

BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE COMBUSTÍVEIS: INFLUÊNCIA DA LUMINOSIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO LIPÍDICA DA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

Emanuel Júnior Silva Soares¹
Natália Ferreira Silva²
Amanda Myrna de Meneses e Costa³
Ayrton Natthan Silva Ramos⁴
Weruska Brasileiro Ferreira⁵

RESUMO

Considerando a crise energética causada pela grande demanda do mercado, as microalgas se apresentam como umas das soluções a serem implementadas na produção de biocombustíveis, uma vez que a produção de biomassa é satisfatória e ocorre em curto espaço de tempo; neste contexto, se destaca a *Chlorella vulgaris*. Sendo a luz um dos principais fatores que interferem no desenvolvimento de seres fotossintetizantes, podendo favorecer a produtividade de biomassa, avaliou-se o comportamento dessa microalga em diferentes intervalos de exposição luminosa para determinação de um fotoperíodo ideal. Foram avaliados os períodos de 6, 12, 18 e 24 horas de exposição durante 192 horas de cultivo em Erlenmeyers de 1L acoplados em aeradores, sendo realizadas contagens diárias em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico para elaboração das curvas de crescimento. Também foram avaliados parâmetros cinéticos como velocidade específica de crescimento, tempo de geração e produtividade. Os melhores resultados obtidos foram no fotoperíodo de 12 horas. Para a análise de produção lipídica, estendeu-se o volume dos fotobiorreatores para obtenção de 2g de biomassa seca utilizando a metodologia de extração descrita por Folch, Lees e Sloane Stanley. Foi alcançada a produção lipídica de 14,7%, sendo essa significativa para possível produção de biocombustível.

Palavras-chave: Biodiesel, Biocombustível, Fotoperíodo, Biomassa, Lipídios.

¹ Graduando do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, emanuel.junior.902@gmail.com;

² Graduanda do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, natalya.esa2@gmail.com;

³ Graduanda do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, mndmyrna@gmail.com;

⁴ Graduando do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, ayrtonatthan17@gmail.com;

⁵ Professor orientador: Doutora em Engenharia Química, Professora do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, weruska_brasileiro@yahoo.com.br.

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo fomento financeiro para execução dos estudos.

INTRODUÇÃO

A crise energética ocasionada devido a demasiada utilização dos combustíveis fósseis tanto nos centros urbanos como na produção industrial, atualmente, faz com que autoridades globais busquem por biotecnologias que visem a geração de combustível utilizando como matéria-prima insumos que tenham um baixo ou nenhum grau de poluição para o meio ambiente.

As microalgas estão no topo das pesquisas biotecnológicas em função de suas qualidades de elevada produção de biomassa em curto período de tempo, além de apresentarem teores lipídicos de interesse à produção de energia e bioprodutos para indústrias de alimentos, química fina e fármacos em geral (SASSI, 2016).

Segundo Nascimento et al. (2016), as microalgas são microrganismos clorofilados, capazes de converter fotossinteticamente dióxido de carbono atmosférico em uma grande variedade de metabólitos e produtos químicos incluindo proteínas, polissacarídeos e lipídios.

A *Chlorella vulgaris* é uma microalga unicelular microscópica, eucariótica, esférica e com diâmetro variando entre 5-10 μm , encontrada em tanques e lagos, com alta capacidade de realizar fotossíntese (COSTA et al., 2006). Possui 51-58% de proteínas, 12-17% de carboidratos, 14 - 22% de lipídios e 5% de minerais (BECKER, 1994).

Além dos parâmetros biológicos, que variam de acordo com as espécies de microalgas, fatores físico-químicos como luminosidade e potencial hidrogeniônico (pH) são determinantes para o desenvolvimento celular, que está diretamente relacionado com o aumento ou diminuição da produção lipídica.

