Universidade Federal do Rio de Janeiro
Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos
Mestrado Profissional em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica

ANDREINA ZULANY FIGUERA LEONETT

BIOFIXAÇÃO DE CO_2 E PRODUÇÃO DE HIDROCARBONETOS RENOVÁVEIS A PARTIR DA BIOMASSA DE MICROALGAS

Rio de Janeiro, 2016

Biofixação de CO_2 e Produção de Hidrocarbonetos Renováveis A Partir da Biomassa de Microalgas

ANDREINA ZULANY FIGUERA LEONETT

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica.

Aprovada por:

Prof. Donato Alexandre Gomes Aranda, Ph.D. (Orientador)

Profa. Yordanka Reyes Cruz, D. Sc. (Coorientadora)

Luciano Basto, D.Sc. (Coorientador)

Profa. Suely Pereira Freites, D.Sc

Nelson Furtado Pereira Freites, D.Sc

Gisel Chenard Díaz, D.Sc

Rio de Janeiro, 2016

Figuera Leonett, Andreina Zulany.
Biofixação de CO_2 e Produção de Hidrocarbonetos Renováveis A Partir da Biomassa de Microalgas / Andreina Zulany Figuera Leonett. – 2016.
XVIII ,139 f.: il ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2016.
Orientador: Donato Alexandre Gomes Aranda
Coorientadores: Yordanka Reyes Cruz, Luciano Basto Oliveira

1. Microalgas 2. Biofixação de CO_2 3. Bio-óleo/Hidrocarbonetos Renováveis I. Aranda, Donato Alexandre (Orientador), Reyes Cruz, Yordanka (Coorientadora), Basto Oliveira, Luciano (Coorientador). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Título.

DEDICATÓRIA

A Deus, por ser minha rocha, meu escudo, o princípio e o final de tudo,
e a minha família com muita saudade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cuidar de mim e me dar forças durante todo este tempo. Por me ensinar a confiar em sua palavra nos momentos mais difíceis para que, onde eu estiver, sempre acredite em seu amor, sua miserdicordia e sua vontade, a qual é agradável e perfeita para minha vida. Obrigada Pai Celestial!

Aos meus pais Andrés Figuera e Zulay Leonett, por seu amor, paciência e educação, os quais me permitiram lutar para atingir este novo sonho. A minha irmã Andrea Figuera, por seu carinho e por transmitir-me sua alegria sempre. Apesar de estarem longe sempre estiveram em meu coração!

À familia Ferreira da Costa, especialmente Mariano, Elisa e à missionária Debora, por suas orações, por me acolher e por me dar esse calor de lar que precisei. Muito grata de tê-los em minha vida. Deus lhes abeçoe sempre!

Ao Prof. Donato Aranda, por me orientar desde minha chegada neste país, e pela confiança para o desenvovimento desta pesquisa. Foi um prazer ter trabalhado com uma pessoa simples, empreendedora, e, sobretudo, por fazer parte de meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

À Profa. Yordanka Reyes, por me orientar, por sua paciência, ajuda e conselhos quando precisei. Esta pesquisa faz parte de sua visão e disposição para trabalhar em equipe. Sem palavras para te agradecer todo o apoio recebido!

Ao pesquisador Luciano Basto Oliveira (EPE), por me oferecer sua amizade, atenção e por acreditar em mim para realizarmos trabalhos juntos. Grata por ter conhecido e trabalhado com uma pessoa criativa e vissionária como você.

Aos membros da banca Profa. Suely Pereira, Dra. Gisel Chenard e o Dr. Nelson Furtado pelas sugestões e comentários realizados na defesa de mestrado.

Ao CENPES e ao Laboratorio de Tecnologia de Alimentos da EQ/UFRJ pelo apoio para a realização de alguns testes experimentais que fizeram parte desta pesquisa.

Ao Centro Nacional de Tecnologia Química em Venezuela (CNTQ), pelo apoio e por promover o desenvolvimento de pesquisas em relação a energias renováveis. Especialmente ao Dr. José Biomorgi e a Dra. Magaly Henriquez.

A todos os colegas do GREENTEC pelo apoio proporcionado ao longo desta pesquisa, especialmente a Alex Miranda, Rene González, Patricia Ochoa, Cristiane Mesquita, Juliana Romo, Mariana Fortes e Vinicius Rossa por sua contribuição e orientação nos momentos que precisei de ajuda.

A Alvaro Gamboa pelo carinho, apoio, compressão e paciência. Muito feliz por tua companhia!

A meus amigos Luiz Pedroso, José Rus, Alexis Mercado, Carmen Mercado, Elizabeth Oliveros e Pedro Pérez, pela amizade e o apoio. Vocês são muito especiais para mim!

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

FIGUERA LEONETT, Andreina Zulany. Biofixação de CO_2 e Produção de Hidrocarbonetos Renováveis a partir da Biomassa de Microalgas. Rio de Janeiro 2016. Dissertação. (Mestrado em (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal de Rio de Janeiro.

As microalgas são organismos unicelulares capazes de realizar fotossíntese, aproveitando a luz solar e absorvendo CO_2 para sintetizar a própria biomassa. Por esta razão elas têm sido recentemente utilizadas para reduzir as emissões de CO_2 e, em paralelo, sintetizar biomassa que pode ser utilizada na produção de biocombustíveis. Além de serem microrganismos de crescimento rápido, possuem uma composição bioquímica diversificada. A primeira etapa deste trabalho está relacionada com o monitoramento do consumo de CO_2 na microalga *Monoraphidium* sp**.,** cultivada em fotobiorreator fechado tipo Janela, e com a caracterização da biomassa microalgal produzida em relação ao: teor de lipídios totais - LT, lipídios convertíveis em biodiesel - LCB, carboidratos e proteínas. Os resultados desta primeira etapa permitiram definir que, no início do cultivo (dia 0), por cada grama de biomassa produzida, estavam sendo consumidos 0,79 g de CO_2. Já no último dia (dia 12), por cada grama de cultivo, foram consumidos 0,3 g de CO_2. No sexto dia de cultivo, por cada grama de biomassa, foram consumidos 0,61 g de CO_2. O melhor resultado foi obtido após 24 h de cultivo, no qual, por cada grama de biomassa, consumiram-se aproximadamente 1,2 g de CO_2. A biomassa de *Monoraphidium* sp. produzida apresentou um teor de LT de 17,37 ± 3,27 %, LCB de aproximadamente 8,36 ± 2,69 %, carboidratos de 32 ± 3,37 % e proteínas de 34,26 ± 0,41 %. Na segunda etapa deste trabalho foi realizada a extração do bio-óleo da biomassa úmida de *Monoraphidium* sp., através da reação de hidrotratamento, realizada em reator Parr Instruments Inc. Modelo 4550 à temperatura de 180 ºC durante 1h. A caracterização do bio-óleo por destilação simulada reportou que, aproximadamente, 20% m/m da amostra destilou entre 154,2 e 295,4 °C, fração favorável à produção de BioQAv. Seguidamente, o bio-óleo foi utilizado como matéria-prima para a produção de hidrocarbonetos, através de processos de hidrocraqueamento e hidrodesoxigenação (HDO) como: descarboxilação, descarbonilação e desidratação, com produção *in situ* de hidrogênio por reforma a vapor do glicerol. As reações foram realizadas em duas condições diferentes, 350ºC e 300ºC, respectivamente, durante 1h e empregando catalisador de rutênio em alumina (Ru/Al_2O_3). Esta rota mostrou-se promissória para a produção de hidrocarbonetos logrando uma conversão de 81,54 %.

Palavra-Chave: Microalgas, fotobiorreator, captura de CO_2, reação de hidrotratamento, hidrocarbonetos.

ABSTRACT

FIGUERA LEONETT, Andreina Zulany.**Biofixation of CO_2 and Production of Renewable Hydrocarbons Through Microalgae Biomass.** Rio de Janeiro 2016.Dissertation. (Master's degree in Technology of Chemical and Biochemical Processes) - Chemical School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Microalgae are unicellular organisms capable of photosynthesis, turning sunlight and carbon dioxide (CO_2) into rich biomass. Precisely because of this definition, in recent years various sectors have been targeting their ability to reduce CO_2 emissions and the capacity of simultaneously synthesize biomass which can be later used to produce bio-fuels. Besides being considered fast-growth microorganisms, microalgae have a diverse biochemical composition with similar characteristics to traditional biomass. The first stage of the study is related to monitoring CO_2 consumption in microalgae *Monoraphidium* sp cultivated in a closed-window type photobioreactor, as well as characterization of microalgal biomass produced in relation to the total lipid content (TL), lipids converted into biodiesel (LCB), carbohydrates and proteins. The results achieved in this stage showed that at the beginning of the culture (day 0) 0.79 g of CO_2 were consumed per each gram of biomass produced. On the last day (12), 0.3 g of CO_2 were consumed per gram of culture. On the sixth day of cultivation the consumption of CO_2 was 0.61 g per gram of biomass. The best result was obtained after 24 hours of cultivation, where for each gram of biomass produced approximately 1,2 grams of CO_2 were consumed. The biomass *Monoraphidium* sp. produced had a content of lipids converted into biodiesel of approximately 8.36 ± 2.69%, carbohydrates 32% ± 3.37 and proteins 34.26% ± 0.41. The second stage of this study is related to the cooking reaction of biomass of *Monoraphidium* sp, for extraction of bio-oil through hydrotreating reaction carried in reactor Parr Instruments Inc. Model 4550 whit temperature at 180 ºC for 1h. The characterization of the bio-oil by simulated distillation reported that approximately 20 wt % was distilled from 154.2 - 295.4 °C, therefore the yield is favorable for the production of bio-jet fuel (BioQAv). Consecutively the bio-oil was used as raw material for the production of hydrocarbons through hydrocracking and hydrodeoxygenation processes (HDO) as: decarbonylation, decarboxylation, dehydratation, with in situ production of hydrogen by steam reforming of glycerol. The reactions were carried out in two different conditions, 350 and 300 °C, respectively for 1h reactor employing ruthenium on alumina catalyst (Ru/Al_2O_3).This route proved to be promissory for production of hydrocarbons achieving a 81.54% of conversion.

Keyword: Microalgae, photobioreator, CO_2 capture, hydrotreating reaction, hydrocarbons.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Microscopia de luz da microalga *Monoraphidium sp.* 23
Figura 2.2.Transformação da energia solar em energia química - fotossíntese. 26
Figura 2.3.Histórico de emissões do Brasil nos últimos 15 anos. 29
Figura 2.4. Crescimento de microalgas em função dos nutrientes disponíveis. 34
Figura 2.5.Curva ideal da taxa de fotossíntese específica (P) versus a radiância (Ed). 37
Figura 2.6.Sistemas de cultivos de microalgas abertos. 40
Figura 2.7.Sistema de cultivo de microalgas fechados. 41
Figura 2.8.Diagrama de blocos para a produção de biomassa algal. 42
Figura 2.9. Hidrólise de triglicerídeos: Mecanismo Geral. 46
Figura 2.10. Rota de HDO para produção de hidrocarbonetos renováveis. 47
Figura 2.11.Mecanismo de HDO sobre catalisadores de metais de transição. 52
Figura 3.1. (A) Inóculo da cepa *Monoraphidium sp*. (MORF-01); (B). Imagem da microalga *Monoraphidium* sp. observada através do microscópio óptico Olympus BX com aumento 100 X. 55
Figura 3.2. Etapas do escalonamento da microalga *Monoraphidium* sp. 58
Figura 3.3. Crescimento da microalga *Monoraphidium* sp. em erlenmeyer de 250 mL. 58
Figura 3.4. Cultivo da microalga *Monoraphidium* sp.em erlemeyer de 2 L. 59
Figura 3.5. Cultivo de *Monoraphidium* sp.no garrafão de 20 L. 60
Figura 3.6. Inóculo de *Monoraphidium* sp.no fotobiorreator de janela de 110 L. 61
Figura 3.7. Partes do fotobiorreator de 110 L. 62
Figura 3.8. Painel de controle. 62
Figura 3.9. Cilindro de injeção de CO_2 e manômetro com pressão de 1,5 Kg-f cm^{-2}. 64
Figura 3.10. Medição de luz utilizando sensor PAR. 65
Figura 3.11. Determinação de peso seco. 67
Figura 3.12. (A) Cultivo para centrifugação; (B) Centrifuga Hitachi modelo CR22N. 68
Figura 3.13. Teor de umidade. 68
Figura 3.14. (A) Liofilizador; (B) Biomassa liofilizada. 69
Figura 3.15. Processo de extração de LT. 70
Figura 3.16. Processo de extração de LCB na *Monoraphidium* sp. 71
Figura 3.17. Sistema de filtração e rompimiento celular para determinar o teor de carboidratos. 74
Figura 3.18. (A) Solução de glicose; (B) Concentração de soluções; (C) Espectrofotômetro . 74
Figura 3.19. Bloco digestor para obtenção de proteína. 76
Figura 3.20. Cultivo e concentração da biomassa da microalga *Monoraphidium* sp. 77
Figura 3.21.Processamento da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp e extração do bio-óleo. 78
Figura 3.22.Reator Parr Instruments Inc. Modelo 4550 de 5 gal. 79
Figura 3.23.Separação das fases após reação. 80

Figura 3.24. (A). Fase líquida com hexano e sal; (B) Amostra após agitação. 81
Figura 3.25.Extração do bio-óleo com hexano. 82
Figura 3.26 Bio-óleo extraído da fração líquida superior, após recuperação do solvente extrator (hexano). 82
Figura 3.27(A) Filtração da fração apolar; (B) Partículas sólidas residuais presentes na fração apolar da fase superior líquida/sólido. 84
Figura 3.28 Bio-óleo extraído da fase inferior líquida/sólido, após recuperação do solvente extrator (hexano)..... 84
Figura 3.29.Filtragem da fração polar da fase inferior líquida/sólido. 85
Figura 3.30. (A) Biomassa residual úmida separada da fase líquida/sólido;(B) Biomassa residual seca..... 85
Figura 3.31. Reator Parr modelo 4842 utilizado no processamento do bio-óleo 89
Figura 3.32. Adição dos reagentes ao copo do reator..... 90
Figura 3.33. (A) Produto da reação;(B) Separação das fases;(C) Fração orgânica e aquosa com resíduos do catalisador..... 91
Figura 4.2 Aumento da densidade celular da biomassa de *Monoraphidium* sp. durante 12 dias de cultivo em fotobiorreator tipo Janela de 110 L. 99
Figura 4.3 Curva de destilação para o bio-óleo bruto. 113
Figura 4.4 Reação de processamento do bio-óleo a 350 ºC para produção de hidrocarbonetos. 116
Figura 4.5 Reação de processamento do bio-óleo a 300 ºC para produção de hidrocarbonetos. 116
Figura 4.6. Cromatograma das frações orgânicas obtidas do processamento do bio-óleo da microalga *Monoraphidium* sp..... 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.Características das culturas microalgais. 21
Tabela 2.2. Especies de microalgas e percentagem (%) de lipídios. 22
Tabela 2.3.Comparação de diferentes tipos de microalgas na fixação de CO_2 33
Tabela 2.4.Efeito do CO_2 na produtividade de biomassa e lipídios na microalga *Monoraphidium* sp. 43
Tabela 3.1.Composição e concentração das soluções de estoque do meio ASM-1. 57
Tabela 3.2.Condições operacionais da reação de hidrotratamento térmico da biomassa úmida. 79
Tabela 3.3 Quantidade de produto na fase superior líquida.Volume de hexano e massa de cloreto de sódio (NaCl) adicionados na extração da fração apolar 81
Tabela 3.4. Quantidade de produto na fase inferior líquida/sólido.Volume de hexano e massa de cloreto de sódio (NaCl) adicionados na extração da fração apolar..... 83
Tabela 4.1. Condições de cultivo da microalga *Monoraphidium sp*. no fotobiorreator fechado tipo "Janela". 94
Tabela 4.2. Monitoramento do crescimento celular contagem de células, biomassa seca e consumo de CO_2. 96
Tabela 4.3 Composição da biomassa da microalga *Monoraphidium* sp. 99
Tabela 4.4 Perfil lipídico da microalga *Monoraphidium* sp. cultivada no fotobiorreator tipo Janela. 101
Tabela 4.5 Teor de umidade da biomassa úmida de *Monoraphidium* sp. 102
Tabela 4.6 Variação da pressão durante o tempo da reação de hidrotatamento térmico. 103
Tabela 4.7 Balanço de massa da reação de hidrotratamento térmico biomassa úmida de *Monoraphidium sp*. 104
Tabela 4.8. Quantificação das fases formadas após reação de hidrotratamento térmico. 104
Tabela 4.9. Bio-óleo extraído da fase superior líquida e volume de hexano recuperado. 105
Tabela 4.10. Bio-óleo extraído da fase inferior líquida/sólido e volume de hexano recuperado. 106
Tabela 4.11.Quantificação da biomassa residual. 106
Tabela 4.12. Teor de proteínas na biomassa residual seca. 107
Tabela 4.13. Caracterização físico-química do bio-óleo. 108
Tabela 4.14. Perfil lipídico do bio-óleo extraído da microalga *Monoraphidium* sp. cultivada no Raceway da UFRN - Natal. 109
Tabela 4.15 Destilação simulada do bio-óleo extraído da microalga *Monoraphidium* sp. 111
Tabela 4.16. Características do catalisador 5% Ru/Al_2O_3. 114
Tabela 4.17. Condições operacionais durante o processamento do bio-óleo. 115
Tabela 4.18 Caracterização da fase orgânica. 117

LISTA DE ANEXOS

Anexo 01- Figura A1.Curva de calibração da glicose para obtenção de carboidratos.

Anexo 02 - Tabela A2. Resultados da fração orgânica obtida do processamento do bio-óleo à temperatura de 350ºC.

Anexo 03 - Tabela A3. Resultados do cromatograma da fração orgânica obtida do Processamento do bio-óleo à temperatura de 300 ºC.

LISTA DE ABREVIATURASE SIGLAS

ASTM –Sociedade Americana de Testes e Materiais;
DNA - ácido desoxirribonucleico;
RNA - ácido ribonucleico;
ATP - adenosina trifosfato;
cel (s) – célula (s);
°C - graus Celsius;
CG - cromatografia gasosa;
GGE - gases de efeito estufa;
cm - centímetro;
Cst – centistokes;
FAME - éster metílico de ácido graxo;
g - grama;
h - hora;
ha - hectare;
kgf - quilograma-força;
kt - quilotoneladas;
L - litro;
LT - lipídios totais
LCB–lipídios convertíveis em biodiesel;
mg - miligrama;
mL - mililitro;
min - minuto;
Mj – Megajoule;
mm - milímetro
m - metro;
mM - milimol;
nn - nanômetro
µL - microlitro;
µg - micrograma;
µE - microEinteins
µ - velocidade específica de crescimento;
MUFA - ácido graxo monoinsaturado;
N – normalidade;
ppm - partes por milhão;
PUFA - ácido graxo poli-insaturado;
rpm – rotações por minuto;
s - segundo;
SAFA - ácido graxo saturado;
ton - toneladas.

SUMÁRIO

Capítulo 1. Introdução 16
1.1 Justificativa 16
1.2 Objetivos geral e específicos 18
1.3 Estrutura do trabalho 18
Capítulo 2. Revisão bibliográfica 20
2.1 Microalgas 20
2.2 Espécies de microalgas 21
2.3 *Monoraphidium* sp. 22
2.4 Metabolismo celular 24
2.4.1 Cultivos fototróficos 24
2.4.2 Cultivos heterotróficos 24
2.4.3 Cultivos mixotróficos 25
2.4.4 Cultivos fotoheterotróficos 25
2.5 Processo da fotossíntese nas microalgas 26
2.5.1 Reação dependente da luz 27
2.5.2 Reação independente da luz 27
2.6 Principais emissores de CO_2 28
2.7 Fixação biológica de CO_2 por microalgas 30
2.8 Cinética de crescimento das microalgas 34
2.9 Condições de cultivo de microalgas 35
2.9.1 Luz 35
2.9.2 Temperatura 37
2.9.3 pH 37
2.9.4 Concentração de nutrientes 38
2.9.5 Oxigênio (O_2) 39
2.9.6 Dióxido de carbono (CO_2) 39
2.10 Cultivos de microalgas 39
2.10.1 Sistemas abertos 39
2.10.2 Sistema fechados 40
2.11 Concentração da biomassa microalgal 41
2.12 Lipídios 42
2.12.1 Métodos de extração 43
2.13 Tecnologias de produção de hidrocarbonetos renováveis a partir de bio-óleo 45
2.14 Produção de hidrogênio a partir do glicerol 49
2.14.1 Reforma em fase líquida (APR – Aqueous Phase Reforming) 49
2.15 Catalisadores utilizados no processo de HDO 51
2.15.1 Os metais de transição como catalisadores 52
2.15.2 Suportes de catalisadores 53
Capítulo 3. Materiais e métodos 55
3.1 Microalga *Monoraphidium* sp. 55
3.2 Meio de cultivo para o repique e multiplicação da microalga *Monoraphidium* sp 55
3.3 Escalonamento do cultivo da microalga *Monoraphidium* sp. 57
3.3.1 Cultivo em erlenmeyer de 250 mL 58
3.3.2 Cultivo em erlenmeyer de 2 L 58
3.3.3 Cultivo em garrafão de 20 L 59

3.3.4 Inóculo no fotobiorreator fechado tipo Janela de 110 L 60
3.4 Características do sistema de cultivo utilizado no monitoramento do consumo de CO_2. 61
3.4.1 Fotobiorreator de 110 L 61
3.4.2 Controle automático de pH por injeção de CO_2 monitoramento de CO_2 62
3.4.3 Temperatura 64
3.4.4 Iluminação 64
3.5 Monitoramento do crescimento do cultivo 65
3.5.1 Densidade celular 65
3.5.2 Determinação da biomassa seca 65
3.6 Concentração e secagem da biomassa microalgal 67
3.6.1 Centrifugação da biomassa 67
3.6.2 Quantificação do teor de umidade 68
3.6.3 Secagem da biomassa por liofilização 68
3.7 Caracterização da biomassa liofilizada 69
3.7.1 Teor de lipídios totais (LT) 69
3.7.2 Teor de lipídios convertíveis em biodiesel (LCB) 70
3.7.3 Determinação do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no extrato 72
3.7.4 Teor de carboidratos 73
3.7.5 Teor de proteínas totais 75
3.8 Processamento da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp e extração do bio-óleo. 77
3.8.1 Reação de hidrotratamento térmico da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp 79
3.8.2 Separação das fases e extração do bio-óleo 80
3.8.2.1 Extração da fração apolar (bio-óleo) da fase superior líquida 80
3.8.2.2 Extração da fração apolar (bio-óleo) da fase inferior líquida/sólido. Separação da biomassa residual. 83
3.9 Caracterização das frações apolares (Bio-óleo) 85
3.10 Produção de hidrocarbonetos renováveis a partir do bio-óleo de microalgas 88
3.10.1 Catalisador 89
3.10.2 Redução do catalisador Ru/Al_2O_3 89
3.10.3 Reações químicas 89
3.10.4 Caracterização da fase orgânica obtida na reação de produção de hidrocarbonetos 91

Capítulo 4. Resultados e discussões 93

4.1 Monitoramento das condições de cultivo da microalga *Monoraphidium* sp. 93
4.2 Produção de Biomassa vs Consumo de CO_2 95
4.3 Concentração de biomassa e determinação do teor de umidade 99
4.4 Caracterização da biomassa liofilizada 99
4.5 Processamento da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp. e extração do bio-óleo 102
4.5.1 Teor de umidade da biomassa 102
4.5.2 Reação de hidrotatamento térmico da biomassa microalgal 102
4.5.2.1 Quantificação das fases e balanço de massa 103
4.5.2.2 Extração da fração apolar (bio-óleo) da fase superior líquida 104
4.5.2.3 Extração da fração apolar (bio-óleo) da fase inferior líquida/sólido 105
4.5.2.4 Biomassa residual quantificação e caracterização 106

4.5.3 Caracterização da fração apolar (Bio-óleo) 107
4.6 Produção de hidrocarbonetos renováveis a partir do bio-óleo 114
4.6.1 Catalisador 114
4.6.2 Reação de produção de hidrocarbonetos a partir do bio-óleo obtido da microalga *Monoraphidium* sp. 115
4.6.3 Caracterização da fase orgânica obtida na reação de produção de hidrocarbonetos 117

Capítulo 5. Conclusões 120

Capítulo 6. Sugestões 122

Capítulo 7. Referências bibliográficas 123

Capítulo 1. Introdução

1.1 Justificativa

O Laboratório de Tecnologias Verdes – GreenTec trabalhou, durante os últimos cinco anos, no desenvolvimento de sistemas fechados de cultivo de microalgas e de tecnologias de produção de biodiesel, utilizando rotas termoquímicas para o processamento desta matéria-prima. As pesquisas realizadas seguiram o conceito de biorrefinaria (completo aproveitamento da biomassa microalgal produzindo biocombustíveis e bioprodutos).

