

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL/USP

INGRID LIMA COSTA

Caracterização e quantificação dos açúcares presentes na
biomassa microalgal e análise reológica do cultivo

Lorena
2019

INGRID LIMA COSTA

Caracterização e quantificação dos açúcares presentes na biomassa microalgal e análise reológica do cultivo

O projeto qualitativo de conclusão de curso na área laboratorial como continuidade de um projeto de iniciação científica na área de concentração de Engenharia de Biocombustíveis apresentado à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção da graduação em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr^a. Daniela Helena
Pelegrine Guimarães

Versão Original

Lorena
2019

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)

Costa, Ingrid Lima

Caracterização e quantificação dos açúcares
presentes na biomassa microalgal e análise reológica
do cultivo / Ingrid Lima Costa; orientador Daniela
Helena Pelegrine Guimarães. - Lorena, 2019.
47 p.

Monografia apresentada como requisito parcial
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia
Química - Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo. 2019

1. Microalga. 2. Combustíveis. 3. Biocombustíveis.
4. Bioetanol. 5. Fermentação. I. Título. II.
Guimarães, Daniela Helena Pelegrine, orient.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu pai Zaqueu, minha mãe Wanda e minha irmã Thamiris, que sempre me apoiaram todos esses anos.

Ao meu namorado Mateus, que sempre me ajudou.

À Professora Daniela, que me orientou e me proporcionou realizar este trabalho.

À Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de Engenharia Química.

RESUMO

COSTA, I. L. **Caracterização e quantificação dos açúcares presentes na biomassa microalgal e análise reológica do cultivo.** 2019. 21 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

O esgotamento das reservas e a poluição de combustíveis fósseis incentivaram o estudo e a viabilidade da produção de biocombustíveis. O objetivo do presente trabalho foi analisar o processo de hidrólise das diferentes microalgas, quantificar os açúcares (xilose, glicose e arabinose) assim como analisar o comportamento reológico das espécies microalgais estudadas. As novas tecnologias para a obtenção de biocombustíveis podem ser de 1ª Geração (derivados de soja, milho), 2ª Geração (cana de açúcar) e de 3ª Geração (microalgas). O estudo feito nesse trabalho se baseou no cultivo de 04 espécies microalgais e, para isso, foi necessário cultivar cada espécie em seu meio específico, ou seja, a *Chlorella sp* foi cultivada no meio Guillard; a *Chlorella vulgaris* no meio Bold Basal; a *Spirulina maxima* no meio XX; a *Scenedesmus obliquus* no meio Zarrouk. Paralelamente, o comportamento reológico de cada espécie foi analisado diariamente, de modo a se obter os modelos reológicos mais viáveis para futuros projetos de reatores de alimentação contínua. Após o cultivo e o devido acompanhamento, foi feita a extração dos lipídeos, sendo os mesmos utilizados em outros projetos, para a realização de transesterificação. A biomassa restante foi desidratada e hidrolisada com ácido, de modo a quebrar a parede celular para liberação dos açúcares, sendo estes quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência e o resultado mostrou que gerou 20,26 g/L de açúcares fermentáveis. A análise dos açúcares mostrou a viabilidade da fermentação e mostrou possíveis causas para melhorar e otimizar o processo, para as espécies que não se mostraram viáveis.

Palavra-chave: Microalga. Combustíveis. Biocombustíveis. Bioetanol. Fermentação.

ABSTRACT

COSTA, I. L. **Viability study of Bioethanol production from Biomass of Microalgae**. 2019. 21 f. Monography (Graduation work in Chemical Engineer) – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The reserves depletion and the pollution of fossil fuels encouraged the study and viability of biofuel production. The objective of the present work was to analyze the hydrolysis process of the different microalgae, to quantify the sugars (xylose, glucose and arabinose) as well as to analyze the rheological behavior of the studied microalgal species. For example, 1^a Generation of biofuels (derivates of soy, corn), 2^o Generation (sugar cane) and the 3^a Generation (microalgae). The study done in this work has based in microalgae cultivate. It was done laboratory tests to the analysis could be quantified and confirmed the bioethanol viable. The use microalgae biomass is a way renovable to extract sugars for the future fermentation. For that, it was necessary cultivate each species in your specific medium. The growth of each cultivate, like the reology, was accompanied in comparation level, generating as result a rheopetic fluid. Each cultivate has specifics reagentes and this could be a determining fator in sugar quantify. After the cultivation and the accompany, it was done the lipids extraction, these were sent to another project for the realize transesterification. The rest were dry and hidrolysed with acid. It breaks up the cell wall releasing the sugars, these are quantified by high performance liquid chromatography and the result showed that generated 20,26 g/L by fermentable sugars. So, the sugars analyze show the viability of fermentation and, if not be viable, show possibles causes to do be better and optimize the process.

Key-word: Microalgae. Combustíveis. Biofuel. Bioethanol. Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução de energia primária no Brasil.....	9
Figura 2 - Evolução do número de células (linha sólida) e da concentração de nutrientes (linha tracejada) ao longo do tempo em um cultivo batelada de microalgas	16
Figura 3 - <i>Chlorella vulgaris</i>	17
Figura 4 - Diagrama esquemático do processo de conversão de biomassa em bioetanol.....	19
Figura 5 - Classificação dos fluidos de acordo com o comportamento reológico	22
Figura 6 - Fluxograma em blocos do processo	23
Figura 7 - Reograma do cultivo da <i>Chlorella</i> sp	29
Figura 8 - Reograma do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i>	30
Figura 9 - Reograma do cultivo da <i>Scenedemus obliquus</i>	30
Figura 10 - Reograma do cultivo da <i>Spirulina maxima</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados reológicos da <i>Chlorella</i> sp.....	32
Tabela 2 – Dados reológicos da <i>Chlorella vulgaris</i>	33
Tabela 3 - Dados reológicos da <i>Scenedesmus obliquus</i>	34
Tabela 4 – Dados reológicos da <i>Spirulina maxima</i>	34
Tabela 5 - Quantificação de açúcares em diferentes espécies de microalgas .	36

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Contextualização	9
1.2 Justificativa e Objetivos	11
1.3 Objetivo Geral	13
1.4 Objetivos Específicos	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Microalgas	14
2.2 Produção do bioetanol a partir das microalgas	18
2.3 Reologia	20
3 METODOLOGIA.....	23
3.1 Cultivos microalgas	23
3.1.1 Meio de cultivo da <i>Chlorella sp.</i>	24
3.1.2 Meio de cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i>	25
3.1.3 Meio de cultivo da <i>Spirulina maxima</i>	25
3.1.4 Meio de cultivo da <i>Scenedesmus obliquus</i>	26
3.2 Extração de lipídeos	27
3.3 Pré-tratamento da biomassa	27
3.4 Hidrólise Ácida	28
3.4.1 Quantificação dos açúcares	28
4 RESULTADOS	29
4.1. Reologia	29
4.2 Hidrólise e quantificação dos açúcares	35
5 CONCLUSÃO.....	37
6 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

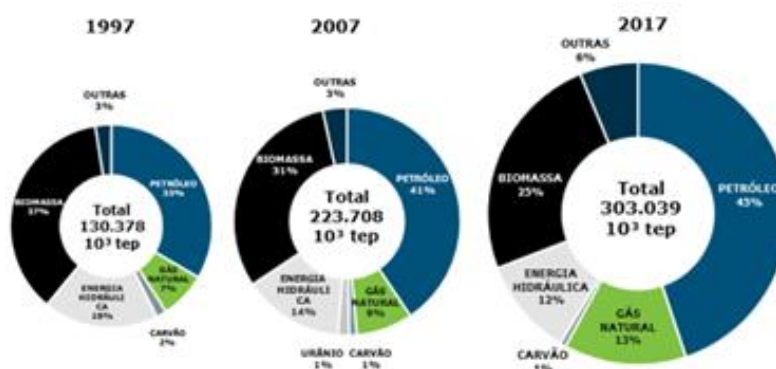
1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

Pesquisas envolvendo fontes de energia limpas e capazes de suprir a demanda global expandem-se anualmente. Problemas ambientais relacionados ao aquecimento global faz em que se busquem maneiras de reduzir a quantidade de gases poluentes na atmosfera, por meio do desenvolvimento de biocombustíveis ou mesmo da fixação dos gases por plantas ou micro-organismos.

As fontes de energia primária brasileira são o carvão, petróleo, hidroeletricidade, gás natural, biomassa e energia nuclear. Os setores de energia, de transporte e da indústria são os responsáveis pela maior parte de emissão de gases do efeito estufa, sendo o desmatamento o menos responsável, segundo Junior (2007). Os gráficos abaixo mostram a evolução de energia primária no Brasil.

Figura 1 - Evolução de energia primária no Brasil



Fonte: IBP (2019)

Ao longo dos anos, o alto consumo da energia primária gerou consequências nocivas ao redor do mundo. Ou seja, o mundo está em crise energética por conta do esgotamento das matérias primas para a produção de combustíveis fósseis. Segundo MELO (2009), há cerca de uma década, o mundo consumia mais de 20 milhões de barris de gasolina como combustível.

De acordo com Andrietta, Steckelberg e Andrietta (2006), a previsão é que as reservas de petróleo durem até 2046, aproximadamente. Além disso,

com a necessidade do cumprimento do protocolo de Kyoto, 62% dos combustíveis fósseis e 88% do carvão não poderão ser utilizados para que seja feito o controle do carbono (MAGRO et al., 2016). Então, as rígidas questões ambientais da atualidade e o esgotamento de recursos naturais, além dos danos ao meio ambiente, são as consequências de anos de exploração da energia primária (ORTENZIO et al., 2015).

