

## Potencial para produção de biodiesel de algas verdes da ordem *Chlorellales* cultivadas em meio de baixo custo Blue Green Nitrogen Mix (BGNIM)

**Dágon Manoel Ribeiro** (UnB/Embrapa Agroenergia. dagonribeiro@hotmail.com), Lorena Costa Garcia (Embrapa Agroenergia. lorena.garcia@embrapa.br), Letícia Jungmann Cançado (Embrapa Agroenergia. leticia.jungmann@embrapa.br), Thomas Christopher Rhys Williams (UnB. tcrwilliams@unb.br), Luiz Fernando Roncaratti (UnB. roncaratti@fis.unb.br), Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil (Embrapa. bruno.brasil@embrapa.br).

**Palavras Chave:** *microalgas*

### 1 - Introdução

A geração de biomassa é uma ação chave para prover a segurança alimentar e energética de um país, devido ao aumento dos riscos associados às mudanças climáticas, aos conflitos geopolíticos e a dependência de combustíveis fósseis. Neste contexto, as microalgas se destacam dentre as diferentes opções de biomassas devido a suas características biológicas e seu grande potencial em aplicações biotecnológicas (Deprá et al., 2018). Além disso, possuem grandes possibilidades de inserção na bioeconomia, e pontualmente no setor bioenergético contribuir como insumo nas lavouras, na produção de óleos, e proteínas e na redução das emissões de gases de efeito estufa (GHG) (Turon, 2013; Pires, 2017; Ribeiro et al., 2019). Moody e colaboradores (2014) estimaram que a utilização de 16% das terras não aráveis do Brasil para a produção de microalgas possibilitaria suprir 30% dos combustíveis utilizados em transporte no país.

Desde os primeiros trabalhos publicados sobre a produção de microalgas, os resultados do relatório final do Departamento de Energia dos Estados Unidos da América mostram a microalga *Chlorella* da ordem *Chlorellales*, como a mais indicada para produção de biocombustíveis e bioprodutos em larga escala (Burlew, 1953; NAABB, 2014). Em razão desse potencial, o Brasil por sua imensa biodiversidade tem grande oportunidade de bioprospectar micro-organismos para aplicações industriais, e estudos de produtividade de biomassa e a caracterização dos óleos das microalgas isoladas e identificadas em diferentes regiões do país. Essa bioprospecção é uma ação direta para possibilitar a promoção da inovação que gera desenvolvimento de uma indústria alinhada com os objetivos sustentáveis propostos pela ONU (General Assembly of the United Nations, 2015; Hadi et al., 2016; Zhang et al., 2019).

O objetivo desse trabalho foi quantificar a produtividade de biomassa de quatro algas verdes da ordem *Chlorellales* isoladas em diferentes regiões do Brasil, e cultivadas em sistema com e sem aeração, bem como caracterizar seus conteúdos em ácidos graxos e estimar seus potenciais para a produção de biodiesel.

### 2 - Material e Métodos

Neste experimento, foram avaliadas quatro algas verdes da ordem *Chlorellales* isoladas de diferentes regiões do Brasil identificadas por Hadi et al., (2016), mantidas na Coleção de Microrganismos e Microalgas para Agroenergia e Biorrefinarias da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Brasília-DF) de acordo com o protocolo descrito por Fernandes et al., (2019). As

microalgas selecionadas foram, *Chlorella* sp. MAT- 2008<sup>a</sup> - LBA#29 (isolada na região da Mata Atlântica), *Micractinium* sp. CCAP 211/92 - LBA#32, (isolada na região da Amazônia), *Chlorella sorokiniana* KU207 LBA#39 (isolado na região do Cerrado) e *Chlorella* sp. KMMCC 1468 - LBA#50 (isolado na região do Pantanal).

Os cultivos foram realizados em sistema com aeração e sem aeração. No sistema com aeração (CA), as microalgas foram cultivadas em frascos erlenmeyer de 500 mL com volume de trabalho de 350 mL, mantidos sob aeração externa constante, com fluxo de 6 L/h. No sistema sem aeração (SA), as microalgas foram cultivadas em erlenmeyer de 250 mL com volume de trabalho de 150 mL mantidos em agitador orbital rotativo a 150 rpm. Ambos os sistemas foram mantidos durante 30 dias sob fotoperíodo de 12h / 12h com 40 lux e temperatura constante a  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

O meio utilizado foi "Blue Green Nitrogen Mix", meio de baixo custo desenvolvido por pesquisadores da EMBRAPA, composto por 510 mg/L de Ureia, 35 mg/L de Fosfato Monoamônico, 75 mg/L de Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado, 40 mg/L de Nitrato de Cálcio e 100 mg/L de mix de micronutrientes (REXOLIN, YaraTera). A composição elementar é semelhante ao tradicional meio BG11, de maior custo, por ser feito com produtos com pureza analítica.