Os resultados obtidos neste trabalho, unidos ao intuito de contribuir na consolidação da produção de uma multiplicidade de bioprodutos a partir das microalgas, motivaram o interesse de continuar aprofundando no desenvolvimento de tecnologias de produção de hidrocarbonetos renováveis. Hidrocarbonetos de cadeia longa possuem aplicação na indústria de lubrificantes (no caso, biolubrificante) e, principalmente, biocombustíveis "drop-in".

Um dos requisitos importantes para os combustíveis renováveis é que sejam preferencialmente drop-in, ou seja, biocombustíveis semelhantes do ponto de vista químico aos combustíveis fósseis, que possam ser misturados diretamente aos análogos petroquímicos, podendo usar a mesma infraestrutura e não demandando adaptações nos motores. Nesta descrição, inclui-se o diesel renovável e o bioquerosene de aviação (BioQAv).

Os hidrocarbonetos renováveis referem-se aos combustíveis constituídos por hidrocarbonetos de 10 a 20 átomos de carbono, produzidos a partir de biomassa, isentos de oxigênio. Processos de hidrocraqueamento, hidrodesoxigenação (HDO) e hidrotratamento para a produção de hidrocarbonetos renováveis são descritos na literatura (Citado por Perlingeiro, 2014).

Nestes processos, óleos e gorduras, constituídos basicamente por triglicerídeos, que são moléculas com altos teores de oxigênio, são submetidas a altas pressões de H_2 e elevadas temperaturas, na presença de catalisadores metálicos, promovendo a desoxigenação. Ao fim destes processos, são produzidas n-parafinas idênticas às presentes nos combustíveis derivados do petróleo, além do propano.

Vale salientar que as matérias-primas não deverão ser consideradas próprias para alimentos, devendo-se usar preferencialmente os resíduos lignocelulósicos, óleos e gorduras residuais, óleos vegetais não comestíveis como os de pinhão manso, camelina e outros produzidos a partir de processos microbiológicos como é o caso do óleo de microalgas.

As microalgas são organismos unicelulares capazes de realizar fotossíntese, aproveitando a luz solar e absorvendo CO_2 para sintetizar a própria biomassa (Schenk *et al*., 2008). Exatamente por esta característica, elas têm sido visadas nos últimos anos por diferentes setores, especialmente pela capacidade de reduzir as emissões de CO_2 e para em paralelo sintetizar biomassa que pode ser utilizada na produção de biocombustíveis, tais como: hidrocarbonetos renováveis, biodiesel ou etanol de segunda geração, álem de vários outros produtos, como hidrogênio, combustíveis sintéticos, produtos alimentícios, farmacêuticos e comesticos (Citado por Perlingeiro, 2014).

De acordo com a literatura, um quilograma de biomassa seca de microalga utiliza aproximadamente 1,83 quilogramas de CO_2 (Brennan e Owende, 2010). Estudos têm sido desenvolvidos para validar as microalgas como biofiltros com o objetivo de purificar gases de combustão provenientes das principais indústrias geradoras como:termelétricas, cimenteiras, agropecuária, e outras. Assim, as microalgas estão sendo utilizadas para melhorar a qualidade do biogás pela redução do teor de CO_2, o quê levaria a um aumento do metano (CH_4).

Apesar de que há ainda uma série de desafios tecnológicos a serem superados para que as microalgas se tornem competitivas no mercado de biocombustíveis e como sequestradoras de CO_2, suas potencialidades de rendimento são expressivas e, portanto, novos investimentos em P&D são necessários.

Neste contexto, desenvolveu-se esta pesquisa que visa o estudo da biofixação do CO_2 por meio do cultivo de microalgas e a produção de hidrocarbonetos renováveis a partir da biomassa úmida destas microalgas.

1.2 Objetivos geral e específicos

O presente trabalho visou avaliar a biofixação do CO_2 pela microalga *Monoraphidium* sp. Adicionalmente, foi estudada a produção de hidrocarbonetos renováveis a partir do bio-óleo extraído da biomassa úmida desta microalga.

A fim de alcançar o propósito estabelecido, os seguintes objetivos específicos foram percorridos:

1. Montar na Planta piloto do Laboratório de Tecnologias Verdes (Greentec) da Escola de Química/UFRJ um sistema de cultivo de microalgas que permita avaliar o potencial de absorção de CO_2 da espécie de microalga *Monoraphidium sp*;
2. Monitorar, no sistema de cultivo proposto, o consumo de CO_2 da microalga *Monoraphidium* sp. em função do crescimento celular;
3. Caracterizar a biomassa microalgal produzida na planta piloto determinando teor de lipídios totais (LT), lipídios convertíveis em biodiesel (LCB), carboidratos e proteínas;
4. Realizar a extração do bio-óleo a partir da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp. cultivada no Raceway da UFRN - Natal;
5. Caracterizar a fração apolar extraída (bio-óleo) e a biomassa residual;
6. Produzir hidrocarbonetos renováveis a partir de processos de hidrodesoxigenação, hidrocraqueamento e hidrotratamento do bio-óleo, identificando e quantificando os hidrocarbonetos produzidos.

1.3 Estrutura do trabalho

O presente trabalho está estruturado em sete capítulos que serão brevemente descritos a seguir:

- ✓ Capítulo 1: apresenta a justificativa que levou ao desenvolvimento deste estudo, tendo em vista o potencial de absorção de CO_2 nas microalgas e a crescente demanda mundial por combustíveis de baixa emissão de gases de efeito estufa, o qual exige a exploração de novas matérias primas (microalgas) e de tecnologias com menor impacto ambiental. Além do mais, apresenta os objetivos gerais e específicos do trabalho;

- ✓ Capítulo 2: neste capítulo apresentam-se os fundamentos teóricos necessários para a realização deste trabalho, conceitos básicos relacionados com as microalgas, tipos de metabolismo, sistemas de cultivo, métodos de concentração de biomassa e de extração dos componentes de interesse, além das tecnologias para o processamento da fração apolar extraída (bio-óleo) utilizadas na produção de hidrocarbonetos renováveis;

- ✓ Capítulo 3: estão descritos os materiais e metodologias utilizadas no desenvolvimento desta tese;

- ✓ Capitulo 4: são apresentados, avaliados e discutidos os resultados do estudo experimental desenvolvido durantes os dois anos de pesquisa, comparando-os com os dados disponíveis na literatura;

- ✓ Capítulo 5: estão descritas as conclusões evidenciadas sobre o tema;

- ✓ Capítulo 6: apresenta as sugestões do trabalho, a fim de dar continuidade sobre o assunto;

- ✓ Capítulo 7: encontram-se as referências bibliográficas utilizadas ao longo desta pesquisa.

Capítulo 2. Revisão bibliográfica

2.1 Microalgas

Microalgas são organismos unicelulares, fotossintetizantes, capazes de utilizar energia luminosa muito mais eficientemente que as plantas superiores e são eficientes fixadores de gás carbônico (Greenwell *et al.*, 2010).

Em princípio, as microalgas foram investigadas como fonte de obtenção de proteína para o consumo humano. O foco inicial deslocou-se para seu uso na captura de CO_2 e produção de biocombustíveis (Greenwell *et al*, 2009).

Dentre as características das microalgas, destaca-se o fato de crescerem rapidamente, sintetizar e acumular grandes quantidades de lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos, como os carotenóides e a clorofila. A fim de aproveitar ao máximo a cultura de microalgas é essencial a seleção da cepa adequada e das melhores condições de cultivo. Condições de cultivo envolvem: qualidade da água; pH; temperatura; nutrientes e dosagem de CO_2 de maneira controlada. Nutrientes devem ser adicionados para garantir o crescimento das microalgas (nitrogênio, fósforo, minerais e vitaminas), além de uma fonte de carbono (CO_2) e energia solar. A Tabela 2.1 lista as principais características das culturas microalgais:

Tabela 2.1.Características das culturas microalgais.

Características das Microalgas	Vantagens	Desvantagens
Crescimento em ambientes extremos	Reduz problemas com espécies competitivas e predadores	Dificuldade para manutenção de culturas em grandes escalas sobre ambientes extremos (clima frio)
Taxa de crescimento rápida	Vantagens competitivas sobre outras espécies. Reduz a área de lagoa de cultivo requerida	Taxa de crescimento inversamente relacionada ao tamanho celular. Usualmente o crescimento celular rápido apresenta tamanho celular pequeno
Tamanho de célula grande, morfologia colonial ou filamentosa	Reduz os custos de cultivo	Grandes células usualmente crescem mais lento do que células de tamanho pequeno
Elevada tolerância em condições ambientais	Menor controle das condições de cultivo, necessário para a viabilidade da cultura	-
Tolerância à tensão de cisalhamento	Permite utilizar métodos de mistura e bombeamento de menor custo	-
Alto conteúdo celular	Alto conteúdo de biomassa	Os produtos são geralmente metabolitos secundários. Portanto alta concentração destes significa crescimento mais lento

Fonte: Razzak, 2013.

2.2 Espécies de microalgas

As microalgas são principalmente encontradas no meio marinho e água doce, sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (Chisti, 2008). O termo “microalgas” é utilizado para dar nome a diversos grupos de organismos vivos e varia desde os pequenos organismos unicelulares até os multicelulares, sendo, antigamente, consideradas plantas simples.

As microalgas também incluem os organismos com estrutura molecular procariótica e eucariótica, que, mesmo sendo estruturalmente e morfologicamente diferentes entre si, são fisiologicamente parecidos e possuem um metabolismo similar com o das plantas (Huang *et al*., 2010).

Os exemplos de microalgas procarióticos são cianobactérias (Cyanophyceae) e as microalgas eucarióticas são algas verdes (Chlorophyta) e diatomáceas (Bacillariophyta) (Richmond, 2004).

Segundo Reviers (2004), atualmente as microalgas estão classificadas em 11 divisões distintas: Cyanophyta, Glaucophyta, Rodophyta, Cryptophyta, Euglenozoa, Cercozoa, Haptophyta, Dinophyta, Ochroophyta, Streptophyta e Chlorophyta.

A classificação bioquímica das microalgas esta relacionada com a natureza e localização dos pigmentos (clorofilas, ficobilinas, carotenos e carotenóides), dos carboidratos de reserva (amido) e da disposição dos tilacoides, sistema de membranas situado no interior dos plastídios, que contem pigmentos (Franceschini *et al.*, 2010).

Na Tabela 2.2 são apresentados alguns exemplos de diferentes espécies de microalgas e as respectivas frações lipídicas.

Tabela 2.2. Especies de microalgas e percentagem (%) de lipídios.

Divisão	Espécie	Concentração lipídica (%) peso seco
Euglenophyta (euglenas)	*Euglena gracillis*	14 - 20
Dinophyta (dinoflageladas)	*Crypthecodinium cohnii*	20
Bacillariophyta (diatomáceas)	*Nitzschia sp.*	45 - 47
Haptophyta	*Isochrysis sp.*	25 - 33
Rhodophyta (algas vermelhas)	*Porphyridium cruentum*	9 - 14
Chlorophyta (algas verdes)	*Nannochloris sp.* *Scenedesmus obliquus* *Chlamydomonas rheinhardii*	20 - 35 12 - 14 21
Cyanobacteria	*Anabaena cylindrica*	4 - 7

Fonte: Adaptado de Carolina Tolomini (2011).

2.3 *Monoraphidium* sp.

Em taxonomia, *Monoraphidium* é um gênero de microalgas verdes, especificamente do Selenastraceae (Figura 2.1) e são muito comuns entre as clorofíceas. Este tipo de microalga apresenta facilidade de cultivo e de crescimento (Richmond, 2004).

Figura 2.1. Microscopia de luz da microalga *Monoraphidium sp.*
Fonte: Holbroook 2014.

Este tipo de microalga é abundante na China, pois inúmeras coleções de culturas de algas foram estabelecidas com o objetivo de coletar e proteger materiais genéticos em perigo de extinção. Em Wuhan está a principal coleção de culturas de microalgas de água doce, que detém mais de 2.000 cepas pertencentes a mais de 120 gêneros (Holbroook, 2014).

No Brasil a microalga *Monoraphidium* sp. é cultivada no nordeste do pais, na cidade de Natal. Dentre as técnicas de produção em larga escala destaca-se o uso de raceway, que são grandes tanques abertos (modelo de cultivo da planta piloto de Petrobras/UFRN em Extremoz/RN). A usina de biodiesel Grande Valle Bio Energia Ltda., localizada no estado do Rio de Janeiro, em conjunto com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, faz alguns investimentos em desenvolvimento de tecnologia para o cultivo e o uso de microalgas, entre estas a *Monoraphidium* sp., como matéria-prima alternativa na produção de biodiesel (EBC, 2013).

São poucos os estudos encontrados com a microalga *Monoraphidium* sp. relacionados com a captura de dióxido de carbono (CO_2). A maioria destes está focada na obtenção de biodiesel. Shrivastav *et al.*, (2015) observou que na adição de CO_2 e ar, a microalga *Monoraphidium* sp. tem capacidade para mitigar o CO_2, devido a sua alta capacidade de fixar carbono. E, em decorrência de sua alta produtividade de lipídios e biomassa, tem condições adequadas para produzir biodiesel. Apesar da espécie *Monoraphidium* sp. se adaptar muito bem a regiões de baixa temperatura e de pouca incidência luminosa, apresentando bom crescimento em águas residuais e com teores lipídicos semelhantes ao da soja (Holbrook *et al*, 2014), a *Monoraphidium* sp. é capaz de crescer em temperatura de 35 ºC (Report, 1987).

Tavares *et al.*, (2015), em seu estudo com a *Monoraphidium* sp. obtiveram um perfil desejável para a produção do biodiesel, uma vez que as curvas termogravimétricas indicaram 31,50 % m/m de teor lipídico. O tamanho da célula de microalga e o sistema empregado para a extração influenciam diretamente no rendimento, pois quanto maior o tamanho da célula, maior será a atuação dos sistemas extratores na quebra da parede celular, potencializado, assim, a extração dos lipídios.

Gomes, (2012), em seu estudo de análise termogravimétrica (TGA) concluiu que o material lipídico (ML) da *Monoraphidium* sp. favoreceu processos oxidativos durante a estocagem, capaz de levar à alteração da composição do ML, o que pode comprometer suas propriedades físico-químicas e posteriores aplicações industriais.

2.4 Metabolismo celular

Existem quatro tipos de metabolismo celular, os quais dependem dos fatores abióticos do ambiente e aos quais diversas microalgas conseguem adaptar-se. Segundo Ohse, *et al*, (2007) os cultivos podem ser:

2.4.1 Cultivos fototróficos

Este tipo de cultivo emprega iluminação, como fonte de energia, e carbono inorgânico (CO_2), proveniente do ar atmosférico ou injetado de cilindros pressurizados, como fonte de carbono para produzir energia química através do processo de fotossíntese.O cultivo fototrófico é o mais utilizado, principalmente na produção em larga escala. Segundo Mata e colaboradores (2010) a variação de lipídios nesta condição está entre 5 e 60 %, de acordo com o tipo de microalga. Cabe destacar que a microalga *Monoraphidium* sp. foi cultivada sob esta condição.

2.4.2 Cultivos heterotróficos

Este tipo de cultivo utiliza carbono orgânico como fonte de carbono e energia. O cultivo heterotrófico evita problemas associados à limitação de luz, já que esta não é necessária. Quando comparado ao sistema fotossintético, o cultivo heterotrófico apresenta rendimentos de biomassa significativamente superiores (Choix, *et al*, 2012).

Estudos recentes mostram que as culturas heterotróficas microalgais estão ganhando interesse crescente para a produção de uma grande variedade de produtos em todas as

escalas. Nesta condição de cultivo, a produção de bioprodutos, tais como: ácidos graxos poli-insaturados, carotenóides, ficobilinas, polissacarídeos, entre outros é economicamente viável, dadas as reduções significativas na complexidade dos bioprocessos e custos operacionais (Tuchman, 1996). Neste tipo de cultivo é posssível utilizar glicose, acetato, glicerol, sacarose, entre outros compostos como fonte de carbono.

2.4.3 **Cultivos mixotróficos**

Neste tipo de cultivo a microalga é submetida à fotossíntese e utiliza compostos orgânicos e inorgânicos (CO_2) como fonte de carbono para o crescimento. *Spirulina* platensis e *Chlamydomonas* reinhardtii estão entre as espécies mais utilizadas neste tipo de cultivo.

2.4.4 **Cultivos fotoheterotróficos**

Neste tipo de cultivo, a microalga requer luz quando utiliza compostos orgânicos como fonte de carbono. A principal diferença entre o mixotrófico e o fotoheterotrófico é que neste último somente a luz é usada como fonte de energia. Além disso, no fotoheterotrófico a luz e as fontes orgânicas são necessárias ao mesmo tempo.

De forma geral, as microalgas são um grupo diversificado de microrganismos fotossintéticos que convertem o CO_2 em diferentes compostos valiosos, para biocombustíveis, alimentos, produtos farmacêuticos e compostos biologicamente ativos (Mata *et al*, 2010).

As principais vantagens do cultivo de algas como fonte de biomassa são: alto rendimento fotossintético (alcançam de 5 a 6 % de conversão de luz, enquanto para a maioria das plantas terrestres essa taxa é de 1,2 %); capacidade para crescer em água doce, salgada e residual; habilidade para tratar águas residuais e sintetizam compostos de elevado valor comercial (Ramaraj ,2010).

A identificação morfológica das microalgas é um desafio para muitos pesquisadores no mundo, já que estas mudam o tamanho celular e sua forma durante as diferentes etapas de seu ciclo de vida. Por isso é importante sua análise por técnicas de microscopia convencional. Uma técnica mais rápida e precisa é a identificação molecular pela

sequência de DNA ribossomial, muito utilizada para a compreensão da evolução de diferentes tipos de algas (Rawat, *et al*, 2012).

2.5 Processo da fotossíntese nas microalgas

A fotossíntese é um processo utilizado pelas plantas para converter água, CO_2 e luz solar, com auxilio da clorofila, em carboidratos.O processo fotossintético nas microalgas libera oxigênio, a fixação de CO_2 ocorre uma vez que este é convertido em lipídios e carboidratos. Na fotossíntese, a água é o doador de elétrons, que libera oxigênio (O_2) após ser hidrolisada (Figura 2.2). O processo se dá a partir da seguinte reação:

$$H_2O + CO_2 + Luz \rightarrow (CH_2O)n + O_2 \qquad Eq.\ 2\text{-}1$$

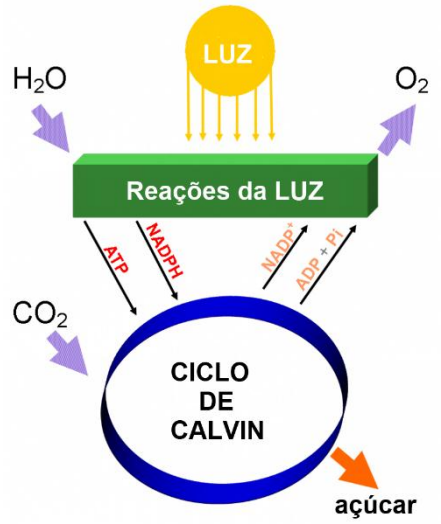


Figura 2.2.Transformação da energia solar em energia química - fotossíntese.
Fonte: http://www.teliga.net/2011_11_01_archive.html.

A reação global pode ser expressa de duas formas: reação dependente da luz e reação independente da luz, ou escura. Dentro das células a fotossíntese ocorre nos cloroplastos, organelos delimitadas por membranas, cujo interior é preenchido por um líquido aquoso denominado estroma, onde ocorrem as reações do ciclo de Calvin. Para cada ciclo de Calvin completo são produzidos carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos que podem ser sintetizados na fixação fotossintética de CO_2.

A reação inicial do ciclo de Calvin é a fixação do CO_2 na ribulose, que é catalisada pela enzima ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase, conhecida como RBP-carboxilase RuBisCO, proteína formada por 16 polipeptídeos que catalisa a transformação de CO_2

em carboidrato. Esta proteína comporta-se como carboxilase na fase de redução do ciclo, e como oxigenase sob condições aeróbias, fazendo parte da fotorrespiração, isso significa que o oxigênio (O_2) e o CO_2 competem pelo mesmo sitio catalítico. Como consequência, ocorre a redução da taxa de assimilação de CO_2 e da eficiência energética da fotossíntese, podendo também reduzir o quociente fotossintético.

2.5.1 **Reação dependente da luz**

Este tipo de reação envolve as reações redox e fotoquímicas. Nas membranas tilacóides dos cloroplastos, os pigmentos de clorofila absorvem a energia da luz solar/fóton e liberam elétrons. A reação geral neste processo é apresentada pela seguinte equação (Raven, *et al*, 2008.) (Buchanam., *et al*, 2000).

$$2H_2O + 2NADP^+ + 3ADP + 3P + luz \rightarrow 2NADPH + 2H^+ + 3ATP + O_2 \quad Eq.\ 2\text{-}2$$

A energia solar é utilizada para sintetizar o ATP (adenosina trifosfato) e NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). A síntese pode ocorrer de duas formas: cíclica e não cíclica, esta última utilizada pelas microalgas e cianobactérias. Na forma não cíclica, a antena complexa captadora de luz (clorofila e outros pigmentos) do fotosistema II captura fótons. Os elétrons são transportados para uma molécula aceptora de elétron primário; isto ocorre quando, no núcleo do fotosistema II, a molécula de clorofila obtém energia suficiente de excitação a partir das antenas dos pigmentos vizinhos. A enzima de síntese de ATP utiliza este potencial para produzir ATP durante a fotofosforilação. Por outro lado, o NADPH é o produto terminal da reação redox.

A reação cíclica é similar a não cíclica, mas difere na forma de gerar ATP sem reduzir o NADPH inicialmente formado (Razzak *et al.* 2013).

2.5.2 **Reação independente da luz**

Nas reações independentes de luz ou reações escuras, a enzima RuBisCO captura o CO_2 atmosférico. Este processo também requer a formação do NADPH e é denominado Ciclo de Calvin-Benson, no qual a fixação do CO_2 produz intermediários que são convertidos em carboidrato como produto final (Lee S. J., 1998). A quantidade de carbono gerada na fotossíntese permite obter outros compostos orgânicos, como por exemplo a formação de celulose, principal precursor para lipídios e a biossínteses de aminoácidos.