Dessa forma, houve a necessidade de intensificar e colocar em prática estudos de novas tecnologias para a produção de biocombustíveis a fim de substituir gradativamente os combustíveis fósseis (SOUZA et al., 2012). Desse modo, viu-se que uma forma de substituição são os biocombustíveis de primeira geração, produzidos a partir do cultivo da cana de açúcar; segunda geração, produzidos a partir do açúcar de biomassa processada e a terceira geração a partir de micro-organismos.

No entanto, a produção de biocombustíveis de primeira geração acaba sendo uma competição com o cultivo alimentar e pode gerar um maior gasto com água potável, não sendo viável a substituição total por esta alternativa (VIEIRA et al., 2014).

Para resolver esse problema, viu-se que a utilização de micro-organismos seria uma alternativa para a produção de biocombustíveis visto que estes degradam a matéria orgânica e não liberam substâncias nocivas ao meio ambiente (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012). Durante a história, a microalga foi cultivada voltada para a alimentação (1950), sendo posteriormente (1960) utilizada em maiores escala para fins comerciais e, na década de 70, tais micro-organismos foram estudados para a produção de biocombustíveis. Atualmente, as microalgas estão sendo cotadas como a alternativa mais viável para a produção de biocombustíveis (ORTENZIO et al., 2015).

A microalga é uma forma de se obter a biomassa para a posterior fermentação. Segundo Radmann, Costa (2008) as microalgas são cultivadas de forma simples, em meio úmido apenas, e conseguem produzir mais lipídeos do que vegetais superiores. A produção de óleo também é superior às culturas terrestres podendo ser usada para a produção de biodiesel (MAGRO et al., 2016).

A fonte de carbono é obtida a partir da fotossíntese ao absorver o dióxido de carbono, luz, água (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012) e um meio

com nutrientes específicos. O cultivo de cada espécie é fundamental na quantificação de glicose fermentável e na concentração de óleo para a transesterificação, o que é confirmado por SOUZA et al. (2012) ao constatar que as variações de concentrações dessas substâncias influenciam nas propriedades das microalgas. Dessa forma, são adicionados micronutrientes e macro nutrientes para o correto funcionamento celular e um rápido crescimento da microalga (MAGRO et al., 2016), assim como uma melhor concentração da biomassa.

As microalgas são capazes de crescer e se desenvolver o ano todo, com amplo potencial de dobrar o crescimento da biomassa, tratar efluentes, não necessitar de pesticidas e poder contribuir para a produção de diversos produtos, sendo necessário, apenas, verificar a melhor forma de extraí-los (SOUZA et al., 2012).

Em suma, o Brasil é um país ideal para o cultivo de microalga devido a sua extrema costa litorânea (10959 Km) e, somado a isso, altos níveis de insolação e de reserva de água (BRASIL, 2014).

1.2 Justificativa e Objetivos

O esgotamento das reservas dos combustíveis fósseis e a poluição proporcionada por estes incentivaram novos estudos para fontes alternativas de produção de biocombustíveis.

O Departamento de Engenharia Química (DEQUI) da Escola de Engenharia de Lorena/Universidade de São Paulo (EEL/USP), tem desenvolvido uma série de trabalhos científicos e tecnologicamente relevantes. Com relação aos projetos envolvendo a produção de biocombustíveis a partir de microalgas, os estudos convergem para o projeto de um foto biorreator de alimentação contínua, sendo selecionado o sistema de alimentação mais conveniente, após análises físicas e químicas das correntes de alimentação. Numa linha de pesquisa desse tipo, o comportamento reológico ocupa posição de destaque, pois todos os materiais envolvidos no processo têm comportamento não newtoniano e podem ser submetidos a qualquer tipo de operações unitárias como agitação, mistura, trocas de calor, movimentação por

bombas especiais, separações e outras que podem advir da concepção e desenvolvimento de todo o processo (VINHAL, 2015).

Das observações anteriores, pode-se notar a importância de criteriosa caracterização reológica para os diferentes tipos de alimentação em reatores, já que os dados de viscosidade usados nos projetos de equipamentos devem ser determinados com a máxima precisão possível, evitando-se um sub ou superdimensionamento. Ademais, os dados reológicos são de fundamental importância na economia de energia, o que nas últimas décadas se tornou extremamente importante a ponto de cada vez mais as operações de troca de calor e massa serem encaradas de forma mais minuciosa.

O presente trabalho focou na produção de biocombustível de 3ª geração, a partir de diferentes microalgas, às quais constituem uma forma sustentável da produção e, por meio do cultivo, torna-se possível concentrar e extrair a biomassa produzida, com posterior hidrólise (para geração do bio etanol) ou transesterificação (para geração do biodiesel).

Considerando-se a escassez de informações a respeito de dados reológicos na literatura científica, o presente trabalho também analisou o comportamento reológico da biomassa de diferentes espécies microalgais, cultivadas em foto biorreator do tipo coluna de bolhas, em diferentes tempos de cultivo de modo a, futuramente, estimar as demandas energéticas de cada etapa.

1.3 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar o potencial da geração do bioetanol a partir de 04 diferentes espécies de microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Secendesmus obliquus*, *Chlorella sp* e *Spirulina máxima*.

1.4 Objetivos Específicos

Para que o Objetivo Geral do presente trabalho fosse atingido, verificou-se o processo de hidrólise das diferentes microalgas, de modo a confirmar as que geram maior concentração (g/L) dos açúcares: xilose, glicose e arabinose.

Paralelamente, o comportamento reológico das 04 espécies microalgais foi analisado e os lipídeos de cada espécie foram extraídos de acordo com a literatura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microalgas

As microalgas são pequenos organismos fotossintéticos encontrados em ambientes aquáticos (água salgada ou doce), precursoras das plantas, podendo ser encontradas em todo mundo, em ambientes aquáticos (marinhos ou água doce) ou na superfície de alguns tipos de solos, podendo crescer rapidamente e viver em condições rigorosas devido à sua estrutura unicelular (LOURENÇO, 2006).

Na década de 60 as microalgas *Chlorella* sp já eram cultivadas para fins comerciais no Japão, seguida pelo cultivo de *Spirulina* sp. no México, Estados Unidos e China, na década de 70 (RICHMOND, 2004; PRAVEEN et al., 2012; MATHIMANI et al., 2015).

No Brasil os primeiros estudos realizados envolvendo cultivo de microalgas começaram a se difundir na década de 80. No entanto, tais pesquisas focaram, principalmente, o aspecto de crescimento sob diversas condições, como meios de cultivo, e outros parâmetros como nutrientes, temperatura, salinidade e luz (SIPAÚBA et al., 1999).

Segundo Zaslavskaia et al. (2000), microrganismos fotossintéticos como microalgas presentes nos ambientes aquático são responsáveis pela produção de O₂ e fixação de CO₂. A biomassa produzida da assimilação de CO₂ pode ser transformada em alimento humano, ração animal e os ácidos graxos extraídos da biomassa podem ser convertidos a biocombustíveis ou até em alimentos e fármacos (SCRAGG et al, 2002).

Nesse aspecto, a ausência de estruturas (caule e folhas), aliado ao fato de encontraram-se submersas em água tornam as microalgas mais eficientes na conversão de energia solar em biomassa, quando comparadas às plantas superiores. Ou seja, o cultivo microalgal apresenta como vantagens o fato de possuir nutrientes simples, o rápido aumento da biomassa e a possibilidade de manipular o meio de cultivo a fim de obter alguma característica específica (COSTA et al., 2006). De acordo as observações obtidas por Pohndorf et al. (2016), algumas espécies microalgais têm elevado teor lipídico, podendo

produzir até 137.000 litros de óleo por *hectare*, ao ano, em condições ótimas de cultivo.

Além do biodiesel, os resíduos provenientes da extração dos lipídeos apresentam aplicações potenciais, uma vez que tais resíduos contêm carboidratos, proteínas e pigmentos, podendo ser convertidos em uma variedade de biocombustíveis, dentre eles o bioetanol (PRAGYA et al., 2013; NEOFOTIS et al., 2016).

A produção de etanol a partir dos resíduos de biomassa resultante do processo de extração lipídica, pode aumentar a produtividade energética total e representa uma medida fundamental para que haja equilíbrio dos aspectos econômico e energético de um determinado local (ZHU et al., 2014).

O cultivo das microalgas é realizado em sistemas iluminados, tais como os fotobiorreatores (sistemas fechados) ou as lagoas fotossintéticas (sistemas abertos) e, para que a taxa de crescimento e a produtividade sejam mais elevadas, tais microrganismos necessitam de condições de cultivo adequadas. Os principais arranjos dos reatores abertos são os tanques retangulares e circulares do tipo *raceway*; nos sistemas fechados normalmente empregam-se reatores do tipo coluna de bolhas, *air lift* e arranjos tubulares espirais (PEREIRA et al., 2012; KLEIN, 2013; SANTOS, 2013).