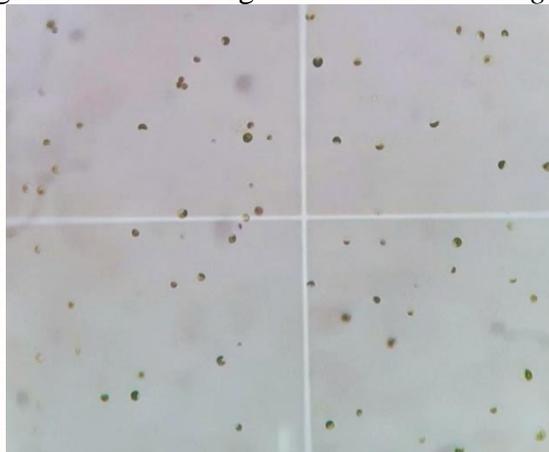
A luz é um fator primordial na produtividade das microalgas, uma vez que fornece a energia necessária para as reações fotossintéticas, promovendo a conversão de nutrientes inorgânicos dissolvidos no meio em biomassa orgânica que, em sua composição, contém lipídios com possível utilização para produção de biocombustíveis. Com isso, avaliar o melhor fotoperíodo, tempo de exposição à luminosidade, é fundamental para se obter um elevado rendimento da biomassa microalgal (SUTHERLAND et al., 2015).

Neste contexto, foi avaliado o fotoperíodo mais adequado para o desenvolvimento da *Chlorella vulgaris* e, posteriormente, o teor lipídico alcançado na condição de luz determinada como ideal.

METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Referência em Tecnologia de Águas - LARTECA do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB localizada em Campina Grande – PB. A espécie de microalga *Chlorella vulgaris*, foi selecionada devido a sua elevada capacidade de produção lipídica, descrita em diversos estudos, assim como de biomassa, o que favorece a produção de biocombustíveis.

Figura 1 – Microfotografia da *Chlorella vulgaris*



O meio de cultura *Bold's Basal Medium* (BBM), recomendado pelo *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP) de Cambridge, foi adotado para o cultivo da *Chlorella vulgaris*. Sendo esses realizados em triplicata, fazendo uso de Erlenmeyers de 1L à temperatura de $26^{\circ}\text{C}\pm 2$, acoplados a aeradores que permitem a homogeneização do meio e também o fornecimento de oxigênio. Utilizou-se a luminosidade fixa de 40W no ambiente, verificando-se a influência da disponibilidade de luz nas culturas submetidas a intervalos de 6, 12, 18 e 24 horas.

O desenvolvimento da microalga foi analisado no período de 192 horas, através de contagens diárias em câmaras de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. Foram determinados o número de células, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ – Equação 1) e o tempo de geração que é o tempo necessário para que ocorra a duplicação da concentração inicial de determinado microrganismo (t_g – Equação 2):

$$\ln(x) = \mu_{\text{máx}}(t - t_i) + \ln(x_i) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

x - Concentração celular (células.mL⁻¹);

$\mu_{\text{máx}}$ - Velocidade específica máxima de crescimento (h⁻¹);

t_i - Tempo inicial referente a fase exponencial (h);

t - Tempo final referente à fase exponencial (h);

x_i - Concentração celular inicial (células.mL⁻¹).

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máx}}} = \frac{0,693}{\mu_{\text{máx}}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

t_g - Tempo de geração (h);

$\mu_{\text{máx}}$ - velocidade específica máxima de crescimento (h⁻¹).

Para as análises de produtividade da biomassa foram coletadas amostras no primeiro e último dia de cultivo, isto é, após 192 horas do início. Estas foram centrifugadas a uma velocidade de 4000 rpm, no intuito de concentrar a biomassa em um pequeno volume de meio, posteriormente e transferiu-se o concentrado para cápsulas de evaporação previamente pesadas e colocadas em estufa a 55°C para secar até atingir peso constante. A produtividade (g.L⁻¹.d⁻¹) foi determinada por meio da Equação 3:

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{biomassa seca}_{\text{final}} - \text{biomassa seca}_{\text{inicial}}}{\text{tempo de cultura}_{\text{final}} - \text{tempo de cultura}_{\text{inicial}}} \quad (\text{Equação 3})$$

O teor de lipídios contido na microalga está diretamente associado à produção de biocombustíveis, portanto estendeu-se o volume dos fotobiorreatores para 10L, observando o desenvolvimento algal e obtendo-se 2g de biomassa seca através dos processos de centrifugação e secagem descritos anteriormente para posterior utilização no processo de extração.