A seguir ilustra-se a equação geral para as reações independentes da luz:

$$3CO_2 + 9ATP + 6NADPH + 6H^+ \rightarrow C_3H_6O_3\text{-fosfato} + 9ADP + 8P + 6NADP^+ + 3H_2O \quad \text{Eq. 2-3}$$

A fixação ou a redução de CO_2 têm lugar pela combinação de CO_2 com um açúcar de cinco carbonos, ribulose1,5-bisfosfato (Ru5BP). Essa reação produz duas moléculas compostas de três átomos de carbono, gliceraldeído 3-fosfato (GP), também conhecido como 3-fosfoglicerato (PGA). O GP é reduzido a gliceraldeído 3-fosfato (G3P) na presença de ATP e NADPH, proveniente das etapas fotodependentes. Este produto é denominado como 3-fosfogliceraldeído (PGAL) ou triose-fosfato. A maior parte do G3P produzido (5 a 6 moléculas) é utilizada para regenerar a Ru5BP de modo que o processo continue. Assim, uma das seis moléculas de triose-fosfato não é reciclada e se condensa para formar a hexose fosfato, e ao fim produzir sacarose, amido e celulose. O açúcar produzido durante o metabolismo do carbono forma um esqueleto de carbono que pode ser utilizado para outras reações metabólicas, como a produção de lipídios e aminoácidos (Razzak *et al.* 2013).

2.6 Principais emissores de CO_2

Uma das mais importantes atividades industriais relacionadas com os gases de efeito estufa (GEE) é a indústria de cimento; que produz enormes quantidades de CO_2. A indústria de cimento produz em torno de 8% do total das emissões de CO_2. No ano 2010, reportaram-se 33 bilhões de toneladas de CO_2, bem com o consumo de carvão e gás natural, responsáveis por 40 % e 20 % do total das emissões, respectivamente (PBL Netherlands Environmental Assessment Agency, 2011).

Segundo o Sistema de Estimativa de Emissões de Gases de Efeito Estufa (SEEG), como mostra a Figura 2.3, em 2014 o Brasil emitiu 1,56 bilhão de toneladas de CO_2, contra 1,57 bilhão em 2013. Para alguns analistas o número é bom porque, em comparação com outros países em desenvolvimento, o Brasil não está aumentando suas emissões. O estado de São Paulo é hoje o segundo maior produtor de gases de efeito estufa tendo emitido em 2014 cerca de 154 milhões de toneladas de CO_2 ($MtCO_2$), superado pelo Pará (155 $MtCO_2$). Enquanto o estado amazônico emite sobretudo por causa do desmatamento, em São Paulo as emissões que

mais crescem são as de energia que inclui o transporte. Por outro lado, as termelétricas fizeram o setor energético poluir 6 % a mais em 2014, considerando outros setores econômicos, a agropecuária ainda é a grande emissora.

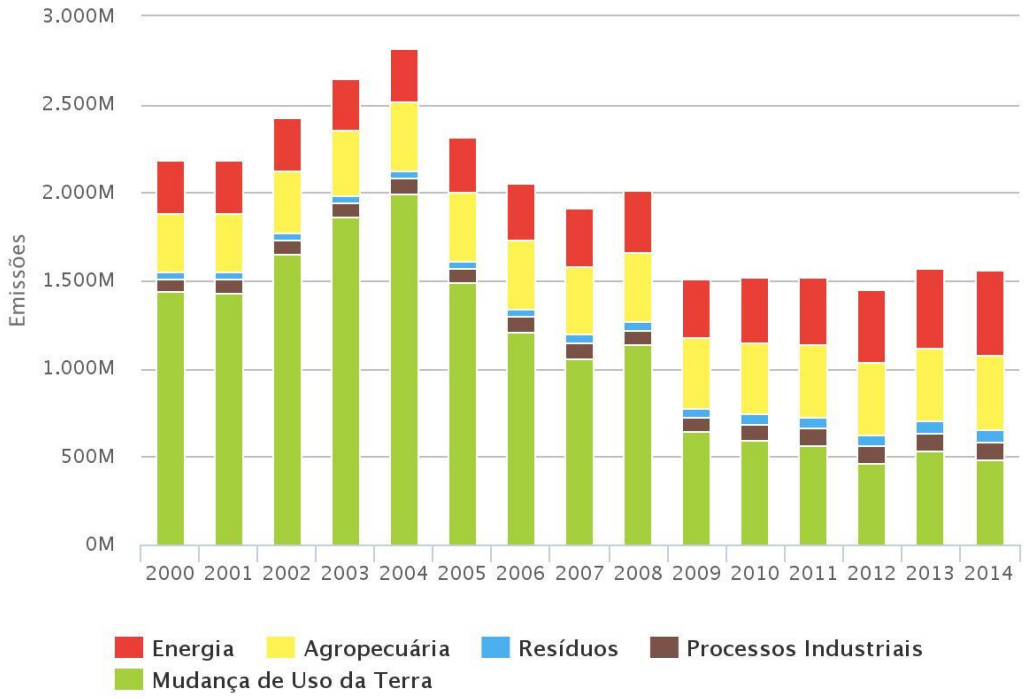


Figura 2.3.Histórico de emissões do Brasil nos últimos 15 anos.

Fonte: SEEG/Observatório do Clima.

A mitigação biológica de CO_2 tem atraído muita atenção como alternativa energética, já que esta permite a produção de biomassa no processo de fixação de CO_2 através da fotossíntese (Ragauskas, *et al*, 2006). Existem numerosas investigações e desenvolvimentos no mundo com o objetivo de mitigar o CO_2 (Wang *et al*, 2008).

De acordo com Yang H, *et al* (2010), existem três opções pra reduzir o total das emissões de CO_2 para a atmosfera, são estas: (1) reduzir o consumo de energia, (2) reduzir o consumo do carvão, (3) aumentar o sequestro de CO_2. O sequestro de carbono pode ser definido como a captura e armazenamento seguro deste, que de outro modo, seria emitido ou permaneceria na atmosfera (Herzog e Golomb, 2004).

De acordo com Herzog e Golomb (2004), a captura de CO_2 pode ser dividida em três categorias: (1) Separação de fluxo de gás baseado na absorção química usando

monoetanolamina (MEA), dietanolamina (DEA) e monodietanolamina (MDEA) (Yang, *et al*, 2010), (2) por combustão de oxigênio e (3) por fixação biológica de CO_2, foco do presente trabalho.

2.7 Fixação biológica de CO_2 por microalgas

De acordo com o protocolo de Quioto (1997) assinado por mais de 170 países, as emissões de gases do efeito estufa devem ser reduzidas em 5,2 % com base nas emissões do ano 1990. Métodos e técnicas físico-químicas e biológicas são amplamente estudados, entre as alternativas encontra-se o método biológico utilizando microalgas fotossintéticas, o qual garante efetividade na fixação biológica de CO_2 (Ota e Kato, *et al* 2009).

A biomassa microalgal contém aproximadamente 50 % de carbono em peso seco, derivado do CO_2. A produção de 100 toneladas de biomassa microalgal fixa aproximadamente 183 toneladas de CO_2 que deve ser alimentado durante o dia na microalga, e seu controle depende do monitoramento do pH, já que medições de pH minimizam as perdas de CO_2 (Razzak *et al*. 2013). O CO_2 pode ser só fixado pela microalga durante o dia, mas estas podem produzi-lo eventualmente durante a noite como ocorre com algumas plantas.

Nos sistemas de cultivo abertos é necessária uma quantidade de fluxo de gás para assegurar a quantidade de CO_2, já que sistemas ao ar livre não são fáceis de controlar e mostram baixa produtividade como resultado da variação de diferentes fatores, como: temperatura do ambiente, sistemas de circulação e luz. Entretanto para o tratamento de gás residual considera-se o fotobiorreator fechado como um biodepurador, já que as células da cultura de microalga convertem o CO_2 do gás residual em biomassa de forma eficiente em termos energéticos e econômicos (Chiu *et al*, 2008).

Nos sistemas fechados a eficiência da remoção e fixação de CO_2 depende da espécie de microalga, da concentração de CO_2, do “design” do fotobiorreator e das condições de operação (Raven, 2010). Assim, em três fotobiorreatores tubulares entre 27 – 38 % e 7 – 13 % de CO_2 foi fixado por *Spirulina* sp. e *Scenedesmus* oblíquus, respectivamente, em culturas aeradas com 6% de CO_2.

Por outro lado, em tratamentos com 12% de aeração de CO_2, a eficiência de fixação foi de 7 a 17% por *Spirulina* sp. e 4,9 % por S. oblíquus (Costa e Greque, 2007). Em outras palavras, as espécies de microalgas influenciam na eficiência e remoção do CO_2, isto está relacionado com as condições fisiológicas, como potencial de crescimento celular e metabolismo de CO_2.

A taxa de fixação de CO_2 pelo teor de carbono contido nas células de algas foi determinada por Yun (1997), por meio da seguinte expressão (Eq 2.4):

$$R_{CO2} = C_C * \mu_L * \left(\frac{M_{CO2}}{M_C}\right) \qquad \textit{Eq. 2-4}$$

onde:

R_{CO2}: taxa de fixação de CO_2 (g CO_2/m^3 h);

μ_L: taxa de crescimento volumétrico (g peso seco/m^3 h);

M_{CO2}: massa molar de CO_2;

M_C: massa molar de carbono elementar;

A média de teor de carbono (Cc), foi mensurada por analises elementar -CHNS-932 Leco= 0,507 g carbono/ g peso seco. A taxa de crescimento foi determinada para o regime linear dado que a maioria do crescimento da alga ocorre durante esta fase.

Costa e Greque (2007), em seu teste utilizaram as microalgas *Chorella* Kesseleri, *Chorella* vulgaris, *Scenedesmus* obliquus e *Spirulina* sp., cultivadas em frascos e fotobiorreatores verticais tubulares, determinando a fixação de CO_2 pela seguinte expressão:

$$FD = \left(FA_{(t+1)} - FA_t\right) * mid^{-1} \qquad \textit{Eq. 2-5}$$

onde:

FD: fixação por dia de CO_2 (g);

$FA_{(t+1)}$: acumulação de CO_2 fixado durante t +1 (d);

FAt: acumulação de CO_2 durante tempo (d);

m_{id}^{-1}: massa em gramas de CO_2 injetado por dia.

Kang e Wen (2015), em seu estudo, consideraram que a taxa de remoção de CO_2 foi aproximadamente igual à taxa de fixação de CO_2 pelas células de microalgas, assumindo que o CO_2 dissolvido no liquido foi mínimo comparado com o CO_2 consumido pela célula *(Chiu et al*, 2008). Para o cálculo foi utilizada a seguinte expressão (Hoe Wen-ming, 2010):

$$RCO_2 = \frac{P}{Ycell/CO_2} = \frac{Ccell*D}{0{,}532} \quad Eq.\ 2\text{-}6$$

onde:

P: produtividade de biomassa (g $L^{-1}dia^{-1}$);

Ccell: densidade da biomassa (g L^{-1});

D: taxa de diluição (dia^{-1});

$Y_{cell/CO2}$: produção de biomassa baseado no consumo de CO_2. De acordo com Hoe Wen-ming, (2010) a biomassa de alga pode ser representada aproximadamente como $CO_{0,48}H_{1,83}N_{0,11}P_{0,01}$, portanto o valor de $Y_{cell/CO2}$ pode ser estimado como 0,532.

De acordo com Meldon (2011), é possível incrementar o uso econômico das microalgas utilizando um processo de duas fases. Na primeira fase, o CO_2 das centrais elétricas ou proveniente de outras fontes é primeiramente depurado (exemplo: remoção com aminas) e concentrado por processos convencionais. Após essa primeira fase, o CO_2 é transportado para a produção de microalgas. Este processo pode ser comparado economicamente com outros métodos convencionais de captura de CO_2 que envolvem separação, transporte e finalmente a disposição em oceanos profundos ou depleções de poços de gás.

Algumas espécies de microalgas são tolerantes a temperaturas relativamente altas (próximas a 30ºC), deste modo este tipo de microalgas pode ser cultivada empregando fluxos de gases sob altas temperaturas de zonas industriais (Wang *et al*, 2008). A Tabela 2.3 reporta algumas espécies de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2 em temperaturas entre 20 a 30 ºC.

Tabela 2.3.Comparação de diferentes tipos de microalgas na fixação de CO_2

Espécie de Microalga	**%CO_2**	**Temperatura (ªC)**	**Produtividade de Biomassa (g L^{-1} d^{-1})**	**Taxa de Consumo de CO_2 (L d^{-1})**
Dunaliella tertiolecta	3	27	0,17	0,31
Chlorella sp.	15	35	-	>1
***Monoraphidium* sp**	**-**	**25**	**0,241**	**-**
Scenedesmus oblíquus	18	30	0,14	0,26
Spirulina sp	12	30	0,22	0,41
Haematococcus pluvialis	16 - 34	20	0,076	0,14

Fonte: Wang, 2008 e Shrivastav 2015.

A taxa de fixação de CO_2 está diretamente relacionada com a utilização eficiente da luz e com a densidade celular da microalga a qual envolve crescimento fotoautotrófico. Portanto, as medições de biomassa ou as avaliações da taxa de crescimento são fundamentais para determinar o potencial do sistema e da cultura de microalgas na remoção direta de CO_2 (Cheng *et al*. 2006).

Shrivastav *et al*, (2015) monitorou o crescimento da microalga *Monoraphidium* sp. em meio BG 11em duas condições, empregando uma misitura de ar + 2 % de CO_2 e 0,035 % CO_2 do ar durante 16 dias de cultivo. A pureza do CO_2 utilizado foi de 99 %. Assim, o crescimento rápido foi observado com (ar + CO_2) obtendo uma produtividade de biomassa e lipídio de 241,61 ± 1,417 mg L^{-1} e 28,9 ± 0,008 %, respectivamente. Quando se utilizou apenas ar o total de biomassa e de lipídio foi de 117,16 ± 1,417 mg L^{-1} e 22,40 ± 0,153 %, respectivamente.

Desta maneira, para enriquecer a produção de lipídios e reduzir as emissões de CO_2 fontes artificiais de CO_2, como fluxo de gás produzido por centrais elétricas que queimam carvão, podem ser utilizadas e misturadas com ar atmosférico, após ter um pré-tratamento.

2.8 Cinética de crescimento das microalgas

Na Figura 2.4 apresenta-se a curva de crescimento de microalgas onde são identificadas as principais fases (6) (Mata *et al*, 2010). A linha sólida representa a curva de crescimento e suas fases, enquanto o tracejado a curva de redução dos nutrientes no meio.

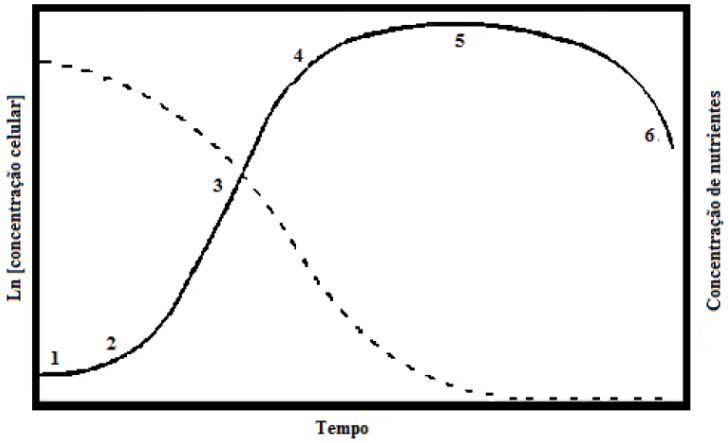


Figura 2.4. Crescimento de microalgas em função dos nutrientes disponíveis.

Fonte: Mata et al, 2010.

- **Fase lag ou de adaptação (1):**é a fase que segue à inoculação da linhagem em novo meio de cultivo. É uma fase relativamente curta, a taxa especifica decrescimento é nula;
- **Fase de aceleração (2)**: a taxa de crescimento especifica é superior a zero, mas inferior a máxima;
- **Fase de crescimento exponencial (3)**: ocorre o aumento constante do número de organismos na cultura. O ritmo de crescimento da população mede o aumento da biomassa ao longo do tempo. Esta fase depende do número de células do inóculo, meio utilizado, ritmo de crescimento, e condições físicas do crescimento como luz e temperatura;
- **Fase de desaceleração (4)**: nesta fase, a taxa especifica de crescimento começa a diminuir. A concentração celular é geralmente muito alta e uma exaustão em termos de nutrientes, limitação de dióxido de carbono e luz (fenômeno de sombreamento das células), leva ao declino do crescimento;
- **Fase estacionária (5)**: a concentração celular máxima é atingida e a taxa de crescimento especifico é reduzida até se anular. As células começam a sofrer

alterações bioquímicas. Uma limitação em nitrogênio pode resultar em uma redução do conteúdo proteico, alterações do conteúdo lipídico e de carboidratos,

- **Fase de declino ou morte (6)**: nesta fase a taxa de mortalidade supera a taxa de crescimento.

Segundo Mata, *et al*, (2010), as microalgas na fase (3) apresentam elevado teor de proteínas, enquanto na fase (5) apresentam mais moléculas de reserva de energia como carboidratos e glicogênio.

2.9 Condições de cultivo de microalgas

A cultura de microalgas oferece importantes vantagens para uma utilização eficiente de energia solar e fixação de CO_2, uma vez que operada de modo contínuo, permitindo máxima produção anual. Devido à pequena estrutura celular da microalga, sua taxa de crescimento é muito mais rápida quando comparada a outros cultivos. Seu tempo de cultivo é muito mais curto, propiciando rápida captura de CO_2 (Razzak *et al*. 2013). Portanto, o cultivo de microalgas combina a capacidade de captura de CO_2 pela fotossíntese com o elevado rendimento de uma cultura microbiana controlada.

O crescimento e cultivo controlado das cepas de microalgas é influenciado por diferentes fatores, como luz (ciclo dia-noite e intensidade de radiação), temperatura, concentração de nutrientes, O_2, CO_2, salinidade, qualidade de água, regulação de minerais, carbono/biodisponibilidade, fragilidade celular, densidade celular e inibidores do crescimento. Além disso, existem outros parâmetros referentes ao “design” do reator e operação que afetam o crescimento do cultivo, tais como: misturador; fluxo dinâmico e stress hidrodinâmico; profundidade do cultivo, tamanho e distribuição da bolha de gás, trocas gasosas; transferência de massa, taxa de diluição, químicos tóxicos, patógenos, como bactéria, fungos e vírus; competição de outras microalgas e frequência de colheita (Razzak *et al.* 2013).

A seguir descreve-se os principais fatores que afetam o crescimento das microalgas:

2.9.1 Luz

A Radiação Fotossintética Ativa (PAR, pela sigla em inglês) designa o intervalo de radiação solar (de 400 a 700 nm) para a realização do processo fotossintético pelos

organismos. Devido à baixa capacidade de absorção dos meios de cultura em 450 a 650 nm, a clorofila é capaz de capturar em torno de 30 a 40% de PAR, porém a microalga pode otimizar a captura de luz através de outros pigmentos (Peter *et al*, 2010).

O crescimento dos microrganismos é proporcional a quantidade de luz recebida até certo valor máximo (fotolimitação), a partir deste a fotossíntese é inibida. Esse valor gira em torno de 1.700 a 2.000 $\mu E\ m^2 s^{-1}$ (Ruiz, 2011). No fotobiorreator fechado, um parâmetro importante em seu desenho é a distância de penetração da luz, pois nesses sistemas a luz decresce exponencialmente com a distância da fonte de luz. Isso pode caracterizar um problema, seja pela intensidade da radiação, a dispersão de luz na superfície do reator e a atenuação no meio de cultivo (Razzak, *et al* 2013).

A Figura 2.5 apresenta a curva de crescimento em resposta à disponibilidade de substrato no meio. Observa-se que a taxa inicial em resposta a disponibilidade de substrato é mais elevada, porém, as taxas decrescem no início do processo de saturação. Ao final não existe uma resposta da fotossíntese, pois as células estão saturadas e o fluxo de luz eleva-se muito acima da saturação, levando a fotoinibição.

Em relação ao uso da iluminação artificial nos cultivos, esta pode contribuir para uma produção contínua, porém com elevado custo econômico e energético. Para a seleção de luz artificial deve-se conhecer o espectro de absorção das algas, o qual depende dos pigmentos majoritários presentes na célula. Existem diferentes fontes de luz, como as lâmpadas fluorescentes, incandescentes, alógenas, e LEDs (emissão de 643 nm). Kommareddy e Anderson (2003) determinaram que estas últimas são mais eficientes e econômicas, uma vez que 98% da sua luz está torno de 600 e 700 nm.

A maioria das culturas de algas requer períodos alternados de luz e escuridão de 12/12 h a 16/8 h (Jeong e Lee 2013). Os períodos curtos podem gerar formação de cistos (os cistos de resistência em microalgas ocorrem através da reprodução sexuada quando as condições ambientais encontram-se desfavoráveis para as células vegetativas) (Balzer, 1991).

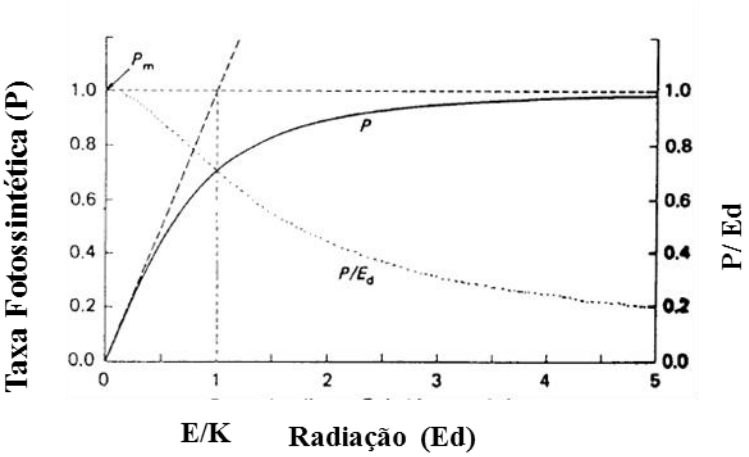


Figura 2.5.Curva ideal da taxa de fotossíntese específica (P) versus a radiância (Ed). Ilustração da máxima taxa de fotossíntese (Pm), e o início do parâmetro de saturação (E/k). Medida da eficiência da utilização da irradiância solar (P/Ed). *Fonte:Kirk, 1983.*

2.9.2 **Temperatura**

A temperatura é o segundo fator mais importante, tanto para sistemas abertos quanto fechados. Para os sistemas abertos, um incremento de temperatura é compensado com a evaporação de água, enquanto em sistemas fechados é necessária a refrigeração adicional em zonas quentes, onde a relação nível de luz e temperatura afeta a biomassa. Se a relação de temperatura máxima e mínima for muito grande é conveniente o uso do frio ou calor recuperado do mesmo processo ou de um processo industrial associado para manter um balanço favorável de energia (Ruiz, 2011).

Jaruwan *et al,* (2010), cultivaram a *Monoraphidium* sp. a 30 ºC com iluminação de 10 a12 kLux e aeração de CO_2 com 2%, em fotoperíodo de 10-8 h obtendo uma concentração de biomassa entre 3,56 g L^{-1} e uma produtividade de lipídio de 4,1 mg $L^{-1}d^{-1}$.

2.9.3 **pH**

O pH é um importante fator no meio de cultura, sendo controlado por meio da areação ou adição de CO_2. Na maioria dos casos as algas eucarióticas de água doce preferem ambientes ácidos (pH 5 - 7), enquanto cianobactérias preferem alcalinos (pH 7 - 9) (Rachlin, 1991). Um pH mais alcalino é favorecido pela presença de bicarbonato e carbonato e um pH mais ácido pela presencia de dióxido de carbono. Um estudo com

C*horella* vulgaris observou o crescimento celular em um intervalo de pH de 3 a 9 e levou à conclusão de que o crescimento máximo se dá em valores de pH na faixa de 7,5-8,0 (Pelczar e Chan, 1993). Desse modo, o pH na maioria dos cultivos de microalgas deve encontrar-se entre 7 e 9, com um ótimo entre 7 e 8 (Ruiz, 2011).