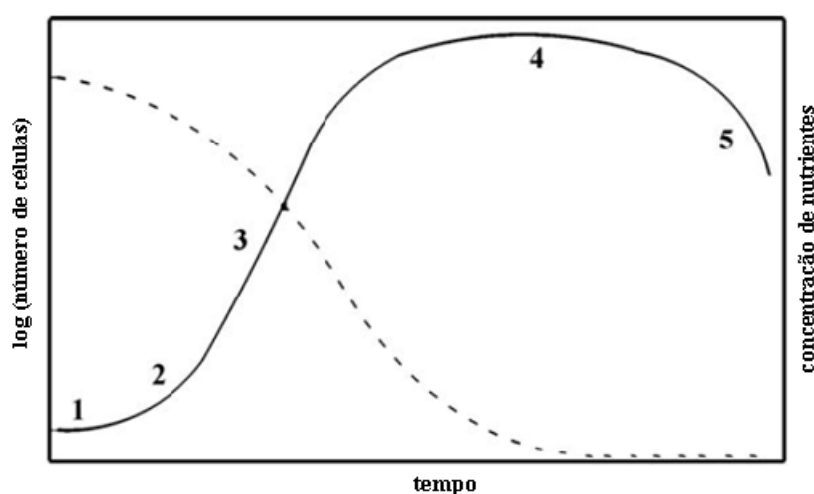
De acordo com Singh and Dhar (2011) dentre os principais parâmetros que influenciam na produção da biomassa microalgal, destacam-se as condições de mistura. Ou seja, para se alcançar elevadas taxas de crescimento e produtividade da biomassa, é imprescindível que haja um sistema de agitação adequado, de modo a manter as células em suspensão, proporcionar uma exposição uniforme de luz em todas as células, aumentar a transferência de massa para reduzir o gradiente de nutriente na cultura e para evitar sedimentação das células. No entanto, o aumento do cisalhamento pelo fornecimento excessivo de energia pode produzir danos celulares, afetando o desempenho da cultura (BENNEMAN; OSWALD, 1996; MAGRO et al., 2016).

Sendo assim, no desenvolvimento de novos projetos industriais, como é o caso do cultivo de microalgas em larga escala para geração de biocombustíveis, a análise do comportamento reológico do material é de fundamental importância nos cálculos de engenharia de processos, envolvendo grande variedade de equipamentos tais como bombas, tubulações,

misturadores, aeradores, trocadores de calor. De acordo com os resultados obtidos por Lira (2011) e Pelegri et al (2016), os cultivos microalgais não apresentam valores constantes de viscosidade ao longo das diferentes etapas do processo e, para otimizá-las, torna-se necessário cautelosa análise do comportamento reológico dos cultivos em cada uma destas etapas.

O crescimento básico das células de um cultivo pode ser representado na Figura 2.

Figura 2 - Evolução do número de células (linha sólida) e da concentração de nutrientes (linha tracejada) ao longo do tempo em um cultivo batelada de microalgas



Fonte: KLEIN (2013)

A etapa 1 (fase de *lag*) é onde se tem um aumento do número de células devido a sua adaptação com o meio; a fase 2 (fase de aceleração) é onde se tem uma aceleração no crescimento; a fase 3 (fase de crescimento exponencial) é onde se tem o rápido crescimento e seu ponto máximo; a fase 4 (fase estacionária) é quando a população de microalgas não cresce mais devido a limitação dos nutrientes do meio; a fase 5 (fase de declínio) é onde há o decréscimo exponencial das células e o fim dos nutrientes (KLEIN, 2013).

As microalgas do gênero *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* e *Spirulina* são conhecidas pelos elevados teores de amido, glicogênio e outros açúcares, servindo como matérias-primas para a produção do bioetanol. Desta forma, pode-se idealizar um processo integrado no qual os lipídeos sejam extraídos para a produção do biodiesel e o material sólido

resultante (rico em carboidratos) seja aproveitado para a síntese do bioetanol (JOHN et al., 2011).

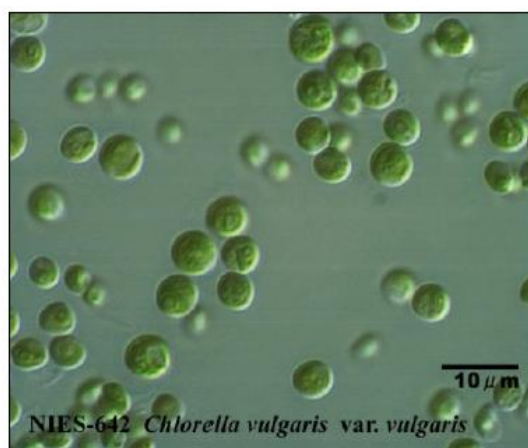
O teor de carboidrato depende das condições de cultivo, o qual varia de acordo com a espécie microalgal. O elevado teor deste composto permite ao microrganismo alta atividade metabólica, sua sobrevivência temporária no escuro e a produção de bioetanol (MAGRO et al., 2016).

a) *Chlorella*

A microalga *Chlorella* tem grande vantagem de ter alta capacidade fotossintética, rica em micronutriente e alto valor de clorofila (COSTA et al., 2006). A primeira espécie estudada, deste gênero, foi a *Chlorella sp*, sendo a mesma considerada uma fonte potencial de alimento, com elevados teores dos compostos que podem ser submetidos à fermentação ou transesterificação (COSTA, 2018)

Já a microalga *Chlorella vulgaris* é utilizada para tratamentos de efluentes visando à diminuição de matéria orgânica e ela é capaz de crescer em um meio mixotrófico – realiza a fotossíntese e consome carbono inorgânico e orgânico (MARINO, 2018). O amido é sua principal reserva nutricional assim como, 2% de clorofila e rica em vitaminas do complexo B. Esta, também, possui alto teor de lipídeos quando comparada a outras espécies de microalgas (MORAES, 2018). A figura abaixo representa *Chlorella vulgaris* no microscópio.

Figura 3 - *Chlorella vulgaris*



Fonte: LÚCIO (2014)

b) *Scenedesmus*

A microalga *Scenedesmus obliquus* é predominantemente nos lagos de água doce e rios. Elas ficam na superfície vivendo bem em meios com alto teor mineral e efluentes contaminados. Sua atual característica é ser produzida para a devida remoção de biomassa e, esta, ser utilizada para a produção de biocombustíveis (RAMIREZ, 2013). O cultivo delas cresce a uma temperatura de 10°C a 30°C sendo o Brasil um lugar favorável para o crescimento da biomassa. Esse fato favorece a extração de grandes quantidades de lipídeos, visto a quantidade de biomassa produzida (PALOMINO, 2017).

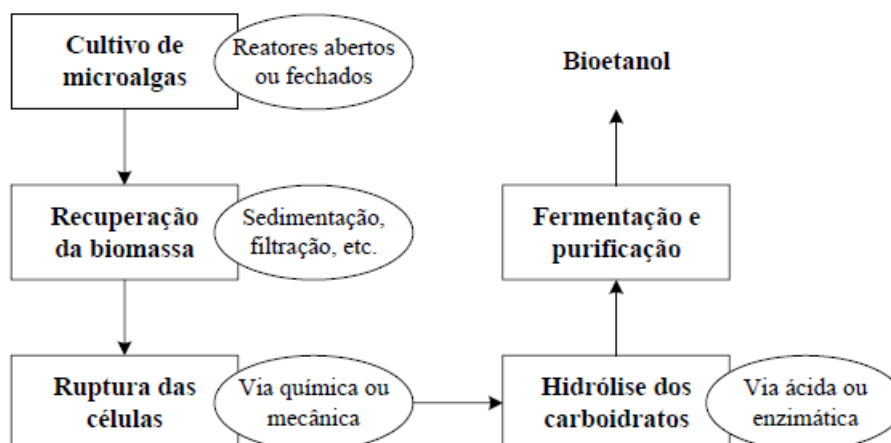
c) *Spirulina*

A microalga *Spirulina máxima* é uma cianobactéria que pode ser usada para substituir ácidos graxos, como por exemplo lipídeos. Além disso, ela apresenta altos teores de proteínas e aminoácidos essenciais (SANTOS, 2003). A *Spirulina* se desenvolve em meio alcalino e esta é unicelular e descende das primeiras algas fotossintéticas. (CARVAJAL, 2009).

2.2 Produção do bioetanol a partir das microalgas

O procedimento para a conversão de biomassa de microalga em bioetanol está representado na Figura 4 onde, uma vez transcorrido o tempo necessário para o cultivo, torna-se necessário colher a biomassa, normalmente feita por floculação. Em seguida, o óleo deve ser extraído, sendo a biomassa restante hidrolisada, de modo a gerar os açúcares fermentáveis, para a futura fermentação. (KLEIN, 2013; MAGRO et al., 2016).

Figura 4 - Diagrama esquemático do processo de conversão de biomassa em bioetanol



Fonte: KLEIN (2013)

Segundo ARAÚJO et al. (2013), a hidrólise ácida atua como catalisador convertendo a celulose em hexoses. Dessa forma, a reação precisa ser controlada com quantidade adequada de água para que a eficácia da hidrólise seja atingida. Para isso, torna-se necessário a análise da concentração de ácido, porque este pode impactar negativamente na hidrólise degradando o açúcar fermentável. Nos estudos mais recentes, viu-se que os ácidos mais utilizados são o ácido clorídrico e o ácido sulfúrico.

Já a hidrólise enzimática é utilizada pela via biológica. Estes biocatalisadores precisam ser mais rigidamente controlados visto que se tratam de compostos sensíveis a pH, temperatura, entre outros fatores.

Com isso, em nível da análise de comparação, a hidrólise mais eficaz é a enzimática, visto que esta reduz as chances de produção de reações secundárias. A equação que representa o fenômeno da hidrólise enzimática é a formação de glicose e frutose a partir da sacarose.

Já a fermentação é feita a partir de uma grande quantidade de açúcares utilizando microrganismos (KLEIN, 2013). Um exemplo de microrganismo é a *Saccharomyces cerevisiae*. A equação representativa é a formação de etanol e gás carbônico a partir da glicose.