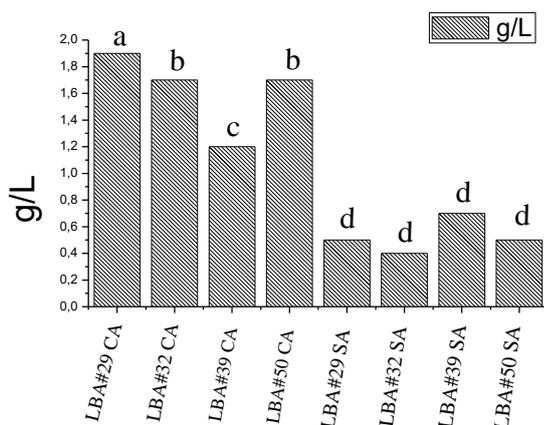
Ao final do cultivo a biomassa final foi coletada e utilizada para os cálculos de produtividade. As análises de determinação do perfil de ácidos graxos da biomassa de cada tratamento foram feitas seguindo o protocolo prescrito pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável dos Estados Unidos (NREL) (Van Wychen et al., 2013).

Os dados da biomassa e dos ácidos graxos produzidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com 5% de probabilidade, seguida de teste de Tukey, utilizando o software Action Stat v. 3.5.

### 3 - Resultados e Discussão

Após 30 dias de cultivo, observou-se que a microalga *Chlorella* sp. MAT- 2008<sup>a</sup> - LBA#29 cultivada no sistema com aeração constante, atingiu 1,9 g/L com base no peso seco (Figura 1), seguida pela LBA#32 e LBA#50, ambas com 1,7 g/L e a LBA#39 produziu 1,2 g/L. No sistema sem aeração constante, foi observado menor acúmulo de biomassa entre as espécies testadas, com variação de produção de biomassa seca entre 0,4 g/L a 0,7 g/L que não apresentou diferença significativa.

**Figura 1.** Biomassa final acumulada pelas microalgas cultivadas no meio BGNIM nos sistema com aeração (CA) e o sistema sem aeração (AS).



Independente da concentração de CO<sub>2</sub> no ar ser de 0,04%, os resultados mostram que a aeração constante do meio de crescimento é suficiente para aumentar a produtividade de biomassa destas microalgas, neste caso em cerca de 4 vezes.

A diferença dos sistemas com e sem aeração influenciaram no perfil de ácidos graxos das microalgas testadas (Figura 2). No sistema com aeração (CA) as microalgas LBA#39 e LBA#50 obtiveram diferença significativa no acúmulo do ácido graxo Alpha-Linolenico, seguido pelas microalgas LBA#29 e LBA#32, as microalgas quando cultivadas no sistema sem aeração obtiveram menor fração nesse ácido poli-insaturado. Por outro lado, observou-se que no sistema sem aeração (SA) a maior fração identificada foi do ácido palmítico, tendo a LBA#50 como a microalga que atingiu a maior fração desse ácido graxo.

**Tabela 1.** Produtividade de biomassa, de ácidos graxos e de litros de biodiesel das diferentes microalgas cultivadas em meio BGNIM.

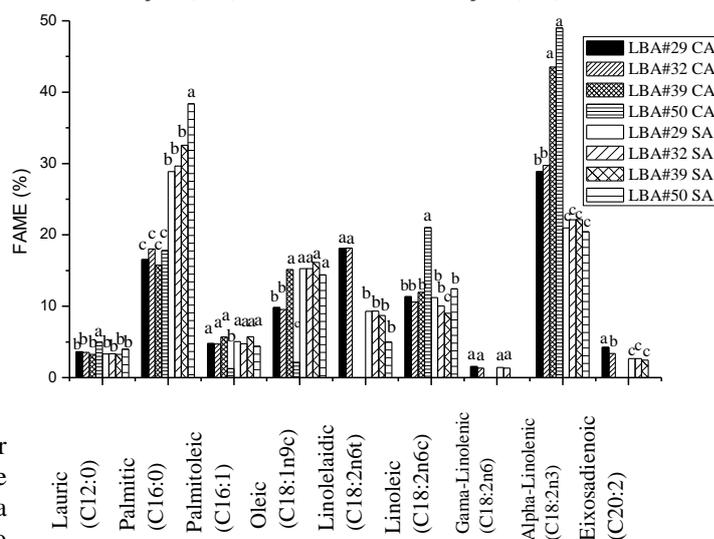
Microalgas	Produtividade (mg/L/d)	Produtividade t/ha/ano <sup>a</sup>	FAME %	FAME t/ha/ano <sup>a</sup>	Biodiesel L/ha/ano <sup>b</sup>
LBA 29 A	63,33	3,04	10,18 ab	0,309	309,47
LBA 32 A	56,66	2,72	10,84 a	0,295	294,84
LBA 39 A	40	1,92	10,75 a	0,206	206,4
LBA 50 A	56,66	2,72	8,55 abc	0,232	232,56
LBA 29 S	16,66	0,8	7,35 bc	0,059	58,8
LBA 32 S	13,33	0,64	7,71 bc	0,050	49,34
LBA 39 S	23,33	1,12	7,15 cd	0,080	80,08
LBA 50 S	16,66	0,8	4,28 d	0,034	34,24

<sup>a</sup>Estimativa da produção anual considerando 200 m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> com 240 dias de funcionamento por ano (Cabanelas et al., 2013),

<sup>b</sup>Estimativa com base na taxa de conversão de 1 kg de ácido graxo em 1 kg de biodiesel (Cabanelas et al., 2013).