2.9.4 **Concentração de nutrientes**

Os seguintes nutrientes estão entre os principais consumidos pelas microalgas:

- Carbono: as microalgas podem tolerar até 150.000 ppm de CO_2 no ar, embora a *Chorella* sp. seja capaz de tolerar até 400.000 ppm. O carbono pode ser calculado por estequiometria de acordo com a composição da biomassa, resultando em um mínimo de 1,85 g CO_2 g^{-1} de biomassa. O consumo normal das microalgas gira em torno de 200 - 600 mg CO_2 $L^{-1}d^{-1}$, embora alguns resultados mostrem que a espécie *Chorella* sp. retira entre 800 - 1.000 mg L^{-1} d^{-1} (Ruiz, 2011).

- Nitrogênio: o Nitrogênio é mais comumente adicionado na forma de nitrato e amônia nas espécies de microalga. Estas geralmente absorvem o nitrogênio proveniente da ureia, amônia, nitrato, nitrito, nitrogênio gasoso, e óxidos de nitrogênio (NOx). Uma fonte mais barata deste elemento pode ser proveniente de águas residuais. O conteúdo de nitrogênio da biomassa pode estar entre 1 e 10%, dependendo da disponibilidade e da fonte.

- Fósforo: é um elemento importante e necessário para o crescimento das células e para o metabolismo das microalgas. O fósforo está presente no DNA, RNA, ATP e na membrana celular. Na fosforilação é essencial para a produção de ATP. A acumulação de lipídios pode ocorrer em baixas condições de consumo de fósforo. Em águas residuais, encontra-se na forma de ânions inorgânicos como Diidrogenofosfato (H_2PO_4) e fosfato de hidrogênio (HPO_4^{-2}) (Martinez, *et al* 1999).

As microalgas requerem outros macronutrientes, como enxofre, cálcio, magnésio e potássio para seu crescimento; assim como micronutrientes tais como molibdênio, ferro, níquel, cobre, cobalto, zinco, cloro, boro e manganês.

2.9.5 **Oxigênio (O_2)**

O oxigênio é um subproduto da fotossíntese, que em altas concentrações a inibe. Este fenômeno é conhecido como “o efeito warbug”. Essa inibição é favorecida pela alta radiação e temperatura, bem como pela deficiência de CO_2. Numerosas espécies de microalgas não conseguem viver em um meio saturado de oxigênio por mais de 2-3 horas. Em cultivos de alta densidade, a produção fotossintética pode alcançar até 40 mg L^{-1}, gerando radicais livres de oxigênio que são tóxicos para as células. A pressão parcial do oxigênio pode ser diminuída mediante o aumento da turbulência e a remoção do ar.

Aparentemente, existe um efeito combinado entre a temperatura e o oxigênio. Uma diminuição na temperatura de 35 ºC para 25 ºC, gera um aumento nas concentrações de oxigênio de 0,69 mM para 1,9 mM, com uma queda de 60% nas taxas fotossintéticas. Em fotobiorreatores fechados, a acumulação de oxigênio foi calculada, chegando a 4 mol $m^{-3}.h^{-1}$em um período de 20 a 30 min (Peter *et al*, 2010).

2.9.6 **Dióxido de carbono (CO_2)**

A assimilação de carbono é feita na membrana plasmática e é acumulado na forma de íons de bicarbonato, uma vez que a célula tem um caráter neutro no meio. Ao final, este é transformado pela enzima anidrase carbônica para fazer fotossíntese. No item 2.7 o processo de captura de CO_2 foi descrito.

2.10 Cultivos de microalgas

O cultivo de microalgas pode ser feito em sistema abertos ou fechados. Os sistemas abertos mais conhecidos são denominados de lagoas ou raceway, enquanto os fechados são chamados de fotobiorreatores.

2.10.1 **Sistemas abertos**

São relativamente fáceis de construir e operar, além de serem utilizados para grandes escalas de cultivo de microalgas. Classificam-se como: i) sistemas de água natural (lagoas, lagos, estanques) ii) águas artificiais (contêineres, tanques, lagos). Dependendo do uso existem diferentes formas, tamanhos e tipos:

a) Lagoas sem agitação: comercialmente utilizada para o cultivo de *Dunaliella* salina. Estes tipos de sistemas são comuns no sudeste da Ásia, onde em torno de

30 ton ano^{-1} de biomassa seca são cultivadas. São limitados já que são expostos ao crescimento de protozoários, bactérias e vírus.

b) Lagoas tipo Raceway: o sistema mais popular é o raceway paddle wheel mixed open ponds. Essas lagoas tem profundidade de 15 a 25 cm e a produtividade da biomassa neste tipo de cultivo é de 60 - 100 mg $L^{-1}d^{-1}$. São comumente utilizadas para cultivos comerciais das seguintes espécies: *Chlorella* sp., *Spirulina* platensis, *Hematococcus* sp. e *Dunaliella.* salina (Moheimani, 2006).

c) Lagoas circulares: são os sistemas de cultivo abertos mais antigos com profundidade de 20 a 30 cm. Neste caso, as microalgas com nutrientes são expostas ao sol, com borbulhamento de CO_2 e continuamente movida por rodas de pás. Na Figura 2.6 é possível observar os diferentes tipos de sistemas de cultivos abertos.

Figura 2.6.Sistemas de cultivos de microalgas abertos.

a) Lagoas sem agitação b) Lagoas tipo raceway c) Lagoas circulares.

Fonte:www.aquiculturaonline.com.br, 2015.

2.10.2 **Sistema fechados**

Conhecidos como fotobiorreatores, as principais vantagens deste tipo de sistemas são: minimização da evaporação de água; redução do crescimento de microorganismos contaminantes. Entre os diferentes tipos de fotobiorreatores, encontram-se os seguintes (Figura 2.7):

a) Fotobiorreator tubular: é construído com material transparente e exposto à luz solar. Uma das características deste tipo de desenho é sua grande área de superfície por unidade de volume. O diâmetro dos tubos é menor que 10 cm para garantir a penetração

de luz. O cultivo é circulado por meio dos tubos. Miyamoto e Wable, (1998), utilizaram esse tipo de fotobiorreator com 5 cm de diâmetro e 2,3 m de altura (4,5 L). A *Monoraphidium* sp. foi cultivada neste tipo de fotobiorreator e reportou 23 g $m^{-1}d^{-1}$.

b) Fotobiorreator de sacolas de plástico: as microalgas são cultivadas em sacolas de polietileno e as culturas de algas são misturadas com ar na parte inferior destes. A utilização de 50 L de cultura em sacolas gerou um rendimento de 20 a 30 g $m^{-3}d^{-1}$ de *Tetraselmis*.

c) Fotobiorreator placa plana: são relativamente baratos e fáceis de limpar (Ugwu Cu *et al*, 2008). Podem acomodar um volume de 1.000 a 2.000 L. Recomenda-se seu uso para o cultivo de microalgas em ambientes ao ar livre, apresentando as seguintes características: alta radiação na superfície da placa, desenho modular para scale-up e pequena acumulação de oxigênio dissolvido quando comparado ao fotobiorreator tubular (Pulz e Gerbsch, 1995).

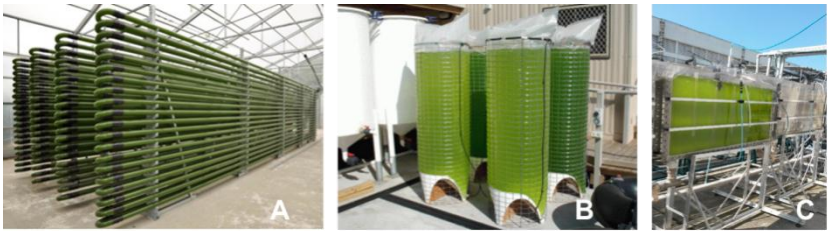


Figura 2.7.Sistema de cultivo de microalgas fechados.
Fotobiorreatores: a) tubular b) Sacos plásticos c) Placa plana.
Fonte:www.aquiculturaonline.com.br, 2015.

2.11 Concentração da biomassa microalgal

Entre os métodos de concentração da biomassa encontram-se: a centrifugação, filtração e floculação. Para Harun *et al*, (2010) a centrifugação é um excelente método para a separação da biomassa úmida, já que é rápida e eficiente, mas torna-se inviável para a recuperação em escala maior por conta dos custos energéticos e uso de equipamentos especializados.

A biomassa resultante do processo de concentração tem entre 5-20% de sólidos (Peter *et al*, 2010). Depois de realizada a colheita, o último passo é a secagem. Existem vários

métodos de secagem, entre estes encontram-se: spray-drying (secagem por atomização), sun drying (secagem ao sol), freeze drying (secagem por liofilização), vacuum drying (secagem por vácuo), entre outros. Uma vantagem do processamento da biomassa seca é a melhor percolação dos solventes na biomassa, o que gera um aumento na extração de lipídios. No entanto, a secagem não é considerada uma opção econômica para o pré-tratamento de biomassa na produção de biocombustíveis por conta do elevado consumo energético (Li, 2006). Na Figura 2.8 observa-se o diagrama de blocos para a produção de biomassa algal.

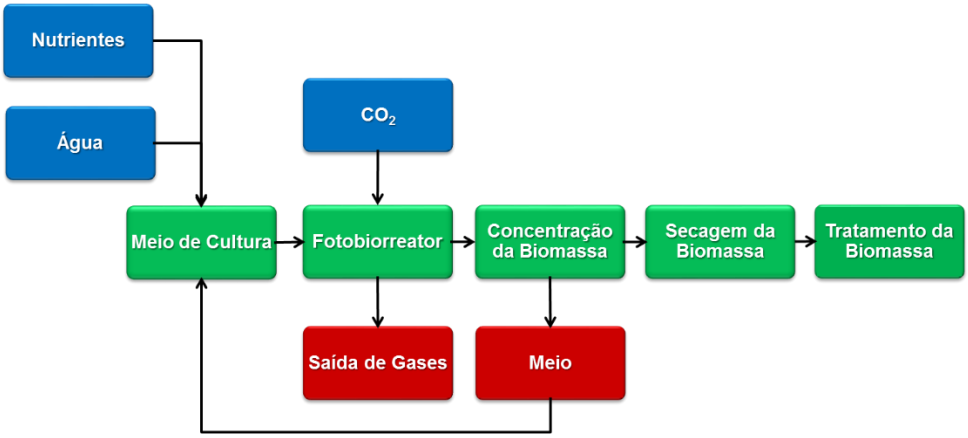


Figura 2.8.Diagrama de blocos para a produção de biomassa algal.

Fonte: Li, 2006

2.12 Lipídios

Os lipídios são ums dos componentes mais majoritários na microalga. Dependo da espécie, crescimento e condições, as microalgas contêm em torno de 2 a 60% de lipídios do total de peso seco. Os óleos derivados das microalgas têm sido de interesse, já que contêm ácidos graxos e triglicerídeos, componentes que podem ser transformados em ésteres (Razzak *et al*, 2013). Fatores como a concentração de nutrientes, salinidade, intensidade de luz, concentração de CO_2 e temperatura influenciam no teor de lipídios.

Os lipídios não polares (triglicerídeos) nas células de microalgas são compostos de carbono que armazenam energia. Por outro lado, fosfolipídios e glicolipídios são lipídios polares cuja função é a formação de células e membranas de cloroplastos. As matérias primas tradicionais empregam os lipídios não polares (triglicerídeos). Desse modo, os lipídios não polares são os produtos mais desejáveis das microalgas quando o fim é a produção de biocombustíveis. O teor de lipídios varia de acordo com a espécie de

microalga e com as condições de cultivo, porém seu valor mínimo está entre 4,5% e o máximo 80%. Na Tabela 2.4 observa-se que a adição de CO_2 aumenta a produtividade de biomassa e lipídios na microalga *Monoraphidium* sp.

Tabela 2.4.Efeito do CO_2 na produtividade de biomassa e lipídios na microalga *Monoraphidium* sp.

Parâmetros	**Com adição de CO_2**	**Sem adição de CO_2**
Teor de Lipídios (%)	28,9 ± 0,00	22,40 ± 0,15
Biomassa Seca (g L^{-1})	3,86 ± 0,31	1,87 ± 0,02
Produtividade da Biomassa (mg L^{-1} d^{-1})	241,61 ± 19.04	117,16 ± 1,42
Produtividade de Lipídios (mg L^{-1} d^{-1})	69,82 ± 5,52	26,25 ± 0,14

Fonte:Shrivastav, et al, 2015.

Wu e Chen (2013), em seu estudo com a espécie *Monoraphidium* sp. observaram que o teor de lipídios reduziu-se de 33 para 29 % com o aumento da temperatura de 25 para 35 ºC.

De acordo com Chisti, (2008) uma espécie de microalga requer, aproximadamente, 30% de lipídios em peso seco para ser utilizada como matéria-prima para produzir biodiesel.

2.12.1 **Métodos de extração**

O rompimento celular pode ser realizado utilizando métodos químicos, físicos ou a combinação de ambos. Este rompimento é necessário para a recuperação dos componentes de interesse, tais como: lipídios, hidrocarbonetos, carboidratos, antioxidantes e proteínas, que podem ser utilizados na produção de biocombustíveis ou na indústria de alimentos.

A literatura reporta diversos processos de rompimento celular, tais como: congelamento, choque osmótico, sonicação, homogeneização de alta pressão, moagem usando esferas,

além de processos termo-químicos, como a extração com solvente orgânico (alcalino ou ácido), extração com fluído supercrítico e o rompimento por temperatura (hidrólise térmica) (Razzak *et al*, 2013).

A seguir são explicados algums destes métodos:

a) Extração com fluido supercrítico: de acordo com a literatura este método pode extrair quase 100% de toda a fração apolar. Não entanto, necessita de equipamento especial por trabalhar a elevadas pressões. Neste processo utiliza-se CO_2, que é liquefeito sob pressão e aquecido ao ponto supercrítico, estado no qual tem as propriedades de um líquido e de um gás. Este fluido em estado líquido atua como poderoso solvente para extração da fração apolar (Halim *et al*, 2012). Esta metodologia evita o consumo de grandes quantidades de solventes orgânicos, que são frecuentemente caros e pontecialmente prejudiciais.

b) Extração enzimática: processo que utiliza enzimas para degradar a parede celular da microalga, liberando os componetes internos no meio aquoso. Este método é mais caro que a extração com solventes orgânicos (Mercer & Armenta, 2011). Porém evita emissões de CO_2 e gases de efeito estufa.

c) Choque osmótico:este método causa a ruptura da parede celular das microalgas em solução, por meio de uma redução repentina na pressão osmótica. As células são mantidas em equilíbrio num meio de alta pressão osmótica; em seguida, o meio é diluido, gerando a entrada de água na microalgas, aumentando a pressão interna e causando a ruptura das paredes celulares (González *et al*, 2009).

d) Extração por solvente: os componentes de interesse podem ser extraídos das microalgas usando solventes químicos, tais como: cloroformio, metanol, ácido clorídrico e éter etílico, inclusive pode ser utilizada a combinação de dois solventes (polar e não polar) (Mercer & Armenta, 2011). O principal problema do uso de solventes está nos riscos envolvidos na manipulação dos produtos químicos. Ao final da extração o solvente pode ser recuperado por destilação.

Neto *et al*, (2013) estudaram a extração de lipídios por sonicação como pré-tratamento na ruptura celular, seguido por agitação no vórtex e n-hexano com solvente extrator. Este método permitiu uma maior extração de lípidos na biomassa de microalgas ao comparar-se com o uso apenas de hexano. De acordo com a literatura a extração de lípidos com ultrassom-assistido reduz tanto o tempo de extração como o consumo de solventes, ajudando na penetração dos solventes na estrutura célular.

Vieira, (2015) realizou a extração de lipídeos da biomassa liofilizada de *Chlorella* sp., utilizando diferentes procedimentos para rompimento celular em reator tipo autoclave ou em moinho de bolas. Seguido da extração com solventes de diferentes polaridades (clorofórmio:metanol (2:1 v/v), etanol, metanol e hexano) e submetendo a mistura à agitação magnética. Os melhores resultados foram obtidos da mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v) sem pré-tratamento, foram extraídos em média, a partir da biomassa liofilizada, 12 % de lipídeos totais. Este valor aumentou para cerca de 14 % quando a amostra foi submetida ao pré-tratamento em moinho de bolas sendo comparável ao resultado obtido na presença de etanol sob pressão em reator tipo autoclave (14 %).

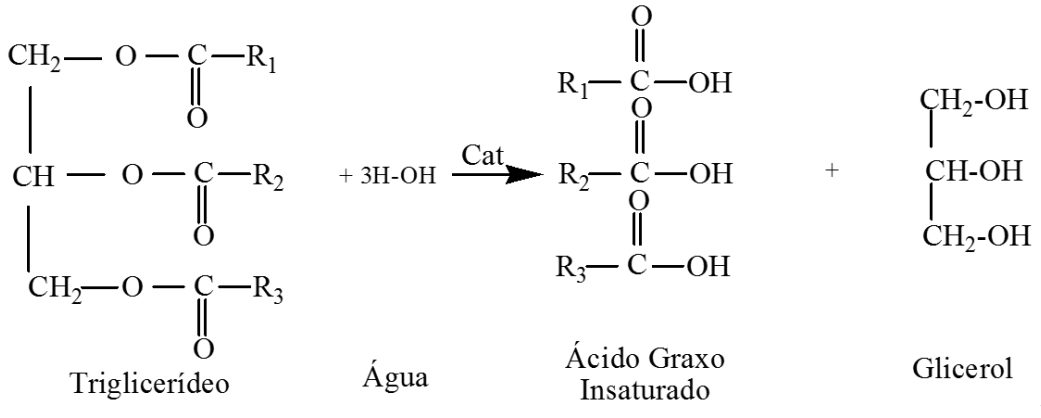
A fração apolar extraída da biomassa úmida de microalgas, a partir do processo de cozimento em temperaturas inferiores a 100 ºC, é formada principalmente pelos componentes apolares presentes nas células de microalgas, tais como: triglicerídeos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, antioxidantes e hidrocarbonetos (Almarales, 2012). Esta mistura é comunmente denominada de bio-óleo.

2.13 Tecnologias de produção de hidrocarbonetos renováveis a partir de bio-óleo

Os processos mais conhecidos de conversão do bio-óleo em hidrocarbonetos renováveis são as reações de Fischer-Tropsch, a partir do gás de síntese (mistura H_2 : CO) produzido por gaseificação do bio-óleo, processo de hidrólise combinado com processos de hidrodesoxigenação (HDO) e hidrotratamento (Citado por Perlingeiro, 2014)

O processo de Fischer- Tropsch, apesar de ser bem conhecido, não é amplamente utilizado por ser oneroso e ainda pouco competitivo, especialmente no Brasil, em que outras rotas parecem ser mais viáveis (Citado por Perlingeiro, 2014).

A hidrólise de triglicerídeos presentes no bio-óleo possibilita a obtenção de ácidos graxos e glicerol, conforme Figura 2.9 (Gunstone, 1967).



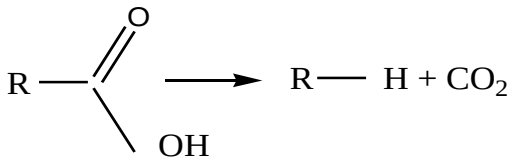
Eq. 2-7

Figura 2.9. Hidrólise de triglicerídeos: Mecanismo Geral.

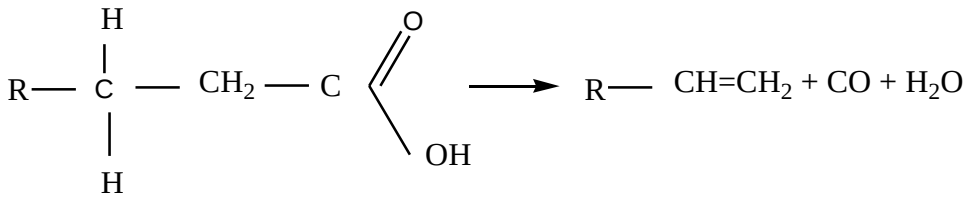
A reação procede em estágios, que ocorrem simultaneamente em velocidades diferentes. Nas reações de hidrólise, os triglicerídeos são convertidos para diglicerídeos e monoglicerídeos e estes em glicerol e ácidos graxos. Todas essas reações são reversíveis (Dieckelmann & Heinz, 1988).

Os ácidos graxos produzidos na etapa de hidrólise podem ser descarboxilados por meio de processos de hidrodesoxigenação.

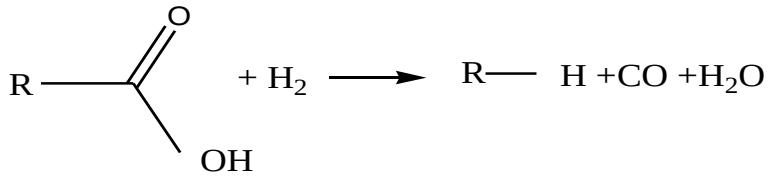
Processos similares de hidrodesoxigenação (HDO) para a produção de hidrocarbonetos renováveis são descritos na literatura (Ono, 2006) (Reaume, *et al*, 2012). Nestes processos, apresentados na Figura 2.10, óleos, gorduras e bio-óleo, constituídos basicamente por triglicerídeos e ácidos graxos, moléculas com altos teores de de oxigênio, são submetidas a altas pressões de H_2 e elevadas temperaturas, na presença de catalisadores metálicos, promovendo a desoxigenação.



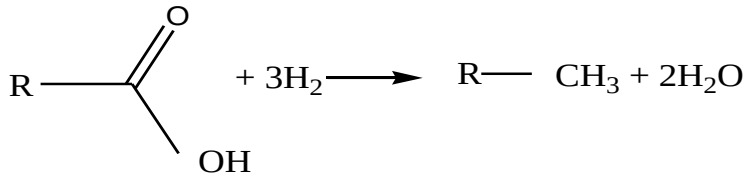
Eq. 2-8



Eq. 2-9



Eq.2-10



Eq. 2-11

Figura 2.10. Rota de HDO para produção de hidrocarbonetos renováveis.
Via: descarboxilação 2.8, descarbonilação 2.9 e 2.10 e desidratação 2.11.
Fonte: Citado por Perlingeir, 2014

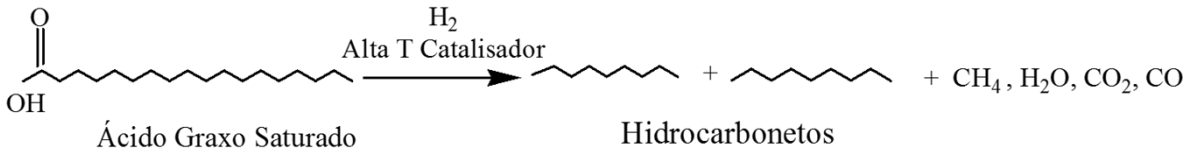
Ao fim do processo de HDO, são produzidas n-parafinas idênticas as presentes no diesel petroquímico, além do propano. Durante o processo, podem ocorrer reações de descarboxilação (Equação 2.9), descarbonilação (Equação 2.10 e 2.11) ou desidratação (Equação 2.11).

Como pode ser observado na Equação 2.8, na descarboxilação são produzidos hidrocarbonetos com N-1 átomos de carbono, onde N é o número de átomos de carbono dos ácidos graxos de partida. Durante a descarbonilação (Equações 2.9 e 2.10), são formados alcenos com N-1 átomos, além de CO e H_2O. Por outro lado, nas reações de desidratação, são formados alcanos com N átomos de carbono e moléculas de água, conforme mostra a Equação 2.11.