Essa fermentação por meio da biomassa de microalga é promissora visto que esse modelo é sustentável, porém, essa tecnologia precisa ser

estudada antes de comercializada por se tratar de um processo de alto custo (CARDOSO et al., 2011).

2.3 Reologia

Reologia é a ciência que descreve o comportamento (taxa de deformação) de materiais, sob a influência de forças externas, sendo que os sólidos suportam tensões de cisalhamento elevadas sem mudarem de forma, ao passo que os fluidos (líquidos ou gasosos) se deformam continuamente quando submetido a ação de uma tensão de cisalhamento, ainda que de pequena intensidade. Em outras palavras, o conceito de reologia está baseado nas propriedades mecânicas vinculando a deformação do material quando as forças tangenciais são aplicadas (SCHRAMM, 1981; BARNES et al., 1989; SANTOS, 2012; STAKE, 2016).

Os fluidos reais apresentam uma certa resistência ao escoamento ou à deformação, e esta resistência é resultante de uma propriedade chamada viscosidade, introduzida por Issac Newton, em 1887. A lei de Newton afirma que a força por unidade de área necessária para manter o movimento do fluido (tensão de cisalhamento) é proporcional ao gradiente de velocidade na direção perpendicular ao fluxo (taxa de deformação), e a constante de proporcionalidade corresponde à viscosidade, a qual é sinônimo de atrito interno, ou seja, medida da resistência ao escoamento (SHARMA et al., 2008).

A equação que descreve o comportamento destes fluidos é dada por: $\sigma = \mu \cdot \dot{\gamma}$

onde σ corresponde à tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ à taxa de deformação e μ à viscosidade absoluta.

Os fluidos que obedecem ao postulado de Newton (equação (1)), constituem os fluidos newtonianos. Tais fluidos escoam logo que a tensão é aplicada e a viscosidade é independente da tensão aplicada sobre o mesmo, dependendo apenas da composição e da temperatura. Os fluidos que não obedecem ao postulado de Newton são designados genericamente de não newtonianos (HOLDSWORTH, 1971), cujos valores de viscosidade variam com a tensão de cisalhamento, podendo também variar com o tempo de aplicação

do cisalhamento. Para caracterizar um fluido não newtoniano utiliza-se a viscosidade aparente (η_a), calculada para uma taxa de deformação específica:

$\eta_a = \sigma / \dot{\gamma}_i$ onde σ é a tensão de cisalhamento e $\dot{\gamma}_i$ é a taxa de deformação na qual se calculou η_a .

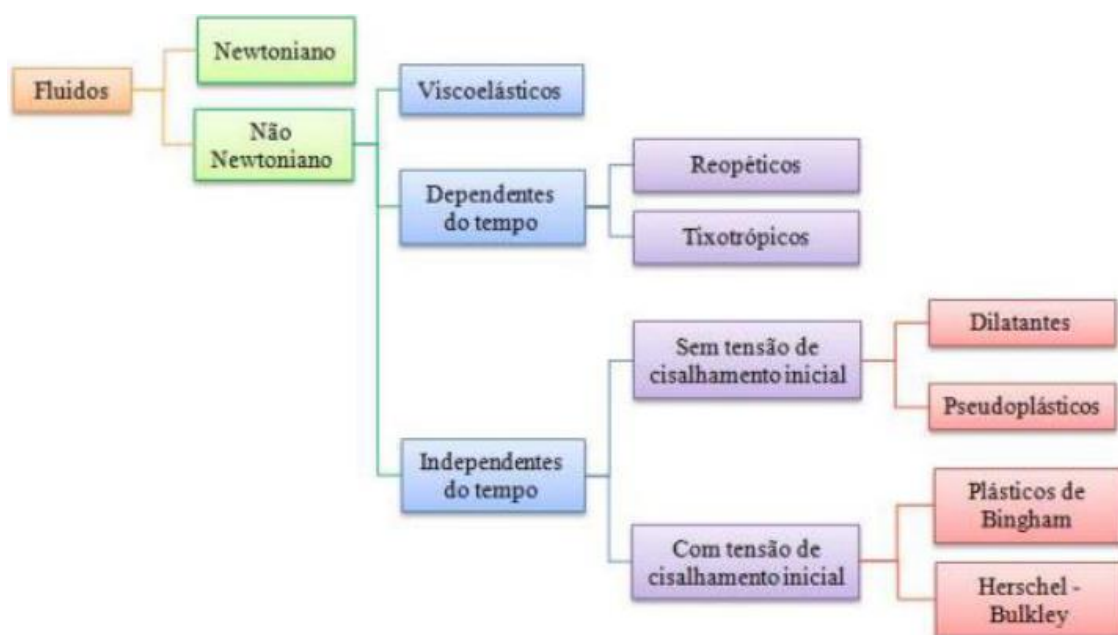
A Figura 7 ilustra as diferentes classificações de um fluido, de acordo com o seu comportamento reológico.

Quanto à relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento, os fluidos podem ser classificados como: Newtonianos (com viscosidade constante, seguindo a Lei de Newton) ou Não Newtonianos (quando a relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento e, conseqüentemente, a viscosidade, não são constantes) (BARNES et al., 1989).

Os fluidos Não Newtonianos podem ser classificados como dependentes ou independentes do tempo. A uma temperatura constante, a viscosidade aparente para fluidos não newtonianos independentes do tempo depende somente da tensão de cisalhamento. O comportamento desses fluidos pode ser dividido em duas categorias: pseudoplásticos e dilatantes, dependendo se o fluido torna-se, respectivamente, menos ou mais viscoso com um aumento na tensão de cisalhamento (LEONARDI & CAMPOS, 2001).

Os fluidos também podem apresentar uma tensão inicial a ser vencida antes deles escoarem e este comportamento é usualmente explicado em termos da sua estrutura interna, capaz de impedir o movimento para valores de tensão de cisalhamento menores do que um valor limite τ_0 . Para τ maior que τ_0 a estrutura interna colapsa, permitindo o escoamento (BOURNE, 1982). Para os fluidos não newtonianos dependentes do tempo, a viscosidade aparente depende também da duração da tensão aplicada. Esses fluidos são subdivididos em tixotrópicos e reopéticos. No caso do primeiro, a uma taxa de deformação fixa, o fluido torna-se menos viscoso com a duração do cisalhamento, enquanto que para o último observa-se um aumento de viscosidade com o tempo (TISCHER, 2006).

Figura 5 - Classificação dos fluidos de acordo com o comportamento reológico



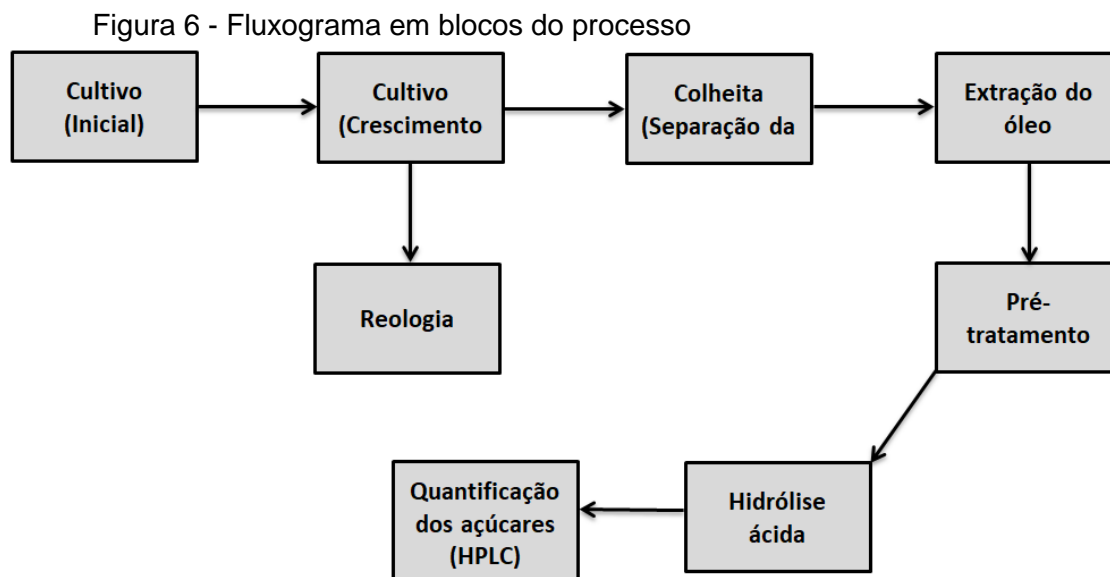
Fonte: (STAKE, 2016)

De acordo com Clementi and Moresih (1998), o cultivo microalgal trata-se de um fluido complexo, composto de: (i) uma fase líquida, a qual contém água, substâncias poliméricas e sólidos dissolvidos; (ii) células algais, e (iii) sólidos insolúveis. Segundo os autores, a fase líquida tende a apresentar comportamento reológico de um fluido newtoniano; entretanto, a presença de substâncias poliméricas nesta fase e a interação entre as mesmas com a água tendem a alterar o comportamento reológico para não newtoniano. Além disto, a presença de células algais viscoelásticas e detritos celulares também conduzem ao comportamento não newtoniano.

Bolhouse (2010) afirma que as propriedades reológicas, nos cultivos microalgais, estão diretamente relacionadas com a potência necessária para agitação e bombeamento, além da grande importância destas propriedades no projeto dos reatores. Outro fator que demonstra a importância da reologia é que os autores também afirmam que o aumento na transferência de energia proporciona o aumento da viscosidade da suspensão. Além disto, cultivos mais concentrados, ou seja, cultivos mais viscosos necessitam menos energia no momento de desidratar a biomassa.

