifica-se ainda que a variável concentração de NaNO_3 (X_1) apresentou efeito positivo (+31,74) e significativo ao nível de 95% de confiança, indicando que o aumento dessa variável favorece à obtenção de elevados valores de produtividade celular. A variável concentração de H_3COONa (X_2), bem como a interação entre as variáveis também apresentaram efeitos significativos e positivos sobre a variável resposta analisada (+23,98) e (+19,14), respectivamente, ao nível de 95% de confiança.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 2) mostra que para otimizar a produtividade celular ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) resultante da biomassa da *Nannochloropsis gaditana* produzida ao final de sete dias de cultivo, torna-se necessário aumentar tanto a concentração de Nitrogênio (NaNO_3) quanto a concentração de carbono (H_3CCOONa) no meio de cultivo, indicando que ambas as variáveis independentes tendem a um efeito positivo sobre a variável resposta. Dentro a faixa analisada pelo planejamento, verifica-se que a produtividade celular foi maximizada quando se empregaram os níveis mais elevados de ambas as variáveis independentes: 225 mg/L de NaNO_3 e 6 g/L de H_3CCOONa .

Empregando-se o programa Design-Expert 6.0 foi possível estimar as condições experimentais nas quais as variáveis estudadas fornecem os valores máximos de produtividade celular dentro da faixa analisada pelo planejamento. A Figura 3 mostra a região na qual valores de produtividade celular maiores que $170 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ podem ser obtidos: concentração de nitrogênio e concentração de carbono em níveis altos, em pontos pouco acima de 0,5, tendo como referencia 0 no ponto central e +1 em valor máximo.

Figura 3 - Curva de nível apresentada para a produtividade celular ($\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) em função das variáveis estudadas no cultivo da *Nannochloropsis gaditana*.



3.2. Caracterização do óleo obtido nas condições previstas pelo planejamento fatorial

A biomassa obtida a partir do ensaio realizado nas melhores condições do planejamento fatorial foi submetida ao processo de extração dos lipídeos e os resultados estão ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos para a biomassa celular oriunda da linhagem *Nannochloropsis gaditana* cultivada nas condições ótimas previstas pelo planejamento fatorial e caracterização do óleo obtido.

Biomassa (X)	1,32 g L^{-1}
Concentração de lipídeo (P)	185 mg L^{-1}
Rendimento específico de lipídeos (YP/X)	0,14 $\text{mg lipídeo mg biomassa}^{-1}$
Taxa de produção de lipídeos volumétrica (QP)	26,43 $\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$
Taxa de produção de biomassa volumétrica (QX)	188,93 $\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$
Taxa específica de produção de lipídeos (qP)	0,02 $\text{mg lipídeo mg biomassa}^{-1} \text{dia}^{-1}$
Viscosidade	58,40 cp
Índice de acidez	36,62 mg/g
Índice de iodo	77,89 $\text{g I}_2/\text{g}$

Os valores obtidos pelo cultivo da linhagem *Nannochloropsis gaditana* conduzido sob as melhores condições estabelecidas pelo planejamento fatorial foram: concentração de biomassa (X) de 1,32 g L^{-1} , concentração de lipídeo (P) de 185 mg L^{-1} , rendimento específico de lipídeos (YP/X) de 0,14 $\text{mg lipídeo mg biomassa}^{-1}$, taxa de produção de lipídeos volumétrica (QP) de 26,43 $\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$, taxa de produção de biomassa volumétrica (QX) de 188,93 $\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$ e taxa específica de produção de lipídeos (qP) de 0,02 $\text{mg lipídeo mg biomassa}^{-1} \text{dia}^{-1}$. A caracterização do óleo revelou um índice de acidez de 36,62 mgKOH/g, índice de iodo de 77,89 $\text{g I}_2/100 \text{g}$ de óleo e uma viscosidade de 58,40 cp.

4. Conclusões

Este estudo permitiu estabelecer as condições que favorecem o aumento da produtividade celular da linhagem *Nannochloropsis gaditana*. Nas condições otimizadas de cultivo foram obtidas uma taxa de produção de biomassa volumétrica (QX) de 188,93 mg L⁻¹ dia⁻¹ e uma taxa de produção de lipídeos volumétrica (QP) de 26,43 mg L⁻¹ dia⁻¹. O estudo reológico revelou uma viscosidade similar a outros óleos microbianos reportados na literatura e o índice de iodo encontra-se dentro dos valores exigidos pela ANP para a síntese de biodiesel.

5. Agradecimentos

À FAPESP (processo número 2016/18909-3) e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

6. Referências

- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. 5th ed. Champaign: AOCS, 2004.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) Disponível em: <http://www.anp.gov.br/> Acesso em: 14 mar. 2017.
- DA RÓS, P.C.M.; SILVA, C.S.P.; SILVA-ESTENICO, M.E.; FIORE, M. F.; DE CASTRO, H.F. Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. *Mar. Drugs*, v. 11, p. 2365-2381, 2013.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 497-509, 1957.
- GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, In: Smith W.L., Chanley, M.H., *Culture of Marine Invertebrate Animals*, New York: Plenum, p. 29-60, 1975.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo, v. 1, 1985.
- KIRAN, B.; KUMAR R.; DESHMUKH D. Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy Conversion and Management*, v. 88, p. 1228-1244, 2014.
- MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T.V.; A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research*, v. 7, p. 117-123, 2015.
- YUZBASHEVA, E. YU.; YUZBASHEV T. V.; MOSTOVA E. B.; PERKOVSKAYA, N. I.; SINEOKII, S. P. Microbial Synthesis of Biodiesel and Its Prospects. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 2, p. 8-23, 2014.