Processos de hidrotratamento são amplamente utilizados em refinarias para melhorar as propriedades dos produtos sem alterar muito a faixa de destilação original. Em geral, estes processos são capazes de retirar heteroátomos (S, N, O) das frações do petróleo, podendo ser aplicados aos derivados de biomassa. Assim, outra forma bastante interessante de se

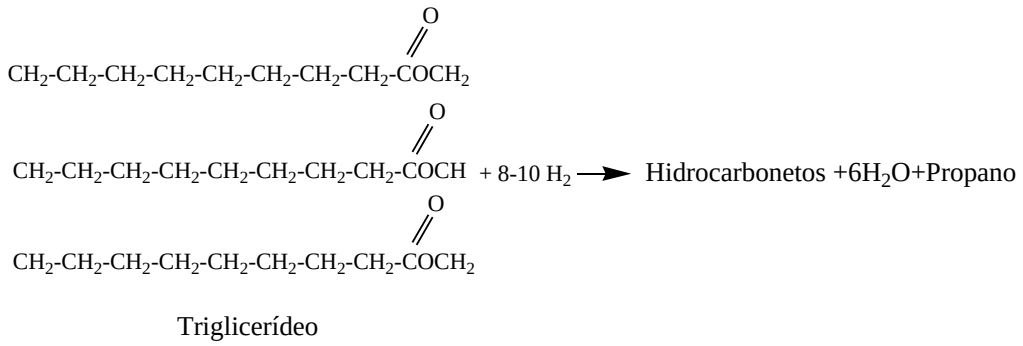
produzir hidrocarbonetos renováveis por meio do hidrotratamento de óleos, gorduras e bio-óleo (fração apolar extraída das microalgas) (Citado por Perlingeiro, 2014).

O processo de obtenção de hidrocarbonetos a partir de óleos e gorduras sob altas pressões de hidrogênio e na presença de catalisadores é chamado de hidrocraqueamento. Um esquema da reação de hidrocraqueamento de óleos e gorduras é mostrado na equação 2.12 (reação de hidrocraqueamento de triacilglicerídeos) cuja função do hidrogênio é a purificação da corrente de hidrocarboneto de enxofre e de hétero-átomos.



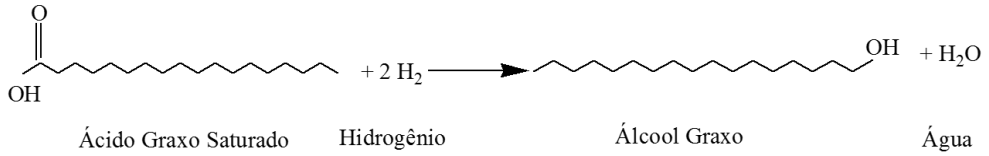
Eq. 2-12

Em 2006, a Petrobras patenteou o produto, conhecido como H-Bio. No processo desenvolvido, óleos e gorduras, juntamente com o óleo mineral, são submetidos à unidade de hidrotratamento e de lá se obtem um diesel de alta qualidade, constituído apenas de hidrocarbonetos (Prates, 2016). Um exemplo da reação de hidrotratamento é a reação de H-Bio (Equação 2-13), as condições são pressão > 50 atm, temperatura > 300 ºC na presença de catalisador.



Eq. 2-13

Outra das reações que ocorre em paralelo com as reações de hidrodesoxigenação é a reação de formação de álcool graxo a partir da hidrogenação dos ácidos graxos livres (Equação 2.14).



Eq. 2-14

Os álcoois graxos são álcoois primários com mais do 8 átomos de carbono na cadeia, que geralmente é linear. Em condições ambientes, os álcoois graxos que possuem de 8 a 11 átomos de carbono são líquidos oleosos e os que possuem acima de 11 átomos de carbono são sólidos.

Os álcoois graxos saturados mais importantes são o octílico ($C_8H_{17}OH$), o decílico ($C_{l0}H_{21}OH$), o laurílico ($C_{12}H_{23}OH$), miristíliico ($C_{14}H_{29}OH$), cetíliico ($C_{16}H_{33}OH$) e o estearílico ($C_{18}H_{37}OH$).

2.14 Produção de hidrogênio a partir do glicerol

A demanda de H_2 está aumentando devido à utilização em refinarias e indústrias químicas e também aos avanços técnicos na indústria de células a combustível. Portanto, é necessário encontrar uma fonte renovável de matéria-prima para a produção de H_2. Atualmente, quase 95% do H_2 é produzido a partir de matérias-primas fósseis baseada nos combustíveis que não são renováveis (Sushil, 2008).

O glicerol pode ser usado para produzir uma variedade de produtos químicos e combustíveis, incluindo o hidrogênio (Sushil, 2009).

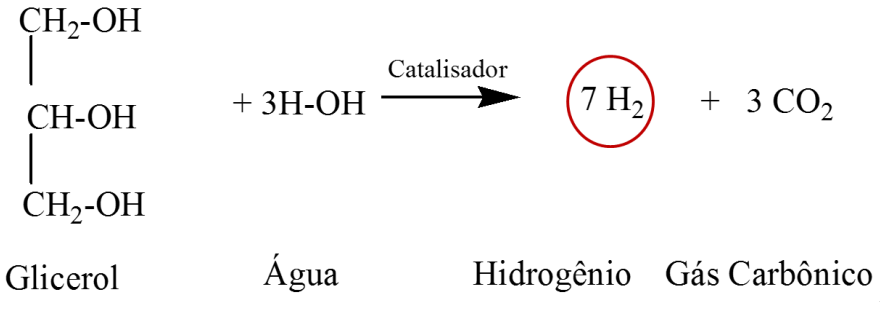
2.14.1 Reforma em fase líquida (APR – Aqueous Phase Reforming)

A reação de reforma em fase líquida (APR – Aqueous Phase Reforming) de orgânicos oxigenados se tornou uma alternativa atraente para a produção de hidrogênio devido às várias ventagens em relação aos métodos tradicionais. As principais ventagens estão relacionadas à economia de energia, pois não há necessidade de vaporização dos reagentes e pelo fato da reação ser conduzida em temperaturas moderadas, em torno de 250 – 270 ºC em comparação com a reforma a vapor que opera em temperaturas superiores a 500 °C. A operação entre 250ºC e 270ºC evita reações paralelas de decomposição dos compostos oxigenados e ainda favorece a reação de *shift*, tornando possível a geração de hidrogênio com baixa concentração de monóxido de carbono.

O processo de reforma em fase líquida do glicerol foi referenciado a partir das reações de hidrólise e hidrogenação simultanea de óleos e gorduras. O qual envolve basicamente três reações conforme as seguintes equações: a reação de hidrólise de óleo e gordura (Eq. 2.7), reação de APR do glicerol (Eq. 2.15) e a reação de hidrogenação (Eq.2.16).

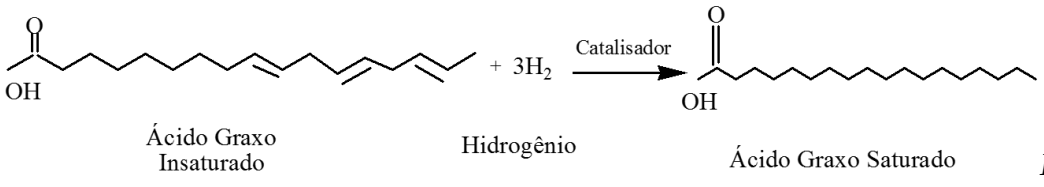
Reação 1. Hidrólise de óleo e gordura: na presença de catalisadores heterogêneos ácidos os prótons (H^+) da água se ligam ao oxigênio da carbonila e tornam a molécula vulnerável ao ataque nucleofílico pela água gerando ácidos graxos e glicerol. Está reação pode ser observada na Figura 2.9.

Reação 2. APR do glicerol: o glicerol gerado na hidrólise, ao estar em contato com o catalisador, sofre a reação de reforma em fase líquida, produzindo gás hidrogênio.



Eq. 2-15

Reação 3. Hidrogenação: o hidrogênio gerado na reação 2 hidrogena as duplas ligações da cadeia carbônica dos ácidos graxos, formando ácidos graxos saturados.



Eq. 2-16

Navarro *et al.*, (2008) estudaram APR de glicerol em catalisadores de Ni suportados em alumina com vários promotores, tais como, Ce, Mg, Zr e La. Os catalisadores de Ni sofreram desativação grave e a razão era a transformação gradual do estado metálico para o estado oxidado. A maior conversão de glicerol (37%) foi conseguida com catalisadores promovidos com lantânio.

Díaz, (2012), em seu estudo avaliou a reação de hidrólise e hidrogenação simultânea de óleo de soja e sebo bovino – efeito do metal suportado, para obtenção de ácidos graxos saturados. Os resultados mostraram uma conversão de ácidos graxos superior a 85%. Assim, a reforma catalítica do glicerol permitiu a geração in-situ de hidrogênio, que é atraído e reage rapidamente com as ligações duplas, transformando os ácidos insaturados (linolênico, linoléico e oléico) em ácido esteárico.

2.15 Catalisadores utilizados no processo de HDO

Diferentes catalisadores têm sido testados no hidrotratamento de bio-óleo incluindo Ru/C Pd/C, Ni-Cu/Al_2O_3, Ni-Cu/SiO_2, Ru/TiO_2, Ru/Al_2O_3, CoMo/γ Al_2O_3, e NiMo/Al_2O_3 (Saber, *et al*, 2015). Os catalisadores de sulfatos-óxidos, tais como Co-MoS_2 e Ni-MoS_2 têm sido alguns dos mais frequentes testados para a reação de HDO, já que estes são também utilizados no processo de hidrotratamento tradicional.

O hidrotratamento do bio-óleo de microalgas tem chamado a atenção recentemente. Li & Savage, (2013) investigaram o tratamento de bio-óleo de microalgas sobre HZSM-5. Assim, o bio-óleo de microalgas, produzido a partir de liquefação hidrotermal de *Nannochloropsis* sp. reage sobre o catalisador HZSM-5 com alta pressão de H_2. O tratamento reduziu muito os heteroátomos (N, O, e S) contidos no bio-óleo. Também mostrou que a temperatura da reação teve uma influência considerável sobre a composição do bio-óleo melhorado.

Um aspecto importante na reação HDO é o consumo de hidrogénio. Venderbosch *et al.*; (2010) investigaram o consumo de hidrogénio durante o melhoramento do bio-óleo em função da velocidade de desoxigenação sobre o catalisador de Ru/C, num reator de leito fixo. Os resultados reportaram que o consumo de hidrogénio torna-se cada vez mais acentuado em função do grau de desoxigenação.

Segundo Wildschut, (2009), a desativação do catalisador é um dos problemas mais acentuados no processo de HDO, a qual pode ocorrer por envenenamento (espécies nitrogenadas e água), por deposição de metal (metais alcalinos, especificamente) ou por coque. Outro problema é a formação do carbono, principalmente devido às reações de

polimerização e policondensação na superfície do catalisador, formando espécies poliaromaticas, porém isto bloqueia os sítios ativos do catalisador.

A fim de minimizar a formação de carbono, podem ser tomadas outras medidas como, o uso de hidrogênio, uma vez que converte os precursores de carbono em moléculas estáveis (alcenos) por saturação das espécies adsorvidas na superfície (Furimsky, 1999).

De acordo com a literatura, a temperatura também afeta a formação de carbono. As temperaturas elevadas, a velocidade de hidrogenação aumenta, o que origina um aumento na taxa de policondensados. Portanto, um aumento da temperatura da reação leva a um aumento da formação de carbono.

2.15.1 **Os metais de transição como catalisadores**

A hidrogenação catalítica seletiva também pode ser realizada com catalisadores de metais de transição. Na Figura 2.11 é exemplificado o mecanismo, em que a adsorção e a ativação dos oxicompostos tomam lugar no suporte.

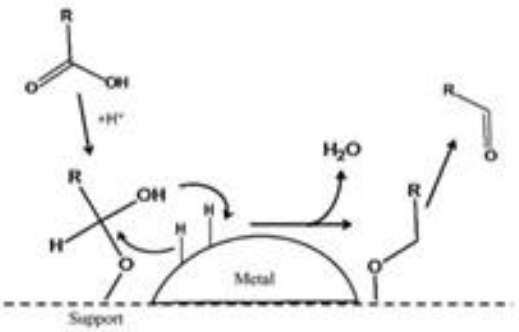


Figura 2.11.Mecanismo de HDO sobre catalisadores de metais de transição.

Fonte:Mendes, et al, 2001.

Geralmente, os metais constituem os sítios doadores de hidrogênio, mas a ativação dos oxicompostos pode ser facilitada, tanto nos sítios metálicos quanto na interface do suporte metálico.

Segundo Ayodele, *et al.*, (2014), a catálise a base de níquel apresenta alta atividade para a hidrodesoxigenação, contudo, a presença do conteúdo de água é prejudicial para o catalisador ácido γ-Al_2O_3 ou para aquele suportado em zeólita, os quais são os principais

suportes para a refinação catalítica do petróleo na remoção de enxofre, oxigênio e nitrogênio. Recentes pesquisas mostram que a polimerização de aldeídos é uma das responsáveis principais pela coqueificação e pelos baixos rendimentos de hidrocarbonetos durante a HDO.

Os catalisadores de metais nobres Ru/C, Pd/C e Pt/C foram investigados para HDO de bio-óleo proveniente da madeira num reator descontínuo em 350 ºC e 200 bar, ao longo de 4 h. Ru/C e Pd/C resultaram ser bons catalisadores para o processo, já que exibiram um alto grau de desoxigenação e rendimentos elevados, ao serem comparados com o Co-MoS_2/Al_2O_3 e Ni-MoS_2/Al_2O_3 (Wildschut *et al;* 2009).

Em suma, os catalisadores de metais nobres Ru, Rh, Pd, e Pt são catalisadores potenciais para a síntese de HDO, porém o alto preço dos metais os torna poucos atraentes.Como alternativa aos catalisadores de metais nobres, têm sido estudados os catalisadores a base de metais básicos, uma vez que estes são consideravelmente menos custosos.

2.15.2 **Suportes de catalisadores**

A seleção do material de suporte é um aspecto importante na formulação de catalisadores para a HDO. Existem catalisadores em que a fase ativa está dispersa num suporte inerte (sílica, alumina activada), outros que têm uma segunda fase ativa (aluminas ácidas, silica-aluminas, zeólitas) e outros que são bifuncionais (Pt/Al; Pd/Y; Cu/ZSM-5).

Estudos demostraram que Al_2O_3 é um suporte inadequado, uma vez que, na presença de grandes quantidades de água, pode produzir boemita (AlOOH). Os suportes mais comumente recomendados são a ɣ-Al_2O_3, com área especifica variando entre 100 e 300 $m^2\ g^{-1}$.

Como uma alternativa a Al_2O_3, o carbono foi considerado um suporte promissor. Uma das vantagens do carbono neutral é que a formação de carbono é baixa, quando comparada com a Al_2O_3.Também o SiO_2 tem sido indicado como um suporte potencial para a HDO (Cao, *et al*, 2010).

O óxido de zircônio (ZrO_2) e óxido de césio (CeO_2) também têm sido identificados por seu bom desempenho. O óxido de zircônio (ZrO_2) é menos ácido do que Al_2O_3, contudo,

ambos apresentam-se atraentes para ativar os compostos oxigenados na superfície e, assim, aumentar a atividade (Cao, *et al.*, 2009).

Portanto, para a escolha do suporte, deve-se considerar a baixa afinidade para a formação de carbono, a qual está correlacionada com a acidez e com a capacidade de ativar oxicompostos.

Outro aspeito importante nos catalisadores suportados é a preparação. Entre as principais operações envolvidas encontram-se: preparação do suporte, impregnação (fase ativa no suporte), filtragem e secagem, calcinação (decomposição de compostos de partida) e redução (espécie metálica).

Segundo Nele, *et al*, (2007), o processo de redução do catalisador permite que este tome sua forma ativa, por isso essa etapa é também denominada de ativação. Neste processo são formadas características importantes do catalisador, como quantidade e dispersão de espécies ativas sobre o suporte. A execução incorreta da redução pode levar a um desempenho inferior e a uma menor vida útil do catalisador.

Capítulo 3. Materiais e métodos

Etapa 1: Absorção de CO_2 pela microalga *Monoraphidium* sp., em fotobiorreator fechado tipo Janela.

3.1 Microalga *Monoraphidium* sp.

Para a realização do experimento, utilizou-se a cepa da microalga *Monoraphidium* sp. conforme Figura 3.1, cedida pelo Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ.

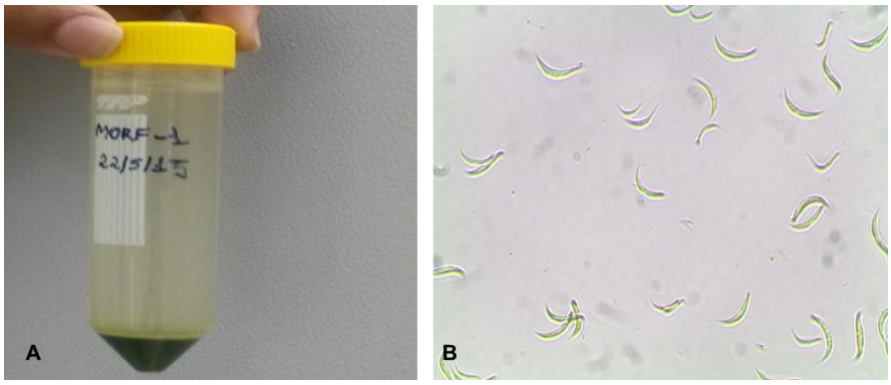


Figura 3.1. (A) Inóculo da cepa *Monoraphidium sp*. (MORF-01); (B). Imagem da microalga *Monoraphidium* sp. observada através do microscópio óptico Olympus BX com aumento 100 X.

3.2 Meio de cultivo para o repique e multiplicação da microalga *Monoraphidium* sp

O meio utilizado para o repique e multiplicação da microalga estudada foi o ASM-1 Gorham *et al.*, (1964), o qual é utilizado no Laboratório GreenTec no cultivo de diversas linhagens de microalgas de água doce com resultados satisfatórios. Fernandes, (2014) efectuo o escalonamento do cultivo fotoautrófico das microalgas *Monoraphidium* sp e *Scenedesmus* sp utilizando o meio ASM-1 para produção de biodiesel. O cultivo foi realizado em fotobiorreatores do tipo janela, obtendo-se um teor lipídico e uma produtividade de biomassa seca de 21,5 % e 100,36 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ respectivamente, para a *Monoraphidium* sp., e de 15,50 % e 94,50 $mg.L^{-1}.d^{-1}$, para *Scenedesmus* sp. Os resultados obtidos confirmaram a eficiência de crescimento desta microalga no meio ASM-1.

Sandoval, (2015) cultivou a microalga *Desmodesmus* sp. durante 15 dias. O experimento apresentou maior crescimento celular utilizando o meio de cultivo BOLD 3N e intensidade luminosa 250 µmol fótons $m^{-2}.s^{-1}$, obtendo-se resultados de $4{,}00x10^{7}$ $cel.mL^{-1}$. No entanto o resultado mais baixo foi obtido usando o meio de cultivo ASM-1 e uma intensidade luminosa de 100 µmol fótons $m^{-2}.s^{-1}$. Vale salientar que o uso do meio BOLD 3N não apresentou diferença no teor de lipídeos quando comparado com os resultados obtidos com o meio ASM-1 e BG-11.

A quantidade em grama por litro (g/L) e o pH para cada solução estoque utilizada no preparo do meio para o cultivo no fotobiorreator de 110 L são apresentadas na Tabela 3.1. Estas soluções foram adicionadas em um garrafão de 20 L avolumando com água tratada em sistema MilliQ® registrado pela Millipore Corporation. Ao final, a solução foi esterilizada em autoclave vertical de 1,5 kgf cm^2 de pressão a 120 ºC durante 20 min.

Tabela 3.1.Composição e concentração das soluções de estoque do meio ASM-1.

Solução de Estoque A, pH 4	**Quantidade (g/L)**
$NaNO_3$	8,50
$MgSO_4.7H_2O$	2,45
$MgCl_2.6H_2O$	2,05
$CaCl_2.2H_2O$	1,45
Solução de Estoque B, pH 6,5	**Quantidade (g/L)**
KH_2PO_4	8,70
$Na_2HPO_4.2H_2O$	17,78
Solução de Estoque C, pH 2	**Quantidade (g/L)**
$FeCl_3$	6,50
H_3BO_3	24,80
$MnCl_2.4H_2O$	13,90
$ZnCl_2$	3,35
$CoCl_2.6H_2O$	0,19
CuCl	0,014
Solução de Estoque D, pH 2	**Quantidade (g/L)**
$Na_2EDTA.2H_2O$	20,60

3.3 Escalonamento do cultivo da microalga *Monoraphidium* sp.

Para o escalonamento do cultivo da microalga *Monoraphidium* sp., foram realizadas quatro transferências (Figura 3.2). Iniciou-se com o inoculo da cepa de *Monoraphidium* sp., previamente mantida em meio ASM-1, sob pH 7, iluminação de 170 µfótons. $m^{-2}. s^{-1}$ e temperatura de 23 ºC, em erlenmeyer de 250 mL (cultivo de ativação), seguido da transferência para um segundo erlenmeyer de 2 L e posteriormente para um garrafão transparente de 20 L. Ao fim, o cultivo do garrafão é usado como inoculo no fotobiorreator fechado tipo janela de 110 L onde é monitorado o consumo de CO_2 e o crescimento celular.

Figura 3.2. Etapas do escalonamento da microalga *Monoraphidium* sp.

3.3.1 **Cultivo em erlenmeyer de 250 mL**

Parte das células mantidas em incubadora, sob condições controladas, foram utilizadas como inóculo para o cultivo de ativação, realizado em erlenmeyer de 250 mL (Figura 3.3) com 180 mL de meio ASM-1 (pH = 7) e 20 mL inoculo de *Monoraphidium* sp. O cultivo foi realizado por um período de 5 dias, sob aproximadamente 400 µfótons. m^{-2}. s^{-1} de luz, 1 L ar min^{-1} e 23 ± 2 ºC. Conforme ao estudo realizado por Silva, (2014), utilizando o meio ASM-1 para o cultivo fototrófico com o foco de otimizar as condições de culivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a utilização de seu óleo na produção de biodiesel.

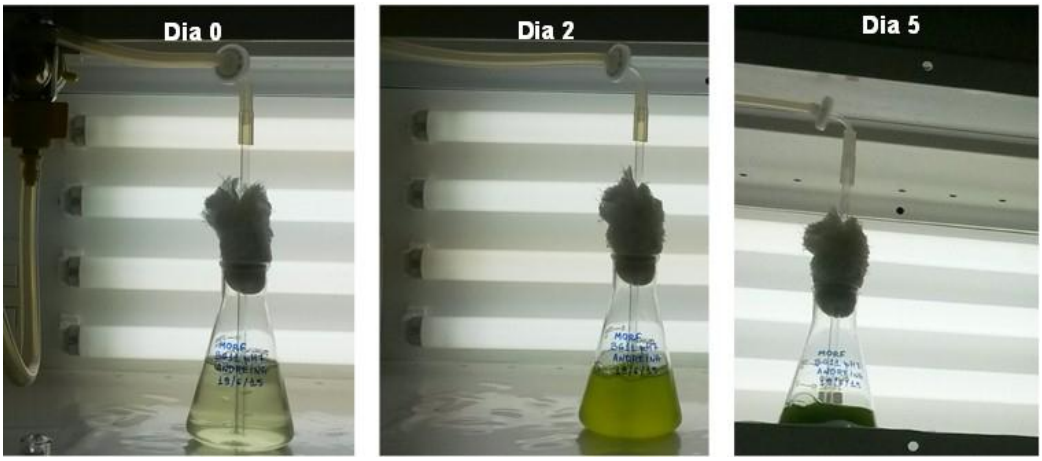


Figura 3.3. Crescimento da microalga *Monoraphidium* sp. em erlenmeyer de 250 mL.

3.3.2 **Cultivo em erlenmeyer de 2 L**

Após cinco (5) dias de crescimento no erlenmeyer de 250 mL, os 200 mL de cultivo foram utilizados como inóculo para o cultivo no erlenmeyer de 2 L, suplementando com 1,6 L do mesmo meio de cultura (Figura 3.4).