3 METODOLOGIA

No presente trabalho o acompanhamento de crescimento celular das microalgas foi acompanhado com a análise reológica, de acordo com o esquema representado na Figura 8.



Fonte: o autor.

3.1 Cultivos microalgas

As cepas das microalgas foram cultivadas e mantidas em uma incubadora confeccionada de madeira e dotada de um fotoperíodo controlada por um temporizador.

A manutenção do banco de células foi feita por meio da repicagem em erlenmeyers de 125 ml, com volume útil de 100 mL, fotoperíodo de 12h: 12h (luz/escuro) e luminosidade média de 4,8 Klux. As repicagens foram feitas de 15 em 15 dias na proporção de 10 mL de cultivo antecessor e 90 mL de cultivo novo com agitação diária. A inoculação foi feita próxima à chama lamparina para evitar contaminação. A iluminação era de potência de 40 W.

Os cultivos foram feitos em uma sala adaptada no Laboratório de Engenharia de Microalgas coordenado pelo professor Messias Borges da Silva.

O crescimento de cada cultivo no erlenmeyer foi acompanhado diariamente pela medida de absorbância no espectrofotômetro UV-Vis modelo

Bel Photonics. O comprimento utilizado foi 680 nm. Quando a leitura de absorbância estava no limite de crescimento, era feito uma nova inoculação a partir dos cultivos iniciais aumentando o cultivo. O procedimento de preparo do meio era o mesmo, no entanto não era possível autoclavar os maiores cultivos e, então para esterelizar o meio, foi utilizado cloro (1 mL/L de cultivo) e, após 30 minutos, o meio era neutralizado com Tiossulfato de Sódio. Era feito o teste de cloro para saber se havia algum resquício, caso não houvesse mais cloro na água, o cultivo antecessor era inoculado. O procedimento do aumento de cultivo era feito até que se tivesse grande quantidade de biomassa.

3.1.1 Meio de cultivo da *Chlorella sp*

A proposta inicial feita foi a análise físico-química da biomassa da microalga *Chlorella sp* para posterior extração de bioetanol. Esta foi cultivada em meio Guillard que é composto pelos seguintes itens:

Sal marinho	1 g/L
NaNO ₃	75 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5 g/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15 g/L
Na ₂ EDTA	4,3 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,2 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6,3 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	9,8 mg/L
Tiamina	100 mg/L
Cianocobalamina	0,5 mg/L
Biotina	0,5 mg/L

3.1.2 Meio de cultivo da *Chlorella vulgaris*

Já o meio de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* é o Meio Bold Basal (BBM) e os reagentes são de padrão analítico e são: (LOURENÇO, 2006)

NaNO ₃	0,75 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,075 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,175 g.L ⁻¹
NaHCO ₃	0,075 g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,013 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g.L ⁻¹
EDTA-Na ₂	0,05 g.L ⁻¹
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,004 g.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,004 g.L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0015 g.L ⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00024 g.L ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00024 g.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,00006 g.L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0002 g.L ⁻¹

3.1.3 Meio de cultivo da *Spirulina maxima*

Para manter o meio de cultivo da microalga *Spirulina maxima*, utilizou-se o meio proposto por SANTOS (2003). O meio é composto pelos seguintes reagentes:

KNO ₃	2,5 g/L
NaHCO ₃	15,15 g/L
Na ₂ CO ₃	8,9 g/L
K ₂ SO ₄	1,9 g/L
K ₂ HPO ₄	0,5 g/L
NaCl	0,92 g/L

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g/L
H ₃ BO ₃	2,86 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g/L
Na ₂ Mo ₂ O ₄ .2H ₂ O	0,39 g/L
CaSO ₄ .5H ₂ O	0,079 g/L
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,049 g/L
EDTA.Na	29,8 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	QSP 1000 mL

3.1.4 Meio de cultivo da *Scenedesmus obliquus*

O cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* foi o meio Zarrouk. Ele é composto pelos seguintes reagentes: (MULITERNO, 2005).

NaHCO ₃	16,8 g/L
K ₂ HPO ₄	0,5 g/L
NaNO ₃	2,5 g/L
K ₂ SO ₄	1,0 g/L
NaCl	1,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/L
CaCl ₂	0,04 g/L
EDTA	0,08 g/L
H ₃ BO ₃	2,86 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222 g/L
CuCO ₄ .5H ₂ O	0,079 g/L
MnO ₃	0,015 g/L
NH ₄ VO ₃	22,86 g/L
KCr(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	192 g/L
NiSO ₄ .6H ₂ O	44,8 g/L

$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	17,94 g/L
$\text{TiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	61,1 g/L
$\text{CO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	43,98 g/L

Antes de cada inoculação, os meios de cultivo foram autoclavados a 110°C e o procedimento seguia como o item 3.1 descreve.

3.2 Extração de lipídeos

Em seguida, as células das microalgas foram quebradas e, em seguida, o óleo foi extraído, por meio de um equipamento de ultrassom de sonda (Hielscher Ultrassound Technology, modelo UP 200S), utilizando-se como solvente o clorofórmio e o metanol.

Uma vez extraído o óleo, este foi utilizado na produção do biodiesel em trabalho paralelo, desenvolvido por outro aluno de iniciação científica. A biomassa restante, utilizada no presente trabalho, foi recolhida, seca e moída para obtenção de partículas de aproximadamente 1 mm, às quais foram posteriormente diluídas com água e postas num banho de ultrassom durante 10 minutos. Em seguida, a biomassa foi enxaguada e seca, sendo os sólidos solúveis quantificados.

3.3 Pré-tratamento da biomassa

A biomassa seca foi transferida para frascos de erlenmeyers e tratadas com solução 1% de NaOH (v/v), sendo os frascos inseridos em autoclave (Quimis) a 121°C por uma hora. Tal pré-tratamento baseou-se nos resultados obtidos por Visser (2008), o qual resultou em melhores rendimentos, após a etapa de extração dos açúcares.

Transcorridos os 60 minutos, as amostras foram removidas da autoclave, lavadas com água destilada e armazenadas até o momento da extração dos açúcares por hidrólise enzimática.

3.4 Hidrólise Ácida

A hidrólise feita nas microalgas foi com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N na proporção de 1:16 de biomassa seca. Esta foi autoclavada por 30 minutos a 120°C e 1 atm (MIRANDA, 2011). Em seguida a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. Este procedimento foi feito para a microalga *Chlorella sp.*, porém esta microalga não apresentou açúcar o suficiente para a fermentação.

Após a centrifugação, as amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sep Pak C18 (Millipore). Antes de usá-las, o eluente foi filtrado a vácuo em membrana de éster de celulose ($0,45\ \mu\text{m}$ de poro, 47 mm de diâmetro – Millipore). Simultaneamente, o eluente foi degaseificado em banho de ultrassom (Thorton) por 25 minutos (RODRIGUES et al., 2005).

3.4.1 Quantificação dos açúcares

As condições da cromatografia foram: coluna Bio Rad Aminex HPX-87H ($300 \times 7,8\ \text{mm}$), temperatura da coluna de 45°C , temperatura do detector 35°C , detector do índice de refração Waters 410, eluente (solução de H_2SO_4 0,005 M, fluxo de $0,6\ \text{mL/min}$), volume da amostra injetada de $20\ \mu\text{L}$.

As condições de hidrólises em diferentes microalgas foram baseadas na literatura e a análise foi feita com a mesma concentração de ácido para diferentes microalgas a fim de comparação do nível de açúcar liberado para a fermentação.

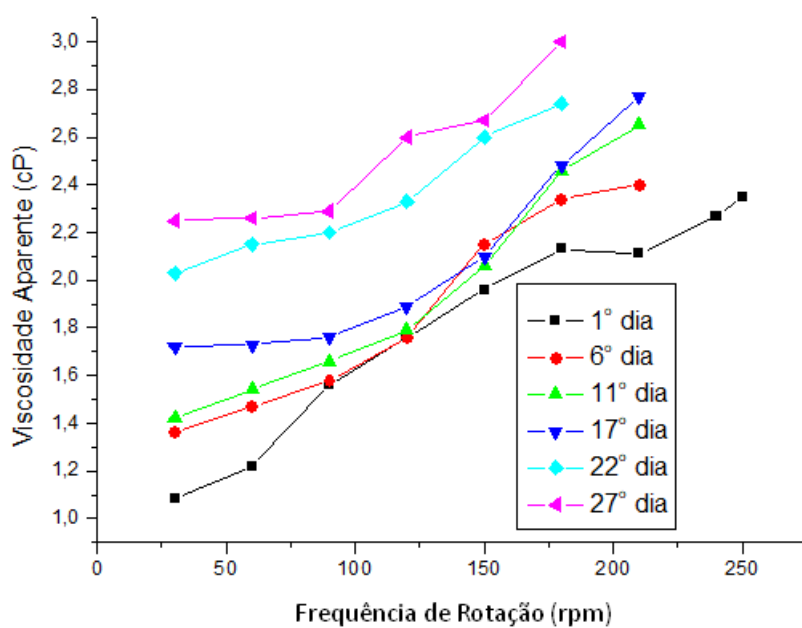
Para as espécies de microalgas utilizadas no presente trabalho, foi utilizado uma concentração de ácido sulfúrico 2N e uma concentração de 1:16 por biomassa seca. A biomassa seca (g) da microalga *Scenedesmus obliquus* foi de 1,4; da *Chlorella minutissima* foi de 1,7; da *Spirulina maxima* foi de 2,5 g e da *Chlorella vulgaris*, 1,1.