Os lipídios foram determinados por meio da metodologia descrita por Folch, Lees e Sloane Stanley (1957), que consiste em submeter as amostras à extração por meio de uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1) seguida de evaporação do solvente em estufa a 105°C.

Devido à resistência da parede celular da microalga, a metodologia foi adaptada introduzindo-se uma etapa de rompimento celular com o uso de banho ultrassônico durante 20 minutos.

O teor de lipídios foi determinado pela Equação 4:

$$\% \text{ Lípidio} = \frac{\text{volume}_{\text{fase inf}} \times (\text{massa}_{\text{final}} - \text{massa}_{\text{inicial}})}{5 \times M} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

$\text{volume}_{\text{fase inf}}$ – Volume do extrato da fase inferior;

$\text{massa}_{\text{final}}$ – Massa final do béquer com lipídio;

$\text{massa}_{\text{inicial}}$ – Massa do béquer seco;

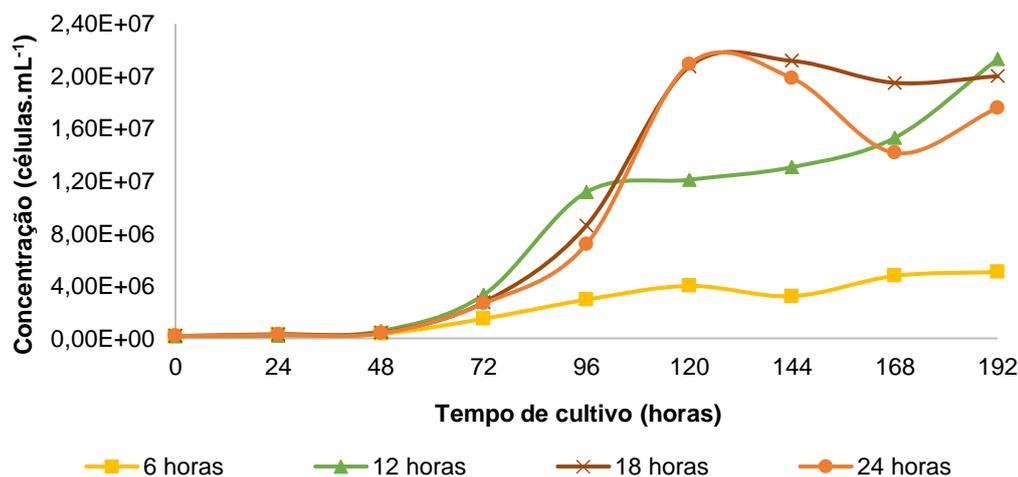
M – Massa da amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 ilustra as curvas de crescimento da *Chlorella vulgaris* para os intervalos de 6, 12, 18 e 24 horas de luz.

O cultivo exposto a 6 horas de iluminação não obteve um bom desempenho em termos de números de células, já os submetidos a 18 e 24 horas apresentaram pico de concentração celular de $2,07 \times 10^7$ células.mL⁻¹. O fotoperíodo de 12 horas de luz mostrou a maior concentração no tempo de 192 horas com $2,13 \times 10^7$ células.mL⁻¹.

Figura 2 – Curvas de crescimento da *Chlorella vulgaris* exposta a distintos intervalos de luz



É observado que a microalga em estudo apresenta uma ótima adaptação quanto ao seu crescimento em maiores intervalos de luz. Em conjunto com o crescimento, também foram avaliados os parâmetros cinéticos descritos na Tabela 1 para a determinação do fotoperíodo ideal, levando em consideração a produtividade de biomassa.