O cultivo no erlemeyer de 2 L foi realizado também por um período de cinco dias, em temperatura de 23 ± 2 ºC, iluminação de aproximadamente 400 µfótons.m^{-2}.s^{-1},

mensurado com Medidor de Radiação Fotossinteticamente Ativo (PAR) - modelo QSL 2101, software LOGGER 2100 da Biospherical Instruments Inc., usando fotoperíodo de 12-12 h (claro e escuro), fluxo de ar de 1 L min^{-1}. Nessas condições consiguiu-se, ao final do quinto dia, uma concentração celular de 1,435 x 10^8 cel mL^{-1}, determinada por contagem direta em câmara de Fuchs-Rosenthal, fabricada em vidro ótico especial, acompanhada de duas lamínulas de 20 x 26 x 0,4 mm, com profundidade de 0,2 mm (Razzak *et al*., 2013).

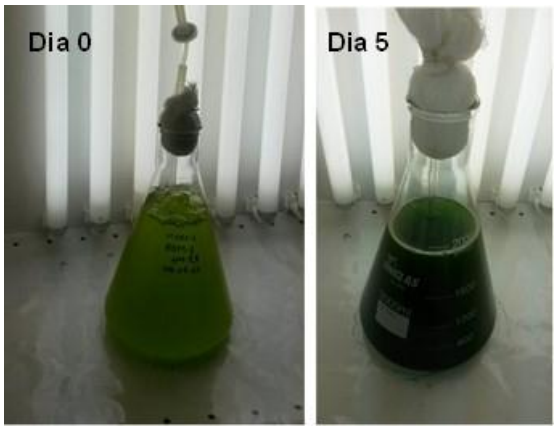


Figura 3.4. Cultivo da microalga *Monoraphidium* sp.em erlemeyer de 2 L.

3.3.3 **Cultivo em garrafão de 20 L**

As células cultivadas no erlenmeyer de 2 L foram utilizadas como inoculo ao garrafão de 20 L. Neste caso, suplementou-se com 17,2 L de meio de cultura ASM-1. O cultivo foi realizado também por um período de cinco dias (5), em temperatura de 23 ± 2 ºC iluminação de aproximadamente 400 mol fótons m^{-2} s^{-1} e fluxo de ar de 3 L min^{-1}, a concentração celular depois de cinco dias de cultivo foi de 1,28 x107 cel mL^{-1} (Figura 3.5). Estas condições foram de acordo com o estudo realizado por Silva, (2014) para o cultivo de *Scenedesmus* sp.

O cultivo de microalgas do garrafão de 20 L foi usado como inóculo ao fotobiorreator de janela de 110 L onde foi realizado o monitoramento do consumo de CO_2 na microalga, *Monoraphidium* sp. crescendo em condições ambientais do Rio de Janeiro entre 20 -35 ºC.

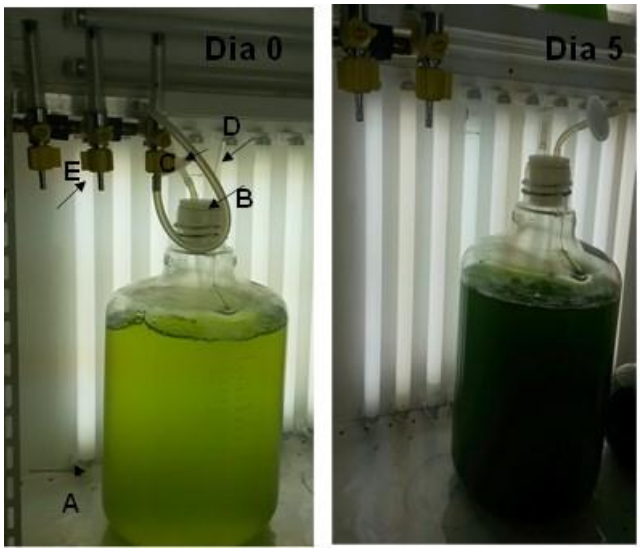


Figura 3.5. Cultivo de *Monoraphidium* sp.no garrafão de 20 L.
A. Garrafão de 20 L; B. Rolha de silicone; C. Mangueira para entrada de ar e filtro; D. Saída do ar; E. fluxômetro.

3.3.4 **Inóculo no fotobiorreator fechado tipo Janela de 110 L**

Após cinco dias foi realizado o inóculo no fotobiorreator plano de 110 L, adicionando-se 20 L de meio de cultura, 60 L de meio ASM-1 e 10 L de água Milli-Q para avolumar. Iniciou-se o cultivo com uma concentração de 6,05 x10^6 cel mL^{-1} e considerou-se um fluxo de ar em torno de 1 a 7 L min^{-1}, com fluxo constante de dióxido de carbono (CO_2) de 1 L min^{-1} e pH entre 7,0 a 8,0 Figura 3.6. Todos os inóculos realizados foram preparados e avolumados diariamente com água ultrapura Milli-Q®.

Silva, (2014), cultivou a microlaga *Scenedesmus* sp. em bateladas simples realizada em uma serie de fotobiorreatores com uma concentração de 4,51x10^6 céls mL^{-1}. Foram diluidos 72 L de inóculo 1:15, adicionando 1.026 L de água corrente tratada e 20 L de meio ASM-1 com nutrientes concentrados para o volume final de 1.100 L. O proceso foi controlado automaticamente a uma temperatura máxima de 30 °C, pH 8,0 mediante injeção de CO_2, aeração de 1 L min^{-1} em cada reator e sob radiação solar.

Figura 3.6. Inóculo de *Monoraphidium* sp.no fotobiorreator de janela de 110 L.

3.4 Características do sistema de cultivo utilizado no monitoramento do consumo de CO_2.

3.4.1 Fotobiorreator de 110 L

O fotobiorreator de janela utilizado neste estudo está instalado na planta piloto do Laboratório Greentec, localizada na cobertura do Núcleo de Excelência em Petróleo e Biocombustíveis da Escola de Química/UFRJ (Figuras 3.7, 3.8). A seguir relacionam-se as características deste cultivador:

- Construído em policarbonato (5 mm de espessura) com as seguintes dimensões: 1,2 m de largura, 0,8 m de altura e 11 cm de espessura, contendo aletas internas e tampa superior;
- Sistema automatizado de controle de pH, por injeção de CO_2 em três pontos do interior do fotobiorreator, usando difusores que garantem a injeção do gás em forma de micro bolhas, facilitando sua diluição na água;
- Sistema de injeção de ar, através de um tubo de aço inox horizontal instalado no fundo do fotobiorreator, com o objetivo de aumentar a turbulência, evitando a deposição das células e aumentando o contato do líquido com o CO_2;
- Sistema de controle automático de temperatura:

  Neste teste não foi utilizado este sistema porque durante o período de teste a temperatura se manteve abaixo dos 35 ºC. Segundo a literatura (Holbrok, *et al*.,

2013), a microalga *Monoraphidium* sp. tem elevada produtividade de biomassa em temperaturas entre 20 – 35 ºC.

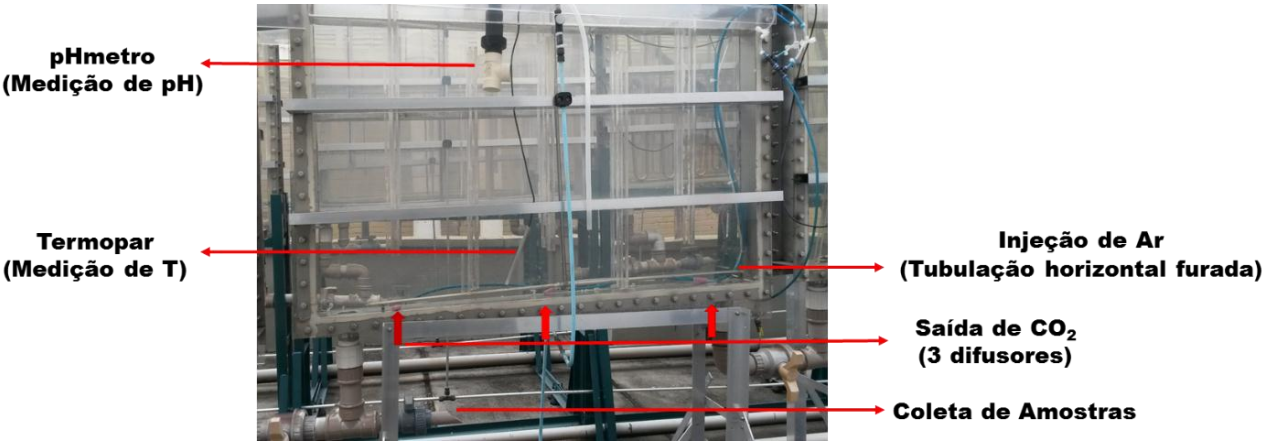


Figura 3.7. Partes do fotobiorreator de 110 L.

Figura 3.8. Painel de controle.

O cultivo da microalga *Monoraphidium* sp. neste cultivador foi realizado durante um período de 12 dias, já que o foco deste estudo foi medir a absorção de CO_2. Portanto em cultivos em bateladas o aumento do consumo de CO_2 acontece nos primeiros dias de cultivo, após esse consumo começa a diminuir.

3.4.2 Controle automático de pH por injeção de CO_2 monitoramento de CO_2

Nos horários de maior radiação solar, o processo de fotossíntese se intensifica, aumentando o consumo de CO_2, conforme explicado por (Fortes, 2015). A deficiência de

CO_2 livre, nesse período, aumenta o pH do meio provocando autofloculação das células (Richmond, 2004). Este problema é solucionado com a inclusão de um sistema automatizado de controle de pH por injeção de CO_2 no fotobiorreator.

O sistema de controle de pH utilizado está composto por um eletrodo, o qual permanece imerso no cultivo para medição contínua do pH, um controlador, responsável pelo acionamento automático de uma válvula solenóide, e uma válvula solenóide que libera CO_2 no cultivo (Figura 3.7 e 3.8).

Neste estudo foi utilizado CO_2 ultrapuro (99,95%) de um cilindro de 30 kg e pressão de 1,5 Kg-f cm^{-2} (Figura 3.9), injetado com vazão constante de 1 L min^{-1}, controlada por meio de rotâmetro. A injeção do CO_2 foi realizada em três pontos do interior do fotobiorreator, usando difusores que garantem a injeção do gás em forma de micro bolhas.

O eletrodo de pH é previamente calibrado com solução tampão de pH 10.

O monitoramento do consumo de CO_2, considerando que é consumido nos horários em que as células estão realizando o processo de fotossíntese, foi realizado no intervalo das 8:00 às 20:00 h, quantificando nesse intervalo o número de vezes em que o sistema injetava CO_2 e o tempo de injeção. Dessa forma, como o CO_2 sempre era injetado com vazão constante (1 L min^{-1}) foi posssível determinar seu consumo no período monitorado.

Além do consumo de CO_2 (em g dia^{-1}) outros parâmetros foram medidos diariamente durante o tempo de cultivo, como: a temperatura (°C), iluminação (µfótons.m^{-2}.s^{-1}), pH, densidade celular (cel.mL^{-1}) e biomassa seca, esta última analisada em triplicata.

Figura 3.9. Cilindro de injeção de CO_2 e manômetro com pressão de 1,5 Kg-f cm^{-2}.

3.4.3 **Temperatura**

A temperatura do cultivo foi medida em graus célsius (°C), usando termopar imerso no cultivo (Figura 3.7), e registrada no painel de controle que acompanha o fotobiorreator (Figura 3.8). Monitorada nos seguintes horários: 8:00 h, 10:00 h, 12:00 h, 16:00 h 18:00 h e 20:00 h.

3.4.4 **Iluminação**

A quantidade de luz foi medida em µfótons.m^{-2}.seg^{-1}, empregando um Medidor de Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR) Biospherical Instruments Inc. modelo QSL 2101, software LOGGER 2100 (Figura 3.10). As medições foram realizadas no interior do cultivo e na parte externa do fotobiorreator em quatro pontos diferentes, nos mesmos horários em que se monitorou a temperatura.

O sensor foi sempre calibrado antes de realizar as medições.

Figura 3.10. Medição de luz utilizando sensor PAR.

3.5 Monitoramento do crescimento do cultivo

O crescimento do cultivo, realizado no fotobiorreator de Janela, foi monitorado por meio das metodologias de densidade celular e peso seco descritas a seguir.

3.5.1 Densidade celular

A quantidade de células (ou densidade celular, em cel.mL^{-1}) presente nas amostras coletadas diariamente durante o cultivo foi determinada por contagem direta em microscópio ótico (modelo Olympus SC30) (aumento de 40 vezes), com auxílio de uma câmara de Fuchs-Rosenthal. A densidade celular foi expressa em número de células por mililitro de cultivo (cel.mL^{-1}).

3.5.2 Determinação da biomassa seca

O peso seco foi determinado em triplicata, conforme a metodologia definida pelo CENPES/PETROBRAS (2013). Com os dados experimentais de densidade celular, e peso seco foram elaborados gráficos em função do tempo (dia). A seguir, estão descritas as etapas deste procedimento.

- Limpeza das membranas:

Utilizaram-se membranas de vidro (AP 40 de 0,47µm de poro e 25 mm de diâmetro) para evitar a degradação devido às elevadas temperaturas. As membranas foram lavadas com água destilada, secadas em mufla a 575 ºC por 1 hora e em seguida colocadas em dessecador. Só então foram pesadas.

A solução de NH_4HCO_3 foi utilizada para a lavagem das membranas após a filtração da suspensão contendo microalgas. O objetivo foi eliminar resíduos inorgânicos, que possam causar um incremento na biomassa microalgal. A molaridade da solução foi de 0,5 M.

- Montagem do sistema de filtração:

A correta montagem do sistema de filtração é importante, pois poderá acarretar em perda de biomassa, durante o processo de filtração. A vidraria deve estar devidamente limpa e seca e o sistema devidamente vedado, para manunteçao do vácuo.

- Filtração e lavagem:

Nesta etapa é importante que a amostra seja homogeneizada antes de transferi-la para vidraria de medição de volume para posterior filtração. Aciona-se o vácuo e transfere-se o volume determinado para o sistema de filtração. Em seguida, lava-se com a solução de lavagem já mencionada. A membrana foi retirada cuidadosamente com o auxílio de uma pinça ou espátula para após ser secada em estufa a 60 ºC por 1 hora.

- Determinação do peso seco por gravimetria:

Retira-se a membrana da estufa e, imediatamente, coloca-se em dessecador para que a temperatura ambiente seja atingida. Em seguida, as membranas são pesadas.

Para calcular o peso seco subtram-se o valor do peso final da membrana com as microalgas (mf) do peso inicial da membrana (mi), e realizou-se as devidas conversões, considerando o volume filtrado de microalgas. Conforme indicado nas equações 3.1 a 3.3.

$$X = \frac{(mf - mi) x 1.000 x FD}{Vf} \qquad \textit{Eq. 3-1}$$

$$TS = \frac{X}{15} \qquad \textit{Eq. 3-2}$$

$$TU = 100 - TS \qquad \textit{Eq. 3-3}$$

onde:

X: concentra o de biomassa seca em g L^{-1};

mi: massa inicial da membrana calcinada (sim microalga);

mf: massa final da membrana ap s de secar a microalga;

Vf: volume de cultura de microalga filtrado;

FD: fator de diluiç o;

TS: teor de massa seca;

TU: teor de umidade.

- Teor de cinzas:

Esta análise foi conduzida calcinando-se as membranas filtradas e pesadas em suporte de alumínio a 575 ºC por 1 hora. O teor de cinzas foi calculado por gravimetria. A Figura 3.11 ilustra as diferentes etapas do processo:

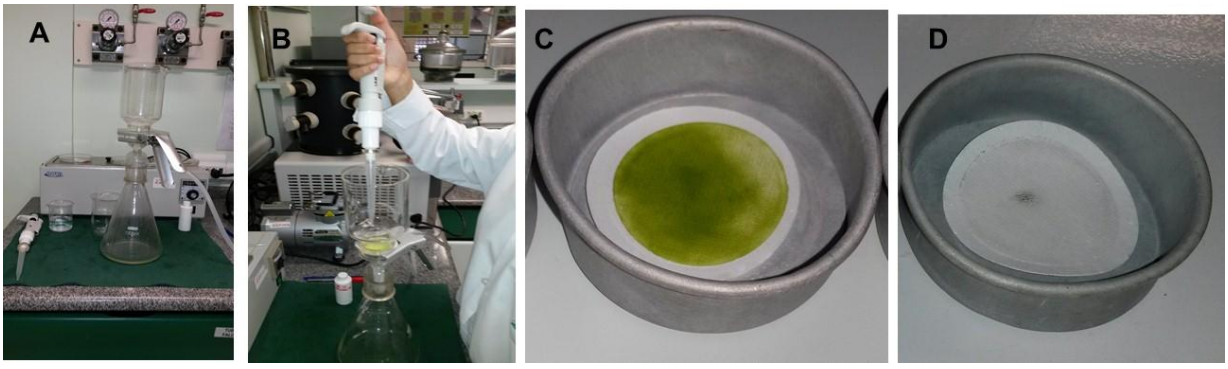


Figura 3.11. Determinação de peso seco.

(A) Lavagem das membranas; (B) Sistema de filtração; (C) Secagem na estufa; (D) Biomassa calcinada.

3.6 Concentração e secagem da biomassa microalgal

3.6.1 Centrifugação da biomassa

Depois de 12 dias acompanhando o cultivo a biomassa foi concentrada usando centrifuga Hitachi modelo CR22N (Figura 3.12). Para isso utilizou-se uma velocidade de 8.000 rpm durante um tempo de 10 minutos.

Figura 3.12. (A) Cultivo para centrifugação; (B) Centrifuga Hitachi modelo CR22N.

3.6.2 **Quantificação do teor de umidade**

Para a quantificação do teor de umidade na biomassa de microalgas obtida através do processo de centrifugação, pesaram-se dois (2) gramas de biomassa em uma balança eletrônica Shimadzu modelo MOC63U, com temperatura de 40 a 50 °C, Figura 3.13.

Figura 3.13. Teor de umidade.

3.6.3 **Secagem da biomassa por liofilização**

Com o objetivo de determinar o teor de lipídios, carboidratos e proteínas, presentes na biomassa cultivada no fotobiorreator, a biomassa úmida de microalgas depois de centrifugada foi seca por liofilização. Esta etapa foi realizada usando liofilizador - Modelo

Labconco de 4,5 L de capacidade, operando à temperatura de -45 °C e vácuo de 0,220 bar (Figura 3.14).

Figura 3.14. (A) Liofilizador; (B) Biomassa liofilizada.

3.7 Caracterização da biomassa liofilizada

3.7.1 Teor de lipídios totais (LT)

O teor de lipídios foi mensurado através do método de extração de lipídios totais desenvolvido por Bligh & Dyer (1959) modificado e foi aplicado com a biomassa de microalga liofilizada.

O processo para extração foi realizado, em triplicata, em duas etapas: na primeira, a amostra foi submetida a um pré-tratamento com ácido clorídrico para hidrolisar as células; e na segunda, os lipídios foram extraídos com uma mistura de solventes. Após a extração, o excesso de solvente foi removido e a quantificação dos lipídios foi realizada gravimetricamente.

O pré-tratamento ácido realizou-se conforme o seguinte procedimento: Pesou-se em balança analítica 400 mg de massa seca; adicionou-se 5 mL de HCl 2 mol L^{-1} à biomassa e homogenizou-se com o auxiílio do vortex; colocou-se o tubo em banho termostatizado a 80 °C durante 1 hora; centrifugou-se a 2.500 g durante 15 minutos para separar a biomassa do resíduo de ácido; removeu-se o resíduo de ácido e descartou-se em frasco adequado para este resíduo.

Posterior ao pré-tratamento, realizou-se o procedimento de extração de lipídios totais, descrito a seguir: Adicionou-se 4 mL de metanol à biomassa hidrolisada e homogenizou-se; adicionou-se à suspensão 2 mL de clorofórmio e agitou-se em vortex por 2 minutos; adicionou-se mais 2 mL de clorofórmio e agitou-se em vortex por 2 minutos; adicionou-

se 3,6 mL de água MilliQ e agitou-se em vortex por 2 minutos e centrifugou-se a 2.500 rpm durante 15 minutos. A fase dos lipídios em clorofórmio foi transferida para um balão já pesado e reservado. Para a re-extração dos lipídios que ainda estavam na biomassa, adicionou-se 4 mL da solução 10 % v/v de metanol em clorofórmio às fases que restavam e agitou-se em vortex durante 2 minutos. Centrifugou-se a mistura a 2.500 rpm durante 15 minutos, retirou-se a fase dos lipídios e colocou-se no mesmo balão do primeiro extrato. O procedimento de re-extração foi repetido uma vez. O excesso de clorofórmio foi evaporado a 75 °C e pressão ambiente e o balão foi seco em estufa a 60 ºC até peso constante.

O conteúdo de lipídios foi calculado por gravimetria equação 3-4:

$$LT = 100x\frac{m3-m1}{m2} \qquad Eq.\ 3\text{-}4$$

onde:

LT: teor de lipídios;

m_1:massa do balão (g);

m_2:massa da amostra (g);

m_3:massa do balão com o extrato (g).

Figura 3.15. Processo de extração de LT

(A) Pre-tratamento ácido; (B) Extração dos lipídios; (C) Amostras com lipídios; (D) Recuperação do solvente por rotaevaporação.

3.7.2 **Teor de lipídios convertíveis em biodiesel (LCB)**

A determinação do teor de lipídios convertíveis em biodiesel foi realizada utilizando o método de Schmid-Bonzynski-Ratzlaff (modificado) (IDF, 1986). Baseado na digestão de biomassa de microalga com acido clorídrico, seguida da extração da fração lipídica

com álcool etílico, éter etílico e éter de petróleo. O método foi realizado em triplicata de acordo com o seguinte procedimento (Figura 3.16):

Pesou-se 1,0 grama de biomassa liofilizada em erlenmeyer de 100 mL com tampa previamente identificado, adicionou-se 10 mL da solução de ácido clorídrico (HCl) 8 M e homogeneizou-se em vortex. As amostras foram aquecidas diretamente em placa de aquecimento a 70 ºC por 10 minutos. Após o tempo da digestão, observou-se no microscópio a estrutura da parede celular da microalga comprovando que as células estavam rompidas. Posteriormente foram adicionados 10 mL de álcool etílico, agitando-se manualmente por 30 segundos; adicionou-se 25 mL de éter etílico e 25 mL de éter de petróleo, agitando-se por mais 1 minuto. Seguidamente a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm (rotações por minuto) por 15 min. A fase etérea foi transferida para um funil de separação e lavada com água MilliQ para remoção do HCL até alcançar um pH entre 6-7, em seguida, foi transferida para um balão previamente tarado. Os solventes foram rota-evaporados a 65 ºC a pressão ambiente e os balões com o óleo (extrato) foram secos em estufa a 60 ºC até peso constante.

A teor de lipídios convertíveis em biodiesel foi determinado por meio da equação 3-5:

$$LCB = 100\ x \frac{m3-m1}{m2} \qquad Eq.\ 3\text{-}5$$

onde:

LCB: lipídios convertíveis em biodiesel;

m_1:massa do balão (g);

m_2:massa da amostra (g);

m_3:massa do balão com o extrato (g).