4 RESULTADOS

4.1. Reologia

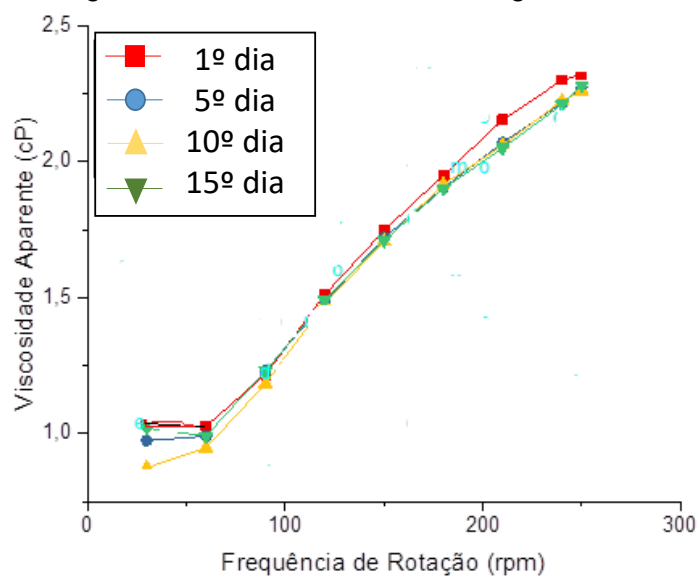
Os gráficos da viscosidade aparente em função da frequência de rotação (proporcional à taxa de deformação) obtidos em diferentes tempos de cultivo, para as diferentes microalgas, encontram-se nas Figura 9 a 12.

Figura 7 - Reograma do cultivo da *Chlorella* sp



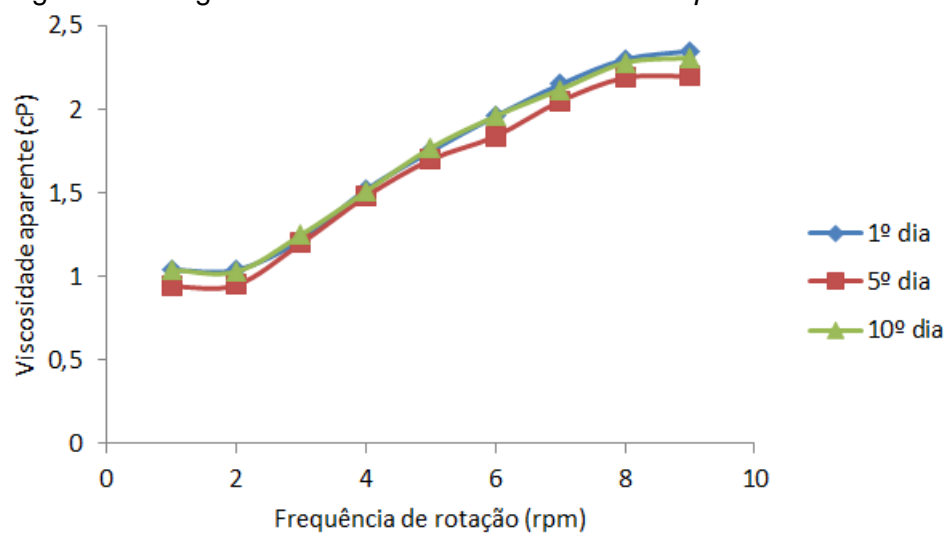
Fonte: o autor.

Figura 8 - Reograma do cultivo da *Chlorella vulgaris*



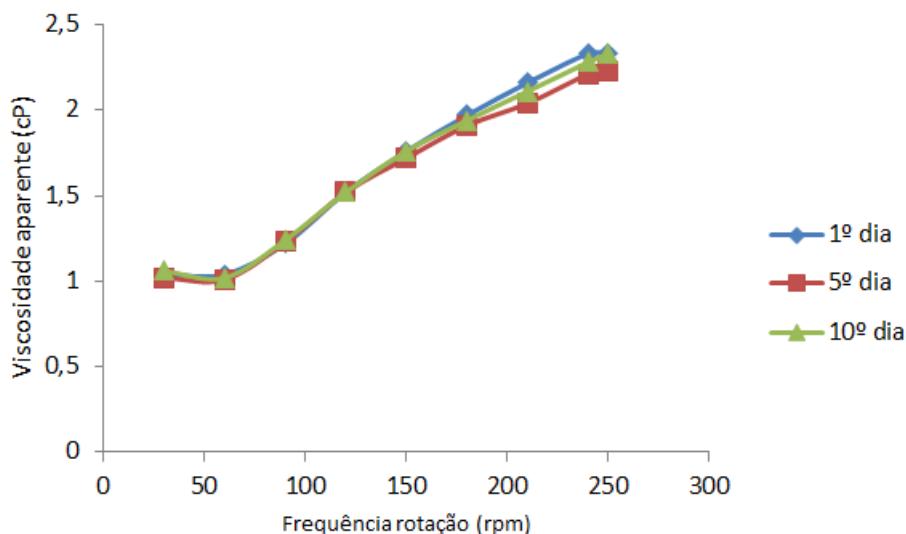
Fonte: COSTA et al. (2018)

Figura 9 - Reograma do cultivo da *Scenedemus obliquus*



Fonte: o autor.

Figura 10 - Reograma do cultivo da *Spirulina maxima*



Fonte: o autor.

Analisando as figuras de 9 a 12 observa-se que, ao longo de todo o tempo de cultivo, tanto todas as espécies apresentaram comportamento reológico de fluido dilatante, caracterizado pelo aumento da viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação. Esse tipo de comportamento se justifica-se pelo fato das mesmas apresentarem partículas celulares com dimensões em torno de $1,0 \mu\text{m}$. Segundo Barnes et al (1989), suspensões com partículas de dimensões superiores a 10^{-4} cm tendem a comportar-se como um fluido dilatante visto que à medida que a tensão de cisalhamento aumenta, o líquido intersticial que lubrifica a fricção entre as partículas é incapaz de preencher os espaços, devido a um aumento no volume que frequentemente acompanha o fenômeno, ocorrendo contato direto entre as partículas sólidas, fazendo com que a viscosidade aparente aumente.

No entanto, o tempo de processamento exerceu certa influência no valor da viscosidade da suspensão da microalga *Chlorella sp.*; ou seja, por volta do 17º dia de cultivo, o comportamento reológico da biomassa tende ao newtoniano, visto que foi observado considerável decréscimo do coeficiente angular do reograma. Já para as demais espécies não se observou tal efeito do tempo na viscosidade do cultivo, o que pode ser justificado pela configuração das células algais suspensas: no caso da *Chlorella sp* tais células encontram-se isoladas (sedimentando-se mais rapidamente), no caso das demais (*Chlorella*

vulgaris, *Scenedemus obliquus* e *Spirulina máxima*) as mesmas encontram-se agrupadas.

Analisando as Tabelas de 2 a 5, estas apresentam os valores dos parâmetros obtidos através do ajuste dos modelos de Bingham ($\dot{\gamma} = K_C + K_{OC}$), Casson ($\tau^{1/2} = K_{OC} + K_C \cdot \dot{\gamma}^{1/2}$) e Lei da Potência ($\eta_a = \tau / \dot{\gamma} = K \cdot (\dot{\gamma})^{n-1}$), de acordo com o tempo, respectivamente, para a *Chlorella sp*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedemus obliquus* e *Spirulina máxima*. Nestas tabelas, cada parâmetro corresponde ao valor da média da triplicata dos valores nos diferentes tempos de cultivo, onde: $\eta \Rightarrow$ Viscosidade Plástica (cP); $\tau_0 \Rightarrow$ Tensão inicial (dyne/cm²); $K_C \Rightarrow$ Viscosidade Plástica de Casson (cP); $K_{OC} \Rightarrow$ Tensão inicial de Casson (dyne/cm²); $n \Rightarrow$ índice de comportamento; $K \Rightarrow$ índice de consistência (cP).

Tabela 1 - Dados reológicos da *Chlorella sp*

Dias de cultivo	Bingham			Casson			Potência		
	η	τ_0	r^2	K_C	K_{OC}	r^2	n	K	r^2
1	2,25	0	0,97	3,03	0,41	0,98	1,43	0,16	0,99
2	2,72	0	0,96	3,65	0,50	0,98	1,43	0,20	0,99
3	2,63	0	0,95	3,49	0,44	0,98	1,40	0,22	0,99
4	2,72	0	0,96	3,56	0,42	0,97	1,37	0,27	0,99
5	2,80	0	0,96	3,65	0,40	0,97	1,36	0,30	0,99
6	2,88	0	0,97	3,74	0,32	0,97	1,36	0,32	0,99
7	2,95	0	0,95	4,14	0,64	0,97	1,51	0,14	0,99
8	2,94	0	0,95	4,12	0,63	0,98	1,51	0,13	0,99
9	3,06	0	0,95	4,23	0,63	0,97	1,48	0,16	0,99
10	3,06	0	0,96	4,18	0,59	0,98	1,46	0,19	0,99
11	3,09	0	0,96	4,07	0,50	0,98	1,39	0,28	0,99
12	3,08	0	0,96	4,07	0,51	0,97	1,4	0,27	0,99
13	3,15	0	0,96	4,07	0,47	0,97	1,36	0,33	0,99
14	3,21	0	0,96	4,14	0,49	0,97	1,35	0,35	0,99
15	3,22	0	0,96	4,08	0,43	0,97	1,32	0,42	0,99
16	3,18	0	0,96	3,87	0,39	0,97	1,30	0,46	0,99
17	3,20	0	0,97	3,93	0,35	0,98	1,27	0,55	0,99
18	3,20	0	0,97	3,94	0,35	0,98	1,28	0,55	0,99

