



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

## ESTUDO DO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE MICROALGAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BODIESEL

Tássio Henrique C.S. **CUNHA**<sup>1</sup>, Iana Chaiene de Araújo **VIDAL**<sup>1</sup>, Cassyo Conceição **TEIXEIRA**<sup>1</sup>  
Rennan Normando de Andrade **SILVA**<sup>1</sup>, Weruska Brasileiro **FERREIRA**<sup>1</sup>, Maniza Sofia Monteiro  
**FERNANDES**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba-UEPB, Campus I, Campina Grande-PB. E-mail: tassiohenrique@gmail.com. Telefone: (83)3331 2789.

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande-PB. E-mail: manizaf@gmail.com. Telefone: (83) 2101 1116.

### RESUMO

Atualmente as microalgas estão se tornando uma fonte de energia renovável, em razão de algumas espécies apresentarem em seu conteúdo celular um elevado teor de lipídios. No entanto, as microalgas para seu desenvolvimento necessitam de nutrientes adequados, provenientes da preparação de um meio sintético, ou de outros meios modificados, como o uso de águas residuárias domésticas, águas salobras e outros efluentes. Este trabalho estudou a viabilidade de desenvolver as microalgas *Chlorella vulgaris* em um cultivo heterotrófico por meio da modificação do meio de cultura *Bold's Basal Medium* através da adição um de uma fonte orgânica que foi o glicerol, o qual é um resíduo líquido oriundo da produção de biodiesel. Assim, o cultivo da *Chlorella vulgaris* com adição do resíduo líquido orgânico teve como objetivo principal melhorar a produção celular como também aumentar o teor de lipídios na biomassa visando intensificar a potencialidade da produção de biodiesel através das microalgas. Contudo, a espécie em estudo não se adaptou ao cultivo heterotrófico, pois, não houve um desenvolvimento celular satisfatório. Uma vez que, em todos os cultivos foram obtidos uma baixa densidade celular e à medida que aumentava a concentração da fonte orgânica rapidamente as células da *Chlorella vulgaris* iniciavam a fase de declínio mostrando que não se adaptaram bem ao cultivo heterotrófico.

**PALAVRAS CHAVE:** Microalgas, Biodiesel, Cultivo heterotrófico, crescimento celular.

### 1 INTRODUÇÃO

Muita atenção esta sendo atraída para o cultivo de microalgas para aplicações comerciais, levando ao surgimento de uma área de pesquisa interessante a "biotecnologia de microalgas" (CHEN; JIANG, 2001). Um dos aspectos importantes da biotecnologia das microalgas é desenvolver alimentos funcionais e produtos nutracêuticos a partir de microalgas mesmo usando as células inteiras em razão da sua rica composição química ricas em substancias com valores farmacológicos, alimentícios (por exemplo, *Chlorella*, *Spirulina*, etc.) ou por extração



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

de ingredientes funcionais (por exemplo, beta-caroteno, astaxantina, o ácido docosahexaenóico (DHA), o ácido eicosapentaenóico (EPA), o ácido docosapentaenóico (DPA), a ficocianina, etc a partir das algas.

A microalga em estudo a *Chlorella sp* tem uma imensa importância econômica, não só na produção para aplicação na alimentação humana. Mas, também na geração de bioenergia, tornando-se uma alternativa como fonte de energia renovável (PHUKAN et al., 2011).

O cultivo autotrófico é o mais utilizado no cultivo de microalgas, principalmente quando a produção é em larga escala. Mas, várias espécies podem tanto ser cultivadas em processos autotróficos como em heterotróficos. As microalgas podem assimilar diversos compostos orgânicos no cultivo heterotrófico (como: glicose, glicerol, acetato, frutose, lactose e outros), evitando a forte dependência da luz e aumentando a produtividade da biomassa.

De acordo com Huang et al. (2010), o cultivo heterotrófico apresenta várias vantagens frente ao cultivo autotrófico, que pode ser a independência da luz, melhor controle do cultivo, diminuição do custo na separação devido ao aumento da densidade celular.