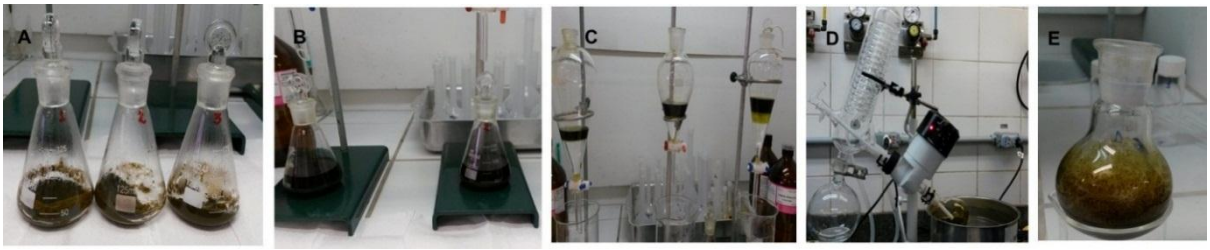


Figura 3.16. Processo de extração de LCB na *Monoraphidium* sp.

(A) Ruptura da biomassa com HCl; (B) Adição de solventes para separação da fase etérea; (C) Separação da fase etérea; (D) Rotaevaporação da fase etérea com óleo; (E) Óleo seco.

3.7.3 Determinação do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no extrato

Para a identificação do perfil lipídico do óleo extraído, conforme descrito no item anterior, foi necessário realizar a conversão desses lipídios em ésteres metílicos de forma a facilitar a identificação dos componentes através da cromatografia gasosa.

Nessa etapa inicial realizou-se uma metanólise do extrato lipídico, conforme metodologia descrita por Yoo *et al*., (2010), utilizando 2 mL de metanol e 5% de HCL à 75 ºC por 10 minutos em banho Maria. Esta etapa foi realizada em frasco fechado para evitar evaporação.

A seguir, a fase contendo os ácidos graxos metilados foi separada com a adição de 2 mL de água destilada e 2 mL de hexano P.A. A fase superior de hexano foi recolhida com pipeta automática e transferida para frasco de vidro, seguidamente colocado em estufa à 60 ºC para a evaporação do solvente e concentração da amostra.

Após a metanólise determina-se o percentual de ésteres metílicos de ácidos graxos, por Cromatografia Gasosa mediante o método EN 14103. Para isso foi necessária a diluição das amostras em heptano na proporção de 0,05: 1 (m/m). Em seguida 1µL desta amostra foi injetada no cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC-2014 com Injetor split/splitless, detector de ionização de chama (FID), coluna Carbowax (30m x 0.32mm x 0.25µm), marca Quadrex, com as seguintes condições: vazão na coluna de 3 mL min^{-1}, 200 ºC isotérmico, injetor: 250 ºC, detector: 250ºC, pressão de gás de arraste de 1,9 mL min^{-1}. As análises foram realizadas durante 30 min.

Os teores dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG) são expressos em porcentagens de área no total de ésteres metílicos. Para o percentual de ácidos graxos utilizou-se a Equação 3-6.

$$Ácidos\ graxos\ (\%) = \frac{MM_{ac.graxo}}{MM_{éster}} \times É\mathit{ster}\ (\%) \qquad \textit{Eq. 3-6}$$

onde:

Ácidos Graxos (%): percentual do acido graxo;

MMac.graxo: massa molar dos ácido graxos (vários);

MMéster: massa molar do respectivo éster;

Éster (%): percentual do éster.

3.7.4 **Teor de carboidratos**

A extração dos carboidratos totais da microalga *Monoraphidium* sp. foi realizada segundo o método descrito por Myklestad e Haug (1972). O método denominado fenol- sulfúrico permite extrair os carboidratos solúveis em água que estão presentes na biomassa seca.

Inicialmente, foram pesadas de 10 a 20 mg de biomassa liofilizada na qual foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico 80 %. As amostras foram mantidas em repouso por 20 horas. Durante a adição do ácido e nas 4 horas subsequentes os frascos com as amostras foram mantidos em banho de gelo a 8 ºC a fim de evitar a carbonização da biomassa (Figura 3.17). Posteriormente, as amostras foram diluídas com 10 mL de água destilada e filtradas através de membranas de fibra de vidro de 0,47 μm de poro e 25 mm de diâmetro, previamente tratadas na mufla durante 1 h a 575 °C. Do filtrado, foi transferido 0,1 mL para tubos de ensaio longos, nos quais foram adicionados 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguido de agitação vigorosa. Após 30 minutos, contados a partir da adição do ácido sulfúrico, foi realizada a leitura a 485 nm utilizando espectrofotômetro modelo Bel Photonics 1105 (Figura 3.18).

Figura 3.17. Sistema de filtração e rompimiento celular para determinar o teor de carboidratos.

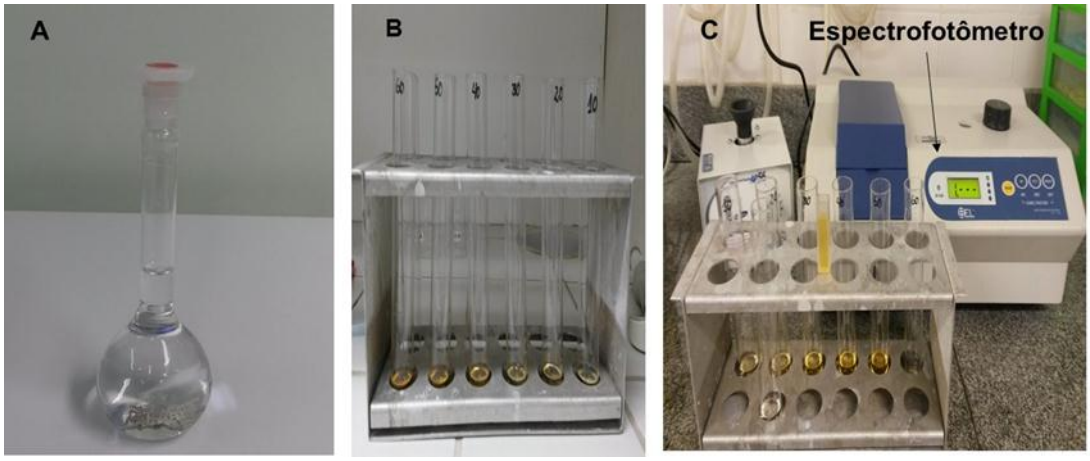


Figura 3.18. (A) Solução de glicose; (B) Concentração de soluções; (C) Espectrofotômetro

A determinação de concentrações das amostras foi realizada através da curva padrão da glicose (Anexo 01) com concentração entre 0 - 60 µg mL^{-1}. Para o cálculo das concentrações foi utilizada a seguinte equação:

$$V1 = \frac{C2xV2}{C1} \qquad Eq.\ 3\text{-}7$$

Onde:

C_1: Concentração da solução concentrada (solução mãe), 400 mg L^{-1};

V_1: Volume da solução concentrada (mL);

C_2: Concentração da solução diluída (mg L^{-1});

V_2:Volume da solução diluída, 1 mL.

3.7.5 **Teor de proteínas totais**

A análise de proteínas totais foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Escola de Química da UFRJ, pelo método de Kjeldahl clássico modificado A.O.A.C, (1995). A etapa de digestão das amostras foi realizada com ácido sulfúrico (H_2SO_4), onde foram pesadas 0,1 grama de biomassa de microalga seca em triplicata em tubos de digestão identificados, adicionados em cada um destes 5 mL de H_2SO_4 PA (pureza analítica) e catalisador de selênio em cada amostra. Em seguida, os tubos foram colocados em um bloco digestor Marconi modelo MA-4025 (Figura 3.19) até atingir a temperatura de 300 ºC (digestão da biomassa, solução totalmente transparente).

Antes da destilação das amostras digeridas, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) a 60 % para neutralizá-las. Cada amostra foi destilada em destilador Marconi modelo MA-036. Foi coletado o destilado em uma solução contendo ácido bórico (HBO_3) ao 2%, soluções indicadoras de verde de bromocresol e vermelho de metila a 0,2 % m/v. O câmbio de cor indicou a presença de nitrogênio, assim o processo continuou até que todo o nitrogênio tivesse sido destilado.

Ao final, as três amostras foram tituladas utilizando uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,05 M. O volume gasto de solução titulante para cada umas das amostras foi de 9 mL, indicando o teor de nitrogênio recuperado. Para a determinação de proteínas foi utilizada a seguinte equação:

$$Proteínas\ \% \frac{m}{m} = \frac{Vx0{,}14xf}{P} \qquad Eq.\ 3\text{-}8$$

onde:

V: volume de HCL 0,05M gasto na titulação;

P: Nº de g da amostra;

f: fator de conversão (6,25)

Figura 3.19. Bloco digestor para obtenção de proteína.

Etapa 2: Produção de hidrocarbonetos renováveis, a partir do bio-óleo extraído da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp.

3.8 Processamento da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp e extração do bio-óleo.

A biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp.utilizada na extração do bio-óleo para produção de hidrocarbonetos foi cultivada na unidade piloto da Universidade Federal do Rio Grande do Norte UFRN-Natal em sistema a céu aberto "Raceway ponds". Concentrada através do processo de floculação, seguida de centrifugação. A centrifugação foi realizada na Unidade Piloto do Laboratório de Tecnologias Verdes - GreenTec da EQ/UFRJ, Figura 3.20.

Figura 3.20. Cultivo e concentração da biomassa da microalga *Monoraphidium* sp. (A). Sistema de cultivo tipo Raceway ponds - UFRN/Natal; (B) Tanques de floculação - UFRN/Natal; (C) Centrifuga Contínua – Modelo GEAWestfalia - GreenTec/EQ/UFRJ;(D) Transporte da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium sp.* (E) Biomassa úmida utilizada como matéria prima.

O teor de umidade desta biomassa foi determinado seguindo a metodologia descrita no item 3.6.2.

Seguidamente foi realizada a extração do bio-óleo (fração apolar presente no interior das células de microalgas), através do processo hidrotérmico. Foram realizadas duas bateladas nas mesmas condições operacionais.

No diagrama de blocos da Figura 3.21 apresenta-se o processamento da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp, para ruptura celular e liberação dos componentes internos das células, e na etapa de extração do bio-óleo.

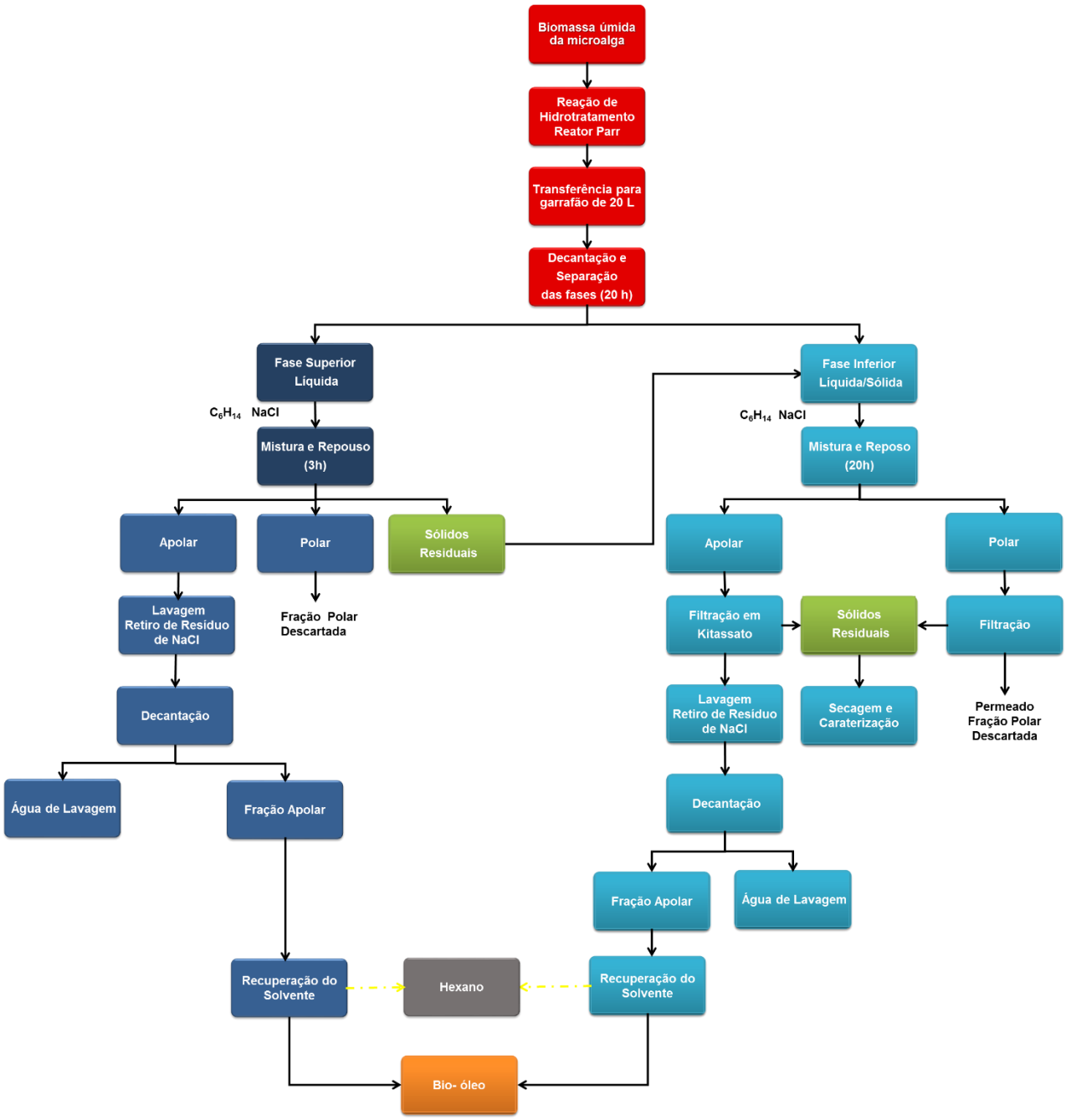


Figura 3.21.Processamento da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp e extração do bio-óleo.

3.8.1 Reação de hidrotratamento térmico da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp

A biomassa úmida de *Monoraphidium* sp. disponível foi processada em duas bateladas (Ensaios) considerando a capacidade do reator. Na primeira pesaram-se 12,95 kg e na segunda 10,00 kg. Para iniciar cada reação a biomassa pesada é transferida para o copo do reator batelada (Parr Instruments Inc. Modelo 4550), do tipo autoclave feito em aço inoxidável, de volume útil de cinco galões e pressão máxima de trabalho de 3.000 psi. O mesmo possui sistema de resfriamento para garantir o controle da temperatura, sistema de agitação (máx. 190-230 rpm) e manta externa para aquecimento, (Figura 3.22). As condições de reação são apresentadas na Tabela 3.2.

Figura 3.22.Reator Parr Instruments Inc. Modelo 4550 de 5 gal.

Tabela 3.2.Condições operacionais da reação de hidrotratamento térmico da biomassa úmida.

Parâmetros	Valor
Temperatura (°C)	180
Pressão (psi)	P_1(365-465), P_2(339-391)
Tempo de reação (min)	60

* P_1- pressão na reação 1, P_2- pressão na reação 2

Durante o tempo de reação acompanhou-se a variação de pressão no reator a 180 ºC.

Depois de concluída a reação de cozimento o produto foi retirado do copo do reator e transferido para um garrafão de vidro de vinte litros (20 L), previamente pesado, com o

objetivo de quantificar a massa obtida após a reação. Na Tabela 4.7 apresenta-se um balanço de massa de cada batelada (12,95 kg e 10,00 kg). Assim, ambas as fases foram separadas e quantificadas e apresentadas na Tabela 4.8.

3.8.2 **Separação das fases e extração do bio-óleo**

Após a reação o produto obtido foi retirado do reator e colocado em um garrafão de vidro fechado de vinte litros (20 L) e deixado em repouso por aproximadamente 20 h, para observar a separação das fases. Transcorrido o tempo, observaram-se duas fases, uma fase superior líquida e outra inferior líquida/sólido (Figura 3.23). Nas Tabelas 3.3 e 3.4 apresentam-se a quantificação das fases.

Figura 3.23.Separação das fases após reação.

Ambas as fases foram separadas e processadas de forma independente, conforme descrito a seguir:

3.8.2.1 **Extração da fração apolar (bio-óleo) da fase superior líquida**

A quantidade de produto separado na fase líquida superior de cada batelada realizada é apresentado na Tabela 3.3. Nesta mesma tabela mostram-se as quantidades de hexano (C_6H_{14}) adicionadas à fase líquida em cada ensaio (metade do volume da fase líquida) com o objetivo de extrair a fração apolar. Cabe destacar que o hexano é utilizado como solvente extrator por seu baixo custo e alta eficiência (Mercer & Armenta, 2011).

Também foi adicionados 10 % m/m de sal comum (NaCl) para aumentar a polaridade da fração polar e dessa forma facilitar a extração com hexano de hidrocarbonetos com polaridade media, como é o caso dos ácidos graxos.

Tabela 3.3 Quantidade de produto na fase superior líquida.Volume de hexano e massa de cloreto de sódio (NaCl) adicionados na extração da fração apolar

Ensaio	**Fase superior líquida (g)**	**Volume de C_6H_{14} (mL)**	**Quantidade de NaCl (g)**
1	4.600	2.300	460
2	6.100	3.050	610

Na Figura 3.24 observa-se a fase líquida superior depois de adiciona-lhe hexano e NaCl. Esta mistura foi agitada fortemente para favorecer a extração dos componentes apolares e deixada em repouso em um funil de separação. A separação das fases aconteceu depois de três horas de repouso.

É importante destacar que a quantidade NaCl usada é excesiva para ser considerada em um aumento de escala, no entanto, o objetivo neste caso era conseguir a máxima recuperação dos ácidos graxos. Em outros testes realizados posteriormente no grupo de pesquisa do Greentec esse NaCl foi substituído pela mistura hexano:etanol (80:20) como solvente extractor.

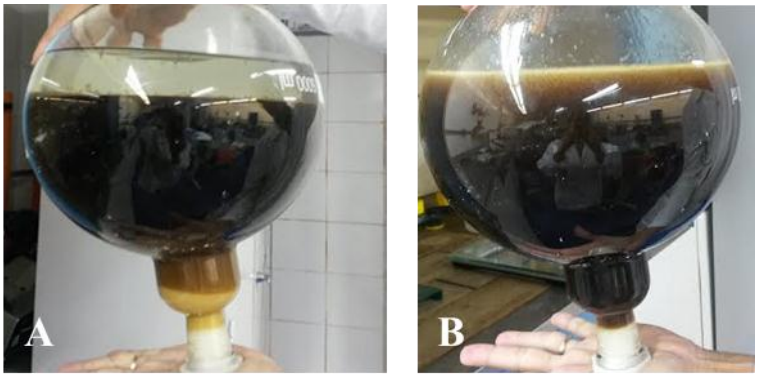


Figura 3.24. (A). Fase líquida com hexano e sal; (B) Amostra após agitação.

Após essas três horas de repouso, observou-se a formação de três fases: apolar, polar e uma terceira de sólidos residuais (Figura 3.25). A fase apolar superior foi separada e lavada para retirar qualquer resíduo de sal.

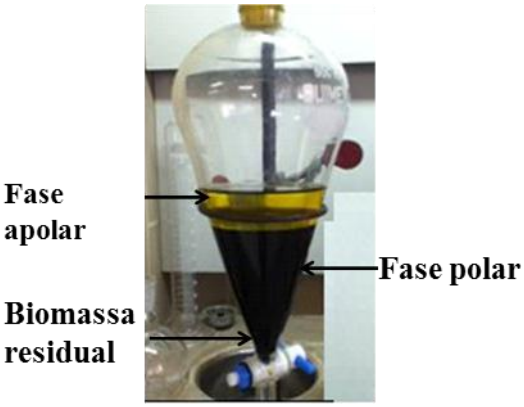


Figura 3.25.Extração do bio-óleo com hexano.

Posteriormente o hexano utilizado na extração foi recuperado usando evaporador rotativo, trabalhando a 120 rpm e 70 ºC, temperatura próxima ao ponto de ebulição do hexano (68,7 ºC) (Figura 3.26). As quantidades de bio-óleo extraído da fração líquida superior (Figura 3.26) e de hexano recuperado são apresentadas na Tabela 4.9 do capítulo de resultados.

Figura 3.26 Bio-óleo extraído da fração líquida superior, após recuperação do solvente extrator (hexano).

A fração polar foi descartada. No entanto, esse produto poderia ser caracterizado e dependendo do teor de carboidratos utilizado na produção de etanol.

A terceira fase observada durante a extração, formada por resíduos de partículas sólidas, foi misturada com a fase inferior líquida/sólido separada no processo de decantação inicial.

3.8.2.2 Extração da fração apolar (bio-óleo) da fase inferior líquida/sólido. Separação da biomassa residual.

A quantidade de produto separado na fase inferior líquida/sólido de cada batelada é apresentada na Tabela 3.4. Nesta mesma tabela mostram-se as quantidades de hexano e cloreto de sódio adicionadas à fase inferior líquida/sólido de cada ensaio. Ambos produtos foram adicionados nas mesmas proporções e com os mesmos objetivos descritos no item anterior. A mistura foi agitada, para aumentar o contato do solvente extrator com o produto separado na fase inferior, e deixada em repouso durante 20 h para garantir a separação entre as fases.

Tabela 3.4. Quantidade de produto na fase inferior líquida/sólido.Volume de hexano e massa de cloreto de sódio (NaCl) adicionados na extração da fração apolar.

Ensaio	Fase inferior líquida/sólido (g)	Volume de C_6H_{14} adicionado (mL)	Quantidade de NaCl (g)
1	8.100	4.000	810
2	3.700	1.850	370

Transcorrido esse período de tempo, separou-se a fase superior apolar, de cor marrom claro, para posterior filtração em kitassato com o objetivo de remover as partículas sólidas residuais que ficaram nessa fração (Figura 3.27).

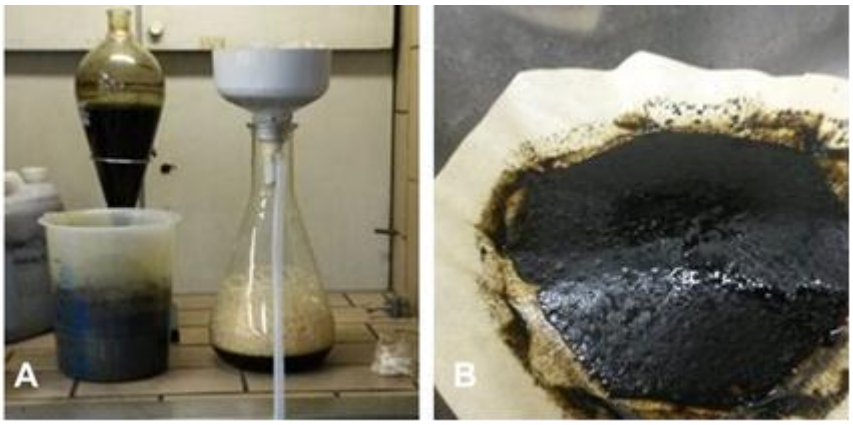


Figura 3.27(A) Filtração da fração apolar; (B) Partículas sólidas residuais presentes na fração apolar da fase superior líquida/sólido.

Posteriormente, a fase apolar foi lavada para retirar qualquer resíduo de sal e o produto foi rotaevaporado, nas mesmas condições descritas no item 3.8.2.1 (Figura 3.26), para recuperação do hexano utilizado na extração. As quantidades de bio-óleo extraído da fase inferior líquida/sólido (Figura 3.28) e de hexano recuperado são apresentadas na Tabela 4.10 do capítulo de resultados.

Figura 3.28 Bio-óleo extraído da fase inferior líquida/sólido, após recuperação do solvente extrator (hexano).

A fração polar separada da fase inferior líquida/sólido, que contém a biomassa residual, foi filtrada (Figura 3.29) com o objetivo de separar, quantificar e caracterizar a biomassa residual (Figura 3.30). Determinou-se o teor de umidade, seguindo o procedimento descrito no item 3.6.2 e consequentemente o teor de sólidos por diferença (Tabela 4.11).