Continuação

19	2,96	0	0,96	3,34	0,16	0,97	1,14	1,08	0,99
20	3,20	0	0,96	3,56	0,15	0,97	1,12	1,32	0,99
21	3,23	0	0,97	3,57	0,13	0,98	1,11	1,42	0,99
22	3,20	0	0,96	3,49	0,11	0,97	1,09	1,58	0,99
23	3,20	0	0,96	3,46	0,10	0,97	1,09	1,64	0,99
24	3,18	0	0,96	3,41	0,09	0,97	1,08	1,73	0,99
25	3,17	0	0,96	3,40	0,09	0,97	1,07	1,75	0,99
26	3,16	0	0,97	3,35	0,07	0,97	1,06	1,94	0,99
27	3,13	0	0,96	3,21	0,04	0,97	1,02	2,38	0,99

Fonte: COSTA et al. (2018)

Tabela 2 – Dados reológicos da *Chlorella vulgaris*

Dias de cultivo	Bingham			Casson			Potência		
	η	τ_0	r^2	η	τ_0	r^2	n	K	r^2
1	2,66	0	0,97	3,62	0,52	0,98	1,46	0,16	0,98
2	2,59	0	0,97	3,51	0,49	0,98	1,44	0,17	0,99
3	2,52	0	0,98	3,42	0,46	0,98	1,45	0,17	0,99
4	2,47	0	0,98	3,39	0,48	0,98	1,47	0,15	0,99
5	2,52	0	0,98	3,39	0,44	0,98	1,43	0,18	0,99
6	2,56	0	0,98	3,48	0,48	0,98	1,45	0,17	0,99
7	2,54	0	0,97	3,37	0,42	0,98	1,41	0,21	0,99
8	2,56	0	0,98	3,45	0,46	0,98	1,43	0,19	0,98
9	2,56	0	0,98	3,49	0,49	0,98	1,46	0,16	0,99
10	2,57	0	0,98	3,46	0,46	0,98	1,43	0,18	0,99
11	2,57	0	0,98	3,48	0,47	0,98	1,44	0,17	0,99

Fonte: COSTA et al. (2018)

Tabela 3 - Dados reológicos da *Scenedesmus obliquus*

Dias de cultivo	Bingham			Casson			Potência		
	η	τ_0	r^2	η	τ_0	r^2	n	K	r^2
1	2,63	0	0,97	3,56	0,49	0,98	1,44	0,18	0,99
2	2,56	0	0,98	3,45	0,45	0,98	1,43	0,18	0,99
3	2,53	0	0,98	3,43	0,47	0,98	1,44	0,17	0,99
4	2,5	0	0,98	3,41	0,47	0,98	1,46	0,16	0,99
5	2,48	0	0,98	3,39	0,47	0,98	1,46	0,15	0,99
6	2,57	0	0,98	3,47	0,46	0,98	1,43	0,18	0,99
7	2,57	0	0,97	3,45	0,46	0,98	1,43	0,18	0,99
8	2,54	0	0,98	3,45	0,47	0,98	1,45	0,17	0,99
9	2,54	0	0,98	3,46	0,48	0,98	1,46	0,16	0,99
10	2,6	0	0,98	3,5	0,46	0,98	1,43	0,18	0,99
11	2,53	0	0,98	3,44	0,47	0,98	1,45	0,17	0,99

Fonte: o autor.

Tabela 4 – Dados reológicos da *Spirulina maxima*

Dias de cultivo	Bingham			Casson			Potência		
	η	τ_0	r^2	η	τ_0	r^2	n	K	r^2
1	2,64	0	0,97	3,58	0,49	0,98	1,44	0,18	0,99
2	2,57	0	0,98	3,8	0,73	0,99	1,65	0,06	0,99
3	2,53	0	0,98	3,4	0,43	0,98	1,43	0,19	0,99
4	2,47	0	0,98	3,37	0,47	0,98	1,46	0,15	0,99
5	2,5	0	0,98	3,35	0,43	0,98	1,43	0,19	0,99
6	2,51	0	0,98	3,92	0,97	0,98	1,45	0,16	0,99
7	2,6	0	0,98	3,51	0,47	0,98	1,44	0,18	0,99
8	2,5	0	0,98	3,39	0,45	0,98	1,44	0,17	0,99
9	2,51	0	0,98	3,43	0,48	0,98	1,46	0,15	0,99
10	2,6	0	0,97	3,49	0,46	0,98	1,43	0,19	0,98
11	2,53	0	0,98	3,41	0,45	0,98	1,43	0,18	0,99

Fonte: o autor.

Analizando as tabelas de 2 a 5 pode-se observar que os três modelos reológicos proporcionaram bons parâmetros de ajuste, apresentando elevados para o coeficiente de determinação (r^2), além de reforçarem o que foi concluído nas Figuras 9 a 12, de que todas as espécies microalgais analisadas comportaram-se como um fluido dilatante (devido ao índice de comportamento resultante ser maior que 1).

Os resultados da Tabela 2 também apontam que a suspensão da micoralgia *Chorella sp* tende a se comportar como um fluido newtoniano com o tempo, devido ao decréscimo no valor de índice de comportamento (n) e na tensão inicial de Casson. Tal tendência torna-se mais evidente a partir do 19º dia de cultivo. Os resultados estão coerentes com Wileman et al. (2012) ao analisarem as propriedades reológicas das suspensões de microalgas *Chlorella vulgaris*, em função da concentração de biomassa, constatando comportamento não newtoniano em concentrações inferiores acima de 20 kg/m³ (no presente trabalho, o cultivo já estava com concentração superior a esta já no primeiro dia de cultivo).

De acordo com os resultados das Tabelas 3, 4 e 5 foram observadas pequenas oscilações nos valores do índice de comportamento e da tensão inicial de Casson, o que pode ser justificado pela configuração das células suspensas, com possíveis agregação e posterior sedimentação das mesmas.

4.2 Hidrólise e quantificação dos açúcares

As microalgas foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 2N na proporção de 1:16 gerando açúcares indicados na Tabela 6. Após a hidrólise da biomassa, foi feita a leitura do teor de açúcares no cromatógrafo líquido Watters.

Tabela 5 - Quantificação de açúcares em diferentes espécies de microalgas

Amostra	Teor de umidade (%)	Biomassa Seca (g)	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Arabinose (g/L)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares totais por biomassa seca (g/L por L)
A	4,4	1,4	3,73	6,12	--	9,85	7,03
B	2,8	1,7	6,85	2,42	--	9,27	5,45
C	--	2,5	--	21,86	--	21,86	8,744
D	--	1,1	2,17	18,00	2,09	22,26	20,23

Fonte: o autor

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, observa-se que a microalga *Chlorella vulgaris* (amostra D), produziu maior quantidade de açúcares fermentáveis por grama de biomassa seca. Ou seja, a amostra D produziu 22,26 g/L a partir de 1,1 g de biomassa seca inicial resultando em 20,23 g/L de açúcares; já as outras amostras, produziram uma menor quantidade de açúcares por grama de biomassa seca. Esse resultado está de acordo com Souza (2018), ao constatar 84% de eficiência na obtenção de carboidratos da *Chlorella vulgaris*, a partir da hidrólise ácida.

Por outro lado, Klein (2013) obteve a concentração de açúcares fermentáveis à concentração de até 2 g/L. Uma possível explicação para essas diferenças de resultados seria a condição de baixo teor de nitrogênio usado pelo autor durante o cultivo. Outro fator que poderia ter influenciado na composição da biomassa, é a configuração do reator. No atual trabalho foi utilizado um reator do tipo coluna de bolhas, enquanto Klein (2013) utilizou um reator de placas planas.

5 CONCLUSÃO

Diferentes cultivos microalgais geraram diferentes quantidades de açúcares fermentáveis. O cultivo de cada microalga foi determinante na concentração de açúcar. Conclui-se que, após testes em cada meio de cultivo, é possível manipular a quantidade dos reagentes no meio de cultivo a fim de promover uma maior concentração de biomassa e, conseqüentemente, uma hidrólise com melhor custo-benefício.

Os diferentes tipos de hidrólise devem ser estudados, pois já se sabe que a hidrólise ácida é eficiente, mas deve ser rigidamente controlada visto que ela pode degradar os açúcares e gerar reações secundárias indesejáveis durante a reação. Já a hidrólise enzimática não gera reações secundárias, no entanto esta tem um custo mais elevado e, por se tratar de um processo biológico, é necessário o controle do pH, temperatura e outros fatores que podem desbalancear o processo biológico.

Dessa forma, após as análises e os testes laboratoriais, o meio de cultivo Meio Bold Basal (BBM) é um fator que propiciou o crescimento e a concentração eficiente da microalga *Chlorella vulgaris*. Isso promoveu uma eficiente hidrólise ácida e, em um futuro projeto, pode-se testar a hidrólise enzimática e possíveis modificações no meio e na forma de cultivo a fim de otimizar ainda mais o processo.

6 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

A hidrólise ácida foi o suficiente para degradar a parede celular de toda a biomassa seca, mostrando que o resultado obtido foi satisfatório para uma análise de pequena escala. Porém, por ser em pequena escala, o resultado não foi o suficiente para realizar a fermentação. Dessa forma, alguns fatores foram avaliados para gerar uma maneira mais eficaz de conseguir uma quantidade maior de açúcares:

- Manipulação dos reagentes do cultivo de modo que intensifique a concentração da biomassa;
- Escolha do reagente mais adequado para o pré-tratamento sem que haja degradação dos açúcares;
- Escolha da fermentação mais efetiva para cada tipo de microalga;
- Verificar a disponibilidade e o custo benefício de cada modelo de fermentação.

Em suma, há diversos parâmetros que precisam ser analisados para que a fermentação seja mais eficaz.

REFERÊNCIAS

ANDRIETTA, M. D. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol–Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multi-Ciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, Campinas, v. 7, p. 1–16, 2006.

REIS DE ARAÚJO, Camila, et al. ESTUDO DAS ROTAS DE HIDRÓLISE QUÍMICA E BIOLÓGICA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS. **Seminário Estudantil de Produção Acadêmica**, Rio de Janeiro, 2013.

BENNEMANN, J.; OSWALD, W.J. **Systems and Economic Analysis of Microalgal Ponds for Conversion of CO₂ to Biomass**. Department of Energy, p. 201, 1996.

BOLHOUSE, A. M. **Rheology of Algae Slurries**. 2010. Thesis (Master of Science in Engineering) - University of Texas, Austin, 2010.

BOURNE, M.C. **Food texture and viscosity: concept and measurement**. Academic Press, New York, 1982.

BRASIL, B. Microalgas: a 3ª geração de biocombustíveis no Brasil. **Embrapa Agroenergia-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2014.

CARDOSO, A. da S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, 2011.

CARVAJAL, J. C. L. **Microalgae: Proteins; Functional properties; Chemical modifications**. 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Química e Bioquímica de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

CLEMENTI, F.; MORESIH, M. Rheology of alginate from *Azotobacter vinelandii* in queous dispersion. **Journal of Food Engineering**, California, p. 51-62, 1998.

COSTA, I. L. et al. **DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS DE MICROALGAS CHLORELLA (sp e vulgaris)**. 2018. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Engenharia Química, São Paulo, 2018.

COSTA, J. A. V. et al. **Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas Chlorella vulgaris e Chlorella minutissima Cultivadas em Diferentes Condições**. Araraquara: Alim. Nutr., v. 17, n. 4, p. 429–436, 2006.

EUCLIDES, T. M. DE. **Seleção e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas**. 2013, p. 101. Tese (Dissertação em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

FURTADO, A. T. et al. Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, Campinas, 2009.

GUIMARÃES, D.; SILVA, M.; LOURES, C. **Chlorella sp Microalgae Suspensions—Rheological Behaviour Analyzes at Different Culture Times**. Disponível em: <http://www.preprints.org/manuscript/201608.0041/v1>. Acesso em: 31 out. 2016.

HOLDSWORTH, S.D. Applicability of rheological models to the interpretation of low and processing behaviour of fluid products. **Journal of Texture Studies**, Nova Jersey, 1971.

IBP. **Evolução da produção de energia primária no Brasil**. Disponível em: <https://www.ibp.org.br/observatorio-do-setor/producao-de-energia-primaria-brasil/>. Acesso em: 12 out. 2019.

JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Mico and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource technology**, p. 186-193, 2011.

JUNIOR, R. **Combustíveis fósseis são maiores responsáveis pelo efeito estufa**. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/informma/item/4125-combustiveis-fosseis-sao-maiores-responsaveis-pelo-> . Acesso em: 12 out. 2019.

KLEIN, B. C. **Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração**. p. 106, 2013. Tese (Dissertação em Desenvolvimento de Processos Químicos) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

KUMAR, B. P. et al. TropFlux: air-sea fluxes for the global tropical oceans—description and evaluation. **Climate Dynamics**, v. 38, n. 7-8, p. 1521-1543, 2012.

LEONARDI, G.R.; CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal of Pharmaceutical Compound**, p. 154-156, 2001.

LIRA, R.A. **Estudo do rendimento de biomassa da microalga nativa *Chlorella* sp visando a obtenção de biocombustíveis**. 119f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas**. São Carlos: RiMa. 2006.

LÚCIO, M. J. **Cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* com efluente doméstico como meio de cultura alternativo**. 2014. 71 p. Monografia (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MAGRO, F. G. et al. Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: Uma Revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 37, n. 1, p. 159, 2016.

MARINO, V. F. **Análises dos parâmetros de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris***. 2018. Tese (Dissertação em Desenvolvimento de Produtos e Processos). Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

MATHIMANI, Thangavel; UMA, Lakshmanan; PRABAHARAN, Dharmar. Homogeneous acid catalysed transesterification of marine microalga *Chlorella* sp. BDUG 91771 lipid—an efficient biodiesel yield and its characterization. **Renewable energy**, v. 81, p. 523-533, 2015.

MELO, P. C. L. Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE)**, Brasília, 2009.

MIRANDA, João Ricardo Pereira de Cabral. **Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus***. 2011. Tese (Mestrado em Energia e Bioenergia). Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, 2011.

MORAES, G. S. C. **Produção de biomassa algal e extração de óleo a partir da microalga *Chlorella Vulgaris***. v. 15, n. 2, 2018. Tese (Dissertação em Engenharia de Produção) – Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2018.

MULITERNO, Adriana et al. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n.6, p. 1132-1138, nov/dez, 2005.

NEOFOTIS, Peter et al. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. **Algal research**, v. 15, p. 164-178, 2016.

ORTENZIO, Y. T. et al. Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. **Bioenergia Em Revista**, p. 58–65, 2015.

PALOMINO, R. L. Q. **Desenvolvimento de sistemas eletrônicos para operação e monitoramento de parâmetros envolvidos na produção de biomassa a partir de microalgas em fotobiorreatores**. 2017. Tese (Dissertação em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2017.

PEREIRA, Claudio MP et al. Biodiesel derived from microalgae: advances and perspectives. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

POHNDORF, Ricardo S. et al. Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. **Biomass and bioenergy**, v. 93, p. 25-32, 2016.

PRAGYA, Namita; PANDEY, Krishan 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.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609–1612, 2008.

RAMIREZ, N. N. V. **Estudo Do Crescimento Da Microalga *Scenedesmus* Sp. em Vinhaça**. p. 87, 2013. Tese (Dissertação em Desenvolvimento de Processos) – Escola de Engenharia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

RICHMOND, A. et al. (Ed.). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Oxford: Blackwell Science**, 2004.

SANTOS, G. M., et al. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina* máxima em duas temperaturas – Parte I: Alteração da composição da biomassa. **Food Science and Tchnology**, 2003.

SANTOS, M. DE O. **Comportamento reológico e viabilidade celular de cultivos da microalga *Scenedesmus acuminatus* submetidos a tensões hidrodinâmicas**. 2012. Tese (Dissertação em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

SANTOS, N. O. DOS. **Produção De Biogás A Partir De Biomassa Da Microalga *ISOCHRYSIS GALBANA***. 2013. Tese (Dissertação em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SCHENK, P. M. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy research**, v. 1, n. 1, p. 20-43, 2008.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações Ambientais De Microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 48–60, 2012.

SCHRAMM, G. Introduction to Practical Viscometry. **Germany: Gebrueder H.**, p. 116, 1981.

SCRAGG, A. H. et al. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 1, p. 67-73, 2002.

SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UDESC, 25, [s.d.], Santa Catarina. **CULTIVO DE *Chlorella sp.* – UTILIZAÇÃO DE FERTILIZANTES AGRÍCOLAS COMERCIAIS PARA ELABORAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA**. Santa Catarina: UDESC, [s.d.]

SHAMLOU, P. Ayazi; TITCHENER-HOOKER, N. Turbulent aggregation and breakup of particles in liquids in stirred vessels. **Processing of Solid-Liquid Suspensions**, v. 1, p. 1-25, 1993.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. **Advancements in development and characterization of biodiesel: a review**. **Fuel**, v. 87, n. 12, p. 2355-2373, 2008.

SINGH, N. K.; DHAR, D. W. Microalgae as second generation biofuel. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, n. 4, p. 605-629, 2011.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; PELICIONI, L. C.; OLIVERA, A. Use of inorganic (NPK) and the CHU12 medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. **Brazilian Journal of Ecology**, v. 1, n. 1, p. 10-15, 1999.

SOUZA, M. P. DE et al. As Microalgas Como Uma Alternativa Para a Produção De Biocombustíveis Parte I : Bioetanol. **Tecno-Lógica**, v. 16, n. 2, p. 108–116, 2012.

SOUZA, R. R. **HIDRÓLISE ÁCIDA E EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS DE CHLORELLA VULGARIS**. 2018. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Engenharia Química, São Paulo, 2018.

STAKE, L. **Reologia dos fluidos**. Caxias do Sul, Universidade de Caxias do Sul, 2016.

VIEIRA, T. D. Q. et al. Estudo Da Viabilidade Do Uso De Resíduos Líquidos No Cultivo Da Microalga *Chlorella Sp* Visando a Produção De Biocombustíveis. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 4, p. 3477.

VINHAL, P. H. G. et al. **DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS DA SUSPENSÃO DA MICROALGA CHLORELLA SP** 2015.

Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, São Carlos, 2015.

VISSER, E.M. **Studies on the production of bioethanol using Jatropha Curcas Biomass, a coproduct of the biodiesel production process.** Tese (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

WILEMAN, A.; OZKAN A; BERBEROGLU, H. Rheological properties of algae slurries for minimizing harvesting energy requirements in biofuel production. **Bioresourse Technology**, p. 432-439, 2012.

ZHU, L; HILTUNEN, E; SHU, Q. ZHOU, W; LI, Z; WANG, Z. **Biodiesel production from algae cultivated in winter with artificial wastewater through pH regulation by acetic acid.** Applied Energy, 128:103-110, 2014.