O processo heterotrófico promove um alto grau de crescimento, isso favorece uma redução nos custos para realizar a separação da biomassa em razão do aumento da densidade celular no meio do cultivo (BRENNAM; OWENDE, 2010). No entanto, o cultivo heterotrófico tem algumas limitações: 1) o número de espécies de microalgas que se desenvolvem em meio heterotrófico é bastante limitado; 2) aumento dos custos com adição de substrato orgânico; 3) mais probabilidade de contaminação e competição com outros microrganismos; 4) inibição do crescimento com excesso de substrato orgânico (BASHAN et al., 2011).

A *Chlorella protothecoides* obteve um aumento de 40% no conteúdo de lipídio quando passou do cultivo autotrófico para o heterotrófico. Assim, o cultivo heterotrófico promove um rápido crescimento e um maior acúmulo de lipídios também pode ser obtido. Este processo heterotrófico pode ser efetuado em águas



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

residuárias que contém as fontes de carbono orgânico reduzindo os custos com nutrientes para produção em grande escala (MALCATA, 2011).

A microalga *C. protothecoides* é mais suscetível para a produção de biodiesel, para o cultivo em meio heterotrófico, essa espécie é capaz de produzir quantidades de lipídios em torno de 50% do peso seco da biomassa (BASHAN et al., 2011). A referida espécie cultivada em meio heterotrófico tendo como fonte carbono a glicose apresentou 55,2% de lipídios na sua biomassa seca cerca de 3,4 vezes superior que no meio autotrófico (MIAO et al., 2004).

Uma das fontes de carbono mais adequada para produção de biodiesel por meio heterotrófico é o glicerol. O glicerol pode ser obtido como subproduto da reação de transesterificação para obtenção do biodiesel. O acúmulo de lipídios é maior quando utiliza o glicerol que as outras fontes de carbono como a glicose por exemplo.

Assim percebe, que é muito promissor e pode deixar a produção de microalgas para geração de biodiesel competitiva com as outras fontes de biodiesel renovável ou não quando efetua-se o cultivo com a presença de uma fonte de carbono.

Assim sendo, este trabalho tem como objetivo principal avaliar o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em cultivo heterotrófico por meio da adição de glicerol como fonte orgânica visando obter melhores condições de separação da biomassa como também promover um incremento no teor de lipídios das microalgas em estudo com o intuito de viabilizar a produção de biodiesel.

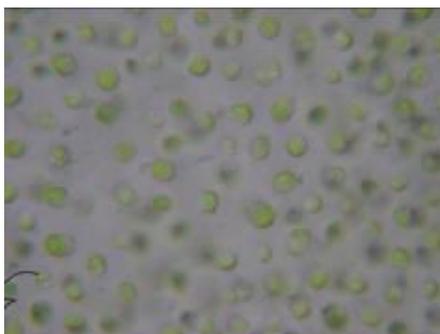
## 2 METODOLOGIA

A cepa em estudo da microalga *Chlorella vulgaris* foi fornecida pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A Figura 1 mostra a fotomicrografia das cepas *Chlorella vulgaris* utilizadas em todo o estudo.



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

Figura 1- Fotomicrografia da *Chlorella vulgaris*



O meio sintético utilizado para o cultivo da *Chlorella vulgaris* foi *Bold's Basal Medium* (BBM) que é o recomendado pelo Centro de Cultura de Algas e Protozoários de Cambridge (CCAP). A partir das culturas mantidas em meio sólido em tubos de ensaios, foram desenvolvidas novas culturas em BBM, iniciando o cultivo em *Erlenmeyers* de 500 mL.

As aclimações químicas foram realizadas com a inoculação do cultivo no meio de cultura BBM e mantendo o pH do meio em 6,5. As condições físicas mantidas nos experimentos foram: temperatura em  $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ , agitação por injeção contínua de ar. Por ser um cultivo heterotrófico não foi efetuado iluminação para impedir o processo de crescimento fotossintético. A fonte orgânica adicionada ao meio BBM foi o glicerol. Iniciou-se acrescentando ao meio de cultura uma proporção de 2% e 4% de glicerol, efetuando um inoculação na proporção 1:10 e 1:100.

A densidade celular da biomassa cultivada em laboratório foi determinada diariamente através da microscopia óptica com aumento de 400x por contagem de células em câmara de Neubauer de acordo com o protocolo de Vega e Voltolina (2007). A densidade celular foi expressa em número de células por mililitro de cultivo (células.mL<sup>-1</sup>). Com os dados experimentais de densidade celular, foram elaborados gráficos que representam as curva de crescimentos da espécie em estudo, nos quais, plotou-se no eixo da ordenada o número de células.mL<sup>-1</sup> e no eixo da abcissa o tempo de cultivo em dia.



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O parâmetro analisado foi a densidade celular com intuito de estudar o crescimento celular em função das diferentes formulações do meio de cultura modificado com adição de uma fonte orgânica o glicerol em diferentes proporções. Para cada experimento foram plotados quatro curvas, pois em cada experimento diariamente se realizava a contagem de células em triplicada, a quarta curva corresponde às médias geométricas dos três resultados obtidos diariamente com a contagem de células para cada amostra.

Observando o comportamento temporal do crescimento da *Chlorella vulgaris* como ilustrado nas Figuras 2, 3 e 4. Verifica-se que a cepa em estudo não apresentou um bom desenvolvimento celular, pois, não houve aumento considerado do número de células capaz de representar a fase exponencial de crescimento das células, já que, as cepas se mantêm na fase estacionária.

A Figura 2 representa o cultivo da *Chlorella vulgaris* com inoculação de 1:100 usando a concentração de 2% de glicerol ao meio BBM. Assim, inóculo foi iniciado com uma população de  $5,5 \times 10^5$  cel. mL<sup>-1</sup>. Porém, não obteve um adequado desenvolvimento celular, pois não ocorreu crescimento celular já que população máxima alcançada nessas condições foi de  $6,2 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>.

Realizou o cultivo da *Chlorella vulgaris* com inoculação de 1:10 com a finalidade de iniciar o cultivo com uma maior população de células e favorecer melhores condições de cultivo, o qual iniciou-se com uma população de  $4,5 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>. Assim, pode observar na Figura 3 que praticamente não houve aumento do número de células, pois, através da curva de crescimento, verifica-se apenas a fase lag e em seguida a fase de declínio celular.



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

Figura 2 – Curva de Crescimento de *Chorella vulgaris* com inoculação 1:100 em meio heterotrófico com 2% de glicerina

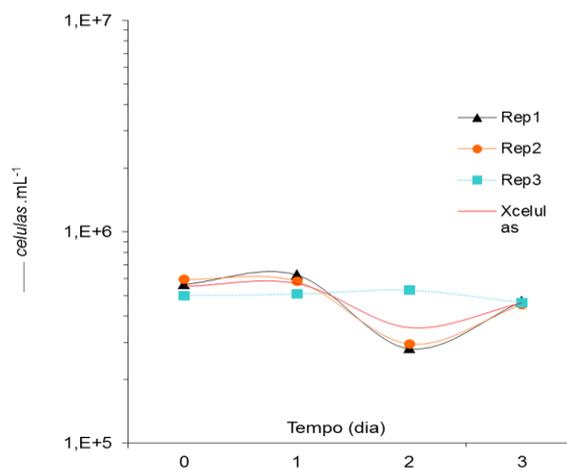
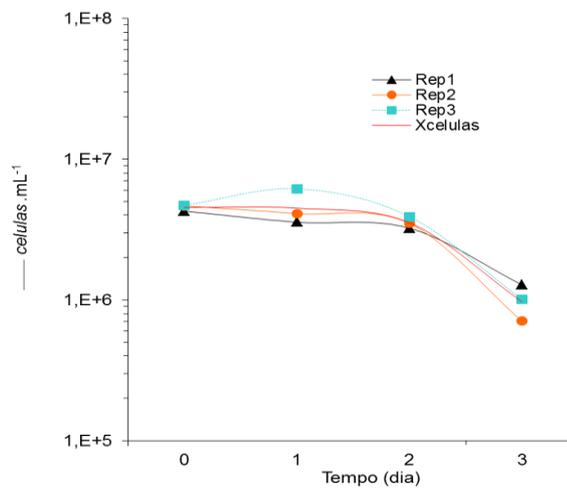


Figura 3 – Curva de Crescimento de *Chorella vulgaris* com inoculação 1:10 em meio heterotrófico com 2% de glicerina.

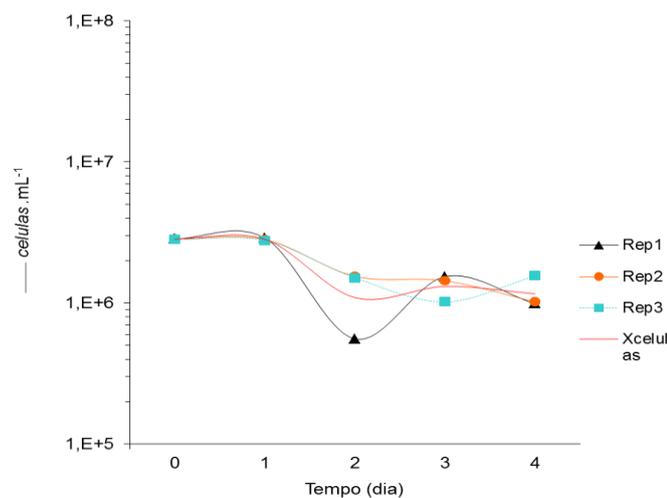




## Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

Com intuito de fornecer uma maior fonte orgânica para favorecer o cultivo heterotrófico aumentou a concentração de glicerol para 4%. No entanto, foi observada uma difícil adaptação ao meio como também a dificuldade de crescimento intensificou, iniciando rapidamente a fase de declínio, pois, a redução no número de células atingiu uma população celular de  $5,58 \times 10^5$  cel. mL<sup>-1</sup> como pode ser verificado na Figura 4.

Figura 4 – Curva de Crescimento de *Chorella vulgaris* em meio heterotrófico com 4% de glicerina



Assim sendo, os resultados obtidos com a espécie em estudo para o cultivo heterotrófico não foi satisfatório, mostrando dessa forma que a *Chlorella vulgaris* irá apresentar uma melhor produção celular através do cultivo autotrófico.

Esta assertiva pode ser corroborado através dos estudos realizado por Ferreira (2012), que realizou o cultivo autotrófico em meio de cultura BBM com fotoperíodo de 12 horas e agitação constante alcançou em quatro dias de cultivo a população máxima de  $6,010^7$  cel.mL<sup>-1</sup> e durante o desenvolvimento das células foi observado as quatro fases do crescimento celular.



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

Santos et al, (2010), também estudaram o crescimento da *Chlorella vulgaris* em meio de cultura Conway modificado com fotoperíodo integral em fotobioreatores de vidro de 250mL com intensidade luminosa de 4000lux, atingindo o número máximo de células no nono dia de cultivo um valor de  $9,43 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>. Assim, verifica-se que para a espécie *Chlorella vulgaris* o tipo de cultivo para proporcionar uma maior densidade celular é efetuando-se o desenvolvimento em cultivo autotrófico.

## 4 CONCLUSÃO

O cultivo heterotrófico com adição de glicerol como fonte orgânica não favoreceu o crescimento celular da espécie *Chlorella vulgaris*, mantendo uma densidade celular menor que as condições de desenvolvimento com o cultivo autotrófico. Desta forma, conclui-se não ser adequado efetuar o cultivo heterotrófico objetivando obter uma maior produção de lipídios celular da microalga *Chlorella vulgaris* visando à produção de biodiesel já que não ocorre incremento da densidade celular necessário para viabilizar a produção do biodiesel.

## REFERÊNCIAS

BRENNAM, 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.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.421-426, 1997.

FERREIRA, W.B; Aproveitamento do concentrado da dessalinização via osmose Inversa para desenvolvimento de *Chlorella sp* e *Chlorella vulgaris* visando a Produção de biodiesel. Tese (Doutorado em Engenharia Química), UFCG, Campina Grande – PB, 2012.



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology, **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.

MALCATA, X.F.; GUEDES, A.C.; AMARO, H.M. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, **Applied Energy**, v. 88, p. 3402-3410, 2011.

MIAO, X.; WU, QY. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.85-93, 2004.

PHUKAN, M.M.; CHUTIA, S.R.; KONWAR, K.B.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock, **Applied Energy**, 2011.

SANTOS, L.B.G.; CALAZANS, N.K.F.; MARINHO, Y.F.; SANTOS, A.P.F.; NASCIMENTO, R.DM.; VASCONCELOS, R.F.L.; MACÊDO, D.M.; GALVEZ, A.O. Influência do fotoperíodo no crescimento da *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) visando produção de biodiesel. p.3, 2010.