Adicionalmente, quantificou-se o teor de proteínas totais presentes na biomassa, conforme item 3.7.5. O resultado é apresentado na Tabela 4.12 na seção de resultados.

Figura 3.29.Filtragem da fração polar da fase inferior líquida/sólido.

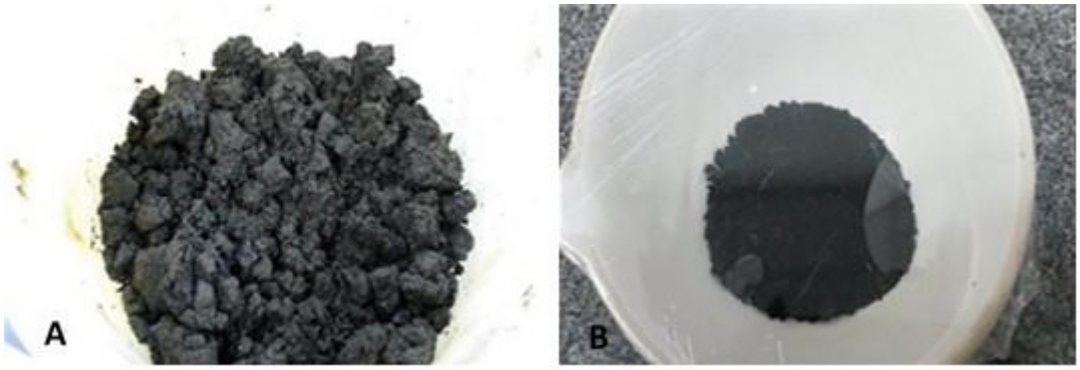


Figura 3.30. (A) Biomassa residual úmida separada da fase líquida/sólido;(B) Biomassa residual seca.

O filtrado resultante, rico em componentes polares, também foi descartado.

3.9 Caracterização das frações apolares (Bio-óleo)

O extrato apolar (Bio-óleo) extraído de ambas fases das duas bateladas da reação de hidrotratamento térmico da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp. foi misturado e caracterizado, conforme os seguintes parâmetros:

- **Densidade relativa à 25ºC (kg m^{-3})**

Densidade é a massa por unidade de volume a uma temperatura especificada. Densidade relativa ou massa especifica é a razão da massa da amostra em relação à da água por unidade de volume a uma temperatura estabelecida (nesse caso 25°C). Este método cobre a determinação da densidade ou densidade relativa de destilados de petróleo e óleos viscosos que podem ser manuseados normalmente como líquidos à temperatura de teste

entre 15 °C e 35 °C. Ele consiste em introduzir um pequeno volume (aproximadamente 0,7 mL) de amostra líquida dentro de um tubo de amostra oscilante e a mudança na frequência de oscilação causada pela mudança na massa do tubo é usada em conjunto com o dado de calibração para determinar a densidade da amostra.

A densidade relativa foi determinada seguindo a norma ASTM D-1298.

- **Viscosidade cinemática a 40ºC ($mm^2\ s^{-1}$)**

O método consiste em medir o tempo de um volume de líquido fluindo, sob gravidade, através do viscosímetro Cannon-Fenske em banho termostático a 40°C. A viscosidade absoluta é a resistência que todo fluido real oferece ao movimento relativo de qualquer de suas partes e viscosidade cinemática é a razão entre sua viscosidade absoluta e sua massa específica, ambas estando à mesma temperatura. A viscosidade cinemática foi determinada seguindo a norma ASTM D-445.

- **Índice de acidez (mg KOH g^{-1})**

O índice de acidez ou acidez livre é expresso pela percentagem de ácidos graxos livres de um determinado produto. Esta análise é muito importante, pois uma vez descarboxilados os ácidos graxos (remoção do grupamento carboxila) a acidez da amostra deve diminuir.

Na análise de acidez, a amostra é pesada em um erlenmeyer (~1g) contendo uma mistura de solventes neutros (50 mL de álcool etílico, 2 gotas de NaOH 0,1N e 1mL de fenolftaleína) onde é dissolvida. Estes ácidos são neutralizados pela solução alcalina de NaOH 0,25N, previamente padronizada, através de titulação, até que se atinja, por no mínimo 30 segundos, o ponto de viragem do indicador usado(fenolftaleína), cuja mudança de cor atinge o rosa após o ponto de equivalência. (Moretto e Fett, 1998).

O índice de acidez percentual (I) é então calculado em relação à massa do ácido oléico, conforme a equação abaixo:

$$I = \frac{(K \times V_{NaOH})}{m_{amostra}} \qquad Eq.\ 3\text{-}9$$

onde:

K: constante (g/mL) obtida pela multiplicação entre a concentração exata da solução de NaOH usada na titulação e a massa de ácido oléico (282 g/mol), o valor então obtido é multiplicado por 100 para se obter o resultado em porcentagem;
V_{NaOH}: volume (mL) de NaOH 0,25mol/L gasto da titulação;
$M_{amostra}$: massa da amostra (g).

- **Índice de iodo (g de I_2 100 g^{-1})**

Esta análise tem como objetivo medir o índice de insaturação das amostras. Essa análise baseia-se no descrito por Morita, 1972.

Em um erlenmeyer de 500 mL são pesados entre 0,13 – 0,15 g de amostra, esta é então solubilizada em 20 mL de uma mistura de ácido acético e cicloexano (1:1) e adicionam-se 25 mL de reagente de Wijis (iodo-cloro). Essa mistura deve ser deixada tampada no escuro por 1 hora. Decorrida 1 hora de reação, adiciona-se 25 mL de uma solução de iodeto de potássio (KI - 100 g/L) e 150 mL de água destilada. A amostra deve ser então titulada com uma solução de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$ - 0,1 N). A titulação é feita até que a mistura atinja uma coloração amarela clara, neste ponto adiciona-se 1 mL de uma solução de amido (1%), se uma coloração escura for observada procede-se a titulação até que a mistura esteja incolor. Deve-se preparar um "branco" ou reação controle, onde se procede da mesma maneira, porém sem adição de amostra. Segue abaixo o cálculo necessário para obtenção dos valores de índice de iodo (I_{iodo}):

$$I_{iodo} = \frac{(Vbranco - Vamostra) \times 0{,}1 \times 12{,}69}{m_{amostra}} \qquad \textit{Eq. 3-10}$$

onde:
V_{branco}: volume em mL gastos de solução de NaOH na titulação do branco;
$V_{amostra}$: volume em mL gastos de solução de NaOH na titulação da amostra.

- **Determinação de ésteres de ácidos graxos (%) por cromatografia gasosa**

A técnica mais utilizada para análise do perfil em ácidos graxos dos lipídios é a cromatografia gasosa (CG). Os ácidos graxos são encontrados nas microalgas ou nos alimentos como triacilgliceróis e em menor quantidade como ácidos graxos livres, sendo necessário convertê-los em substâncias com maior volatilidade a fim de reduzir a

adsorção de solutos no suporte e superfície da coluna e melhorar a separação dos compostos. Ésteres metílicos são os derivados preferenciais utilizados nas análises por cromatografia gasosa. O método selecionado para preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos do bio-óleo extraído foi descrito no iem 3.7.3.

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos constituintes da amostra com uma mistura constituída de 37 padrões externos de ésteres metílicos de ácidos graxos da Sigma ($C_{4:0}$-$C_{24:0}$). A composição foi determinada através do percentual das áreas relativas de cada pico característico de éster metílico de ácido graxo (EMAG) com a área total de picos do cromatograma (método de normalização). Os tempos de retenção dos analitos e as porcentagens de área dos picos correspondentes foram obtidos pelo software GC solution versão 2.2 (Shimadzu).

- **Análise elementar**

A composição elementar do bio-óleo foi determinada no Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello - CENPES da Petrobras. Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinados utilizando um equipamento LECO CHN-1000 de acordo com o método ASTM D-5291, normalmente utilizado para carvões. A análise do teor de enxofre foi realizada no equipamento SC-432, baseado no ASTM D-4239. O teor de oxigênio foi determinado usando ASTM D-5622, recomendado para amostras sólidas ou viscosas.

- **Destilação simulada**

A amostra foi analisada por destilação simulada com o objetivo de determinar as temperaturas de ebulição inicial e final da fração de bio-óleo extraída e o rendimento dos principais cortes. Esta análise foi realizada no Laboratório de Análises Cromatográficas do CENPES-RJ seguindo a norma ASTM D-2887. O resultado é mostrado na Tabela 4.15.

3.10 Produção de hidrocarbonetos renováveis a partir do bio-óleo de microalgas

Todas as reações se realizaram no Laboratório de Tecnologia Verde (GreenTec) da Escola de Química/UFRJ, em um reator tipo autoclave (Parr Instruments Inc. - Modelo 4842), de aço inoxidável, com volume útil de 600 mL, temperatura e pressão máximas de

trabalho de 400 ºC e 700 bar, respectivamente. Este reator tem controlador de temperatura e pressão. Também agitação e manta externa para aquecimento (Figura 3.31).

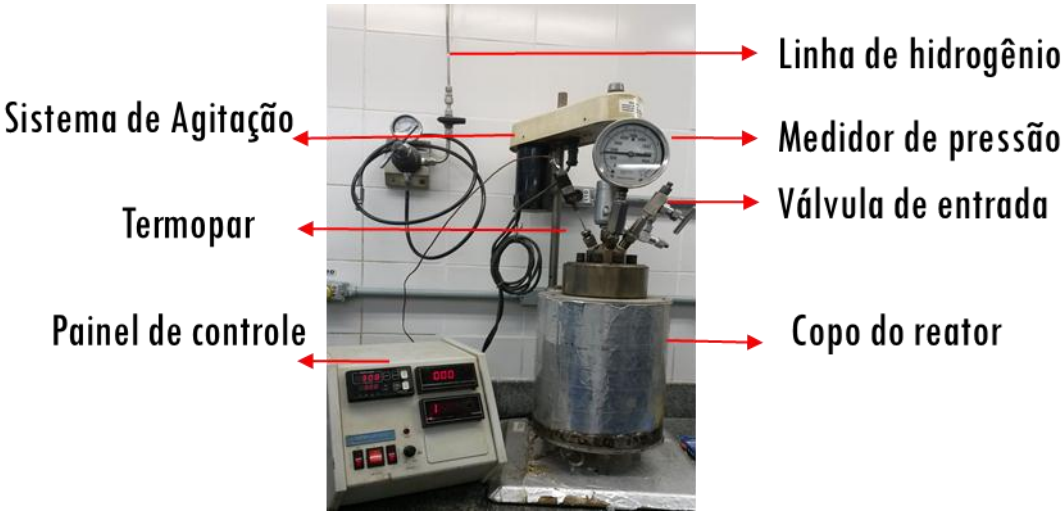


Figura 3.31. Reator Parr modelo 4842 utilizado no processamento do bio-óleo

3.10.1 **Catalisador**

Nos testes experimentais utilizou-se o catalisador de 5% de rutênio suportado em alumina (Ru/Al_2O_3) tipo H213B/D, fornecido pela empresa "Evonik Degussa". As características do catalisador são apresentadas e discutidas na Tabela 4.16 da seção de resultados. Estas características foram reportadas pelo fornecedor no certificado de qualidade do produto.

3.10.2 **Redução do catalisador Ru/Al_2O_3**

Realizou-se a redução do catalisador Ru/Al_2O_3 nas condições descritas a seguir:

Redução com H_2 puro a 40 atm de pressão, no próprio reator batelada, com taxa de aquecimento de 10 ºC.min^{-1} até atingir a temperatura de 300°C. Após permanecer na temperatura máxima (300 ºC) por 1 hora o sistema foi resfriado até atingir a temperatura ambiente.

A redução é realizada para ativar os sítios ativos do catalisador.

3.10.3 **Reações químicas**

No experimento inicial foram utilizados 119 g de bio-óleo, 10% m/m do catalisador anteriormente descrito (12 g), 20% m/m de glicerol (24 g) e como agente hidrolisante água destilada (Razão bio-óleo:água = 1:1) (119 g). A reação foi realizada a 350 ºC,

durante 1 h com velocidade de agitação de 400 rpm. Durante a reação monitorou-se a variação de pressão, os resultados são apresentados na Tabela 4.17 do capítulo de resultados.

Antes de iniciar a reação, foi realizado um vácuo no copo do reator para retirar o H_2 excedente da etapa de redução e aproveitou-se este mesmo vácuo para introduzir os reagentes, sem necesidade de abrir o copo, evitando assim o contato do catalisador reduzido com o O_2 do ar (Figura 3.32).

Figura 3.32. Adição dos reagentes ao copo do reator.

Além do glicerol formado a partir da hidrólise dos triglicerídeos presentes no bio-óleo, nesta reação adicionou-se mais 20% m/m de glicerol com o objetivo de aumentar a produção de hidrogênio in-situ, a partir de reações de reforma em fase líquida (item 2.14.1). Este hidrogênio é utilizado nas reações de hidrodesoxigenação e hidrocraqueamento para a produção dos hidrocarbonetos e também na hidrogenação, para diminuir os níveis de insaturação. Neste caso, tanto os hidrocarbonetos produzidos como o hidrogênio utilizado na sua produção procedem de fontes renováveis.

Após da reação formaram-se duas fases: (1) fase orgânica e (2) fase aquosa com resíduos de catalisador, separadas por decantação (Figura 3.33) ambas foram enviadas para caracterização.

Devido aos resultados positivos obtidos na produção de hidrocarbonetos, nas condições reacionais anteriormente descritas, realizou-se um segundo teste em condições mais brandas com o objetivo de verificar se nas novas condições seria possível obter rendimentos similares.

Para isso utilizaram-se os mesmos reagentes e as mesmas quantidades de cada produto, diminuindo apenas a temperatura para 300 ºC e mantendo o mesmo tempo de reação por 1 hora. Após concluída a reação siguiou-se o mesmo procedimento na separação e caracterização dos produtos da reação.

Vale salientar, que o Grupo de Pesquisa do GreenTec/UFRJ tem realizado parcerias estratégicas com universidades da Finlândia na produção de hidrocarbonetos renováveis a partir de diversos bio-óleos. Vários trabalhos vêm sendo publicados pelo GreenTec dentro desse tema.

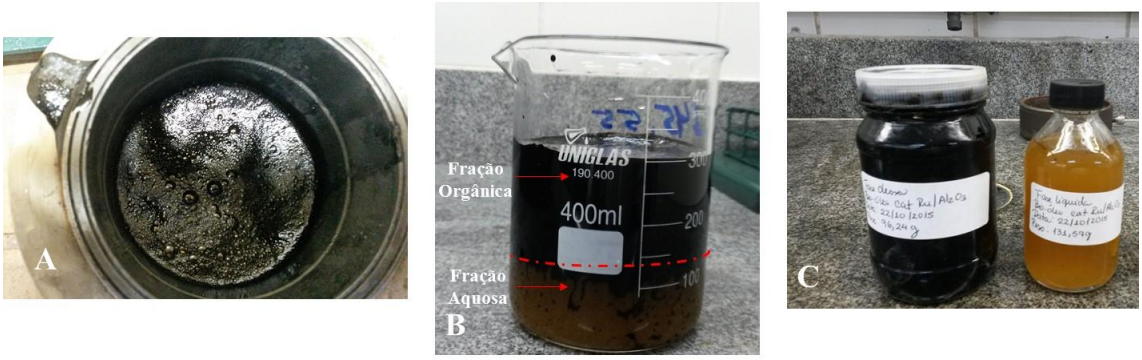


Figura 3.33. (A) Produto da reação;(B) Separação das fases;(C) Fração orgânica e aquosa com resíduos do catalisador.

3.10.4 **Caracterização da fase orgânica obtida na reação de produção de hidrocarbonetos**

A caracterização da fração orgânica, produzida nas reações anteriormente descritas, enquanto a índice de acidez e índice de iodo foi realizada seguindo a mesma metodologia utilizada na caracterização do extrato apolar (bio-óleo), conforme descrito no item 3.9.

Para a identificação dos hidrocarbonetos formados nas reações de hidrodesoxigenação e hidracraqueamento do bio-óleo utilizou-se metodologia descrita à continuação:

0,05 g de amostra foram dissolvidas em 2 mL de heptano. Para análise, 1µL desta solução foi injetado em um cromatógrafo Shimadzu, modelo GC-2014 com injetor on-column, detector de ionização de chama (FID), coluna cromatográfica DB-23 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm). Injetor: rampa de temperatura recomendada pelo fabricante 40ºC de temperatura inicial aumentando até 250ºC, pressão de gás de arraste (H_2): 3 mL/min a 40°C. O tempo de análise para cada amostra foi de 135 min, e temperatura de 250 ºC. A identificação dos hidrocarbonetos foi realizada por comparação com o tempo de retenção de padrões de hidrocarbonetos parafínicos e aromáticos (tolueno e xileno), aspecto que restringe a identificação dos produtos de interesse.

Capítulo 4. Resultados e discussões

Etapa 1: Absorção de CO_2 pela microalga *Monoraphidium* sp. cultivada em fotobiorreator fechado tipo Janela

4.1 Monitoramento das condições de cultivo da microalga *Monoraphidium* sp.

Conforme é possível verificar na Tabela 4.1, o cultivo nas condições externas (planta piloto) chegou a receber em alguns horários (entre 10:00 h e 12:00 h) praticamente seis vezes mais luz que a quantidade recebida pelo inóculo em condições laboratoriais (400 µ fótons m^{-2} s^{-1}). Do ponto de vista da fotossíntese esse aumento na quantidade de luz pode influenciar positivamente na produção de biomassa. No entanto, é importante destacar que um excesso de luz também pode levar à fotoinibição, atuando como um fator limitante ao crescimento da microalga Fernandez, (2014).

Outro aspecto importante, relacionado com a intensidade de luz, foi levantado por Richmond, (2004). Este autor observou que quanto maior é a densidade da população de microalgas torna-se mais complexo conseguir uma distribuição uniforme da luz em algumas áreas do fotobiorreator.

Em relação à temperatura do cultivo é possível observar na Tabela 4.1 que, apesar de não haver sido controlada, a temperatura média por dia não superou os 38 ºC, mantendo-se dentro do intervalo de temperaturas recomendado para o cultivo da maioria das espécies de microalgas (20 - 35 ºC) (Razzak *et al*, 2013) e Benemann, (2012).

Ruiz, (2011) destaca que em sistemas de cultivo fechados em regiões quentes é necessária a adição de sistema de refrigeração, já que a relação entre a quantidade de luz e a temperatura pode afetar a produtividade da biomassa.

Tabela 4.1. Condições de cultivo da microalga *Monoraphidium sp*. no fotobiorreator fechado tipo "Janela".

Parâmetros	Horário (h)	Dias												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Iluminação µfótonsm^{-2}s^{-1}	8:00	1151,00	845,46	1643,50	990,23	960,89	987,99	1192,44	1192,44	997,34	1100,22	1259,98	1331,77	960,97
	10:00	2250,52	1017,52	1380,32	1283,32	1148,04	2089,67	1200,00	2100,23	1100,99	1331,77	1487,67	1516,65	1215,67
	12:00	2380,23	1250,80	1890,42	1324,19	1540,76	1540,76	1592,12	1126,02	1411,98	1746,81	1580,98	2053,21	1498,98
	14:00	1897,78	1082,86	980,42	889,38	1455,80	1455,80	1211,74	1500,11	1090,89	1507,97	1100,34	1699,56	960,79
	16:00	820,48	810,86	779,98	762,02	769,11	803,24	770,86	965,23	1198,72	1156,35	987,87	890,98	897,45
	18:00	760,31	715,33	699,45	730,18	732,50	749,56	814,33	831,25	723,56	743,78	759,98	700,61	735,13
	20:00	698,14	615,69	690,88	698,34	697,93	695,89	692,87	697,27	601,27	599,98	690,33	697,99	600,99
Temperatura °C	8:00	20	20	22	21	21	22	22	21	21	21	21	21	21
	10:00	30	25	31	31	31	33	34	33	32	29	33	32	33
	12:00	33	29	35	34	36	37	37	38	33	35	38	36	36
	14:00	29	28	32	31	34	34	35	34	34	33	34	34	34
	16:00	30	26	29	31	29	29	32	31	31	31	31	32	31
	18:00	25	24	25	24	24	24	29	29	25	25	25	24	24
	20:00	22	22	22	23	23	22	24	24	23	24	24	22	23

4.2 Produção de Biomassa vs Consumo de CO_2

Teoricamente, de acordo com o valor de peso seco reportado na Tabela 4.2 no momento da colheita haviam no reator 53,03 g de biomassa úmida. Depois de centrifugar e liofilizar, foram obtidas 44,74 g de biomassa seca. Considerando como referência o valor teórico, houve uma perda de aproximadamente 15% de biomassa nas etapas de colheita e concentração (centrifugação), fundamentalmente na transferência da biomassa de um recipiente para outro.

Segundo os resultados da Tabela 4.2, no início do cultivo (dia 0) por cada grama de biomassa estavam sendo consumidos 0,79 g de CO_2. No sexto dia de cultivo por cada grama de biomassa foram consumidos 0,61 g de CO_2. Já no último dia de cultivo (dia 12) por cada grama de cultivo foram consumidos 0,3 g de CO_2. O melhor resultado foi obtido após 24 h de cultivo, onde por cada grama de biomassa consumiu-se aproximadamente 1,2 g de CO_2.

Este comportamento está totalmente de acordo com os resultados de cultivos descritos na literatura (Holbrook *et al*, 2014), onde durante a fase de crescimento celular o processo de fotossíntese é muito mais intenso e consequentemente o consumo de CO_2 é superior. Na medida em que transcorrem os dias, parte das células que estão sendo contabilizadas nas análises de contagem celular ou na determinação de peso seco não consomem CO_2 porque estão mortas. Este comportamento é observado em cultivos em batelada. Nos cultivos em contínuo, como usualmente acontece em escala comercial, é possível manter o nível de absorção de CO_2 sempre em níveis elevados.

Tabela 4.2. Monitoramento do crescimento celular contagem de células, biomassa seca e consumo de CO_2.

Dias de cultivo	Contagem celular (células/mL)	Peso seco (mg/L)	Quantidade de biomassa no reator (g)	Consumo de CO_2 (L/dia)	Consumo de CO_2 (g/dia)
0	$6,05 \times 10^6$	84,44 ± 0,10	7,56	3,03	6,00
1	$7,70 \times 10^6$	88,22 ± 0,01	7,94	4,82	9,50
2	$8,05 \times 10^6$	122,22 ± 0,03	11,00	5,30	10,50
3	$1,10 \times 10^7$	177,33 ± 0,01	15,96	5,63	11,10
4	$1,88 \times 10^7$	264,00 ± 0,00	23,76	8,13	16,10
5	$2,06 \times 10^7$	310,67 ± 0,00	27,96	9,55	18,80
6	$2,14 \times 10^7$	346,00 ± 0,06	31,14	9,63	19,00
7	$2,62 \times 10^7$	400,67 ± 0,00	36,06	9,02	17,80
8	$2,71 \times 10^7$	423,78 ± 0,01	38,14	8,53	16,90
9	$2,75 \times 10^7$	520,44 ± 0,02	46,84	8,38	16,60
10	$3,19 \times 10^7$	525,11 ± 0,02	47,26	8,33	16,50
11	$4,72 \times 10^7$	569,11 ± 0,01	51,22	7,95	15,70
12	$4,39 \times 10^7$	589,33 ± 0,03	53,03	7,92	15,70

Analisando a curva de crescimento do cultivo no fotobiorreator de Janela (Figura 4.1) observa-se uma fase lag ou de adaptação durante os primeiros dois dias de cultivo, seguida de uma fase de crescimento exponencial que inicia a partir do 48 horas de cultivo, com elevada taxa de crescimento, até o dia onze observando-se uma queda na concentração no dia doze. Neste caso o cultivo foi concentrado antes de chegar à fase estacionária onde predomina a morte celular (Williams *et al.*, 2002).