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos avaliados nos cultivos de *Chlorella vulgaris* em distintos intervalos de luz

Horas de luz (h)	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Tempo de geração (h)	Produtividade de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
6	0,0369	17,50	0,0707
12	0,0574	12,08	0,1266
18	0,0451	15,37	0,067
24	0,0480	14,44	0,06

Percebe-se que a microalga em estudo apresentou melhor produtividade no fotoperíodo de 12h, assim como menor tempo de geração e maior velocidade específica máxima de crescimento quando comparados com os demais intervalos de luz analisados. Segundo Chiranjeevi e Mohan (2016), as microalgas apresentam melhor produtividade de biomassa quando cultivadas expostas à luz.

É favorável a utilização deste fotoperíodo em escala industrial pois a disponibilidade de luz natural de alta intensidade que se tem durante o dia é suficiente para que a espécie se desenvolva. Assim, os custos do processo são atenuados por não haver a necessidade de incrementar luz artificial aos cultivos.

A baixa produtividade da *Chlorella vulgaris* quando submetida a longos períodos de exposição a luminosidade acontece devido ao processo de fotoinibição, que é a perda de capacidade fotossintética ocasionada pelo exacerbado desenvolvimento da microalga e alta disponibilidade de matéria orgânica no meio, em conjunto, estes fatores elevam a turbidez do cultivo e conseqüentemente, barram a penetração de luz para as camadas mais internas, deixando de acontecer a conversão de energia luminosa em energia química (KIM, LEE e LU, 2015).

A partir das análises realizadas, verificou-se que a *Chlorella vulgaris* quando exposta ao fotoperíodo de 12h/dia apresenta em sua composição 14,7% de teor lipídico, fato que favorece a utilização da mesma para a produção de biocombustível. Asseverando este resultado, nos

estudos realizados por Melo (2015), que analisou tal produção em meio BBM modificado, obteve teor de lipídios de 14,7%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos no presente estudo conclui-se que:

- A melhor condição para o desenvolvimento da microalga *Chlorella vulgaris* foi no tempo de 12 horas de iluminação diária;
- O fotoperíodo de 12 horas de iluminação apresentou maior produtividade em termos de biomassa microalgal ($0,1266 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$);
- Obteve-se o teor lipídico de 14,7% para a microalga cultivada no meio de cultura *Bold's Basal Medium* (BBM);
- Visando à viabilidade econômica, o cultivo com 12 horas de luz se mostra mais adequado para aplicação em escala industrial sob condições ambientais naturais, tendo em vista que não há a necessidade de utilização de iluminação artificial.

REFERÊNCIAS

BECKER, E. Wolfgang. Microalgae: biotechnology and microbiology. **Cambridge University Press**, 1994.

CHIRANJEEVI, P.; MOHAN, S. Venkata. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. **Renewable Energy**, 2016.

COSTA J. A.; RADMANN E. M.; CERQUEIRA V. S.; SANTOS G. C.; CALHEIROS M.N. Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* Cultivadas em Diferentes Condições. **Alim. Nutr.**, Araraquara. v.17, n.4, p.429-436, 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem.**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

KIM, J.; LEE, Y.; LU, T. A model for autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under photolimitation and photoinhibition in cylindrical photobioreactor, **Biol. Chem.** v. 99, pp. 55–60, 2015.

MELO, D. J. N. **Utilização de vinhaça no cultivo de *Chlorella sp.*** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Campina Grande, 77 p., 2015.

NASCIMENTO, R. C. et al. Avaliação do cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma. III Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia. **Anais**. p. 103-109, 2016.

SASSI, P. G. P. **Uso de microalgas com potencial para produção de biodiesel e mitigação de impactos ambientais.** João Pessoa, 2016. Tese de Mestrado. Centro de Energias Alternativas e Renováveis, 2016.

SUTHERLAND, Donna L. et al. The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. **Water research**, v. 70, p.9-26, 2015.