A maior quantidade de ácidos graxos foi identificada nas culturas com aeração constante, e entre as microalgas testadas os melhores resultados foram encontrados na *Chlorellas* LBA 29, 32 e 39, com em média de 10% (p/p) de ácidos graxos acumulados. É possível observar que a aeração também é um fator que influencia diretamente no acúmulo de ácidos graxos, e que existe diferença na produtividade da fração lipídica nas diferentes *Chlorellas* testadas.

**Figura 2.** Perfil de ácidos Graxos (FAME) acumulados pelas microalgas cultivadas no meio BGNIM nos sistema com aeração (CA) e o sistema sem aeração (AS).



Usando-se os dados de produtividade da biomassa algal e seus perfis de ácidos graxos, foi estimada por extrapolação a produtividade anual de biomassa e de biodiesel, seguindo as orientações de Cabanelas et al., (2013), considerando-se produtividade de biomassa em cultivo de 200 m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> com 240 dias úteis por ano e a produção de biodiesel com base na taxa de conversão de 1 kg de ácido graxo para 1 kg de biodiesel. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 1.

A produção de biodiesel a partir de biomassa algal oferecem oportunidades de: (i) diversificar as fontes de substratos para a produção de biocombustível; (ii) desenvolver a substituição a longo prazo de combustíveis fósseis; (iii) reduzir a emissão de gases de efeito estufa; e (iv) integrar indústrias já existentes (Brasil et al., 2017; Odjadjare et al., 2017).

#### 4 – Conclusões

Em conclusão, com base nas medições da produção de biomassa e acúmulo de ácidos graxos, a microalga *Chlorella* sp. MAT- 2008ª - LBA#29, cultivada no sistema com aeração (CA), em meio de fertilização BGNIM mostrou ser a microalga mais promissora para a produção de biodiesel, pois obteve a maior produtividade de biomassa e ácidos graxos, e com uma estimativa de produção de mais 300 litros de Biodiesel por ha/ano.

#### 5 – Agradecimentos

Universidade Brasília, Embrapa Agroenergia, CNPq, Capes, FAPDF e Finep

#### 6 - Bibliografia

- Brasil BSAF, Silva FCP, Siqueira FG** (2017) Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. *N Biotechnol* **39**: 90–98
- Burlew JS** (1953) Current status of the large-scale culture of algae.
- Cabanelas ITD, Arbib Z, Chinalia FA, Souza CO, Perales JA, Almeida PF, Druzian JI, Nascimento IA** (2013) From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. *Appl Energy* **109**: 283–290
- Deprá MC, dos Santos AM, Severo IA, Santos AB, Zepka LQ, Jacob-Lopes E** (2018) Microalgal Biorefineries for Bioenergy Production: Can We Move from Concept to Industrial Reality? *Bioenergy Res* **11**: 727–747
- Fernandes MS, Calsing LCG, Nascimento RC, Santana H, Moraes PB, de Capdeville G, Brasil BSAF** (2019) Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology. *Algal Res* **38**: 101402
- General Assembly of the United Nations** (2015) Resolution adopted by the General Assembly on 25 September 2015. **16301**: 1–35
- Hadi SIA, Santana H, Brunale PPM, Gomes TG, Oliveira MD, Matthiensen A, Oliveira MEC, Silva FCP, Brasil BSAF** (2016) DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS One* **11**: 1–18
- Moody JW, McGinty CM, Quinn JC** (2014) Global evaluation of biofuel potential from microalgae. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 8691–8696
- NAABB** (2014) National Alliance for Advanced Biofuels and Bio-products (NAABB) Synopsis. United States Dep Energy; Off Energy Effic Renew Energy; Natl Alliance Adv Biofuels Bio-products 150
- Odjadjare EC, Mutanda T, Olaniran AO** (2017) Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. *Crit Rev Biotechnol* **37**: 37–52
- Pires JCM** (2017) COP21: The algae opportunity? *Renew Sustain Energy Rev* **79**: 867–877
- Ribeiro DM, Zanetti GT, Heloisa M, Julião M, Masetto TE, Mary J, Neves L, Fonseca GG** (2019) Effect of different culture media on growth of *Chlorella sorokiniana* and the influence of microalgal effluents on the germination of lettuce seeds. *J Appl Biol Biotechnol* **7**: 6–10
- Turon X** (2013) Algae Oil , a Valuable Source of Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids. **1**: 11–14
- Van Wychen S, Ramirez K, Laurens LM** (2013) Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters

(FAME) by in situ Transesterification. *Contract* **303**: 275–3000

**Zhang L, Wang N, Yang M, Ding K, Wang YZ, Huo D, Hou C** (2019) Lipid accumulation and biodiesel quality of *Chlorella pyrenoidosa* under oxidative stress induced by nutrient regimes. *Renew Energy* **143**: 1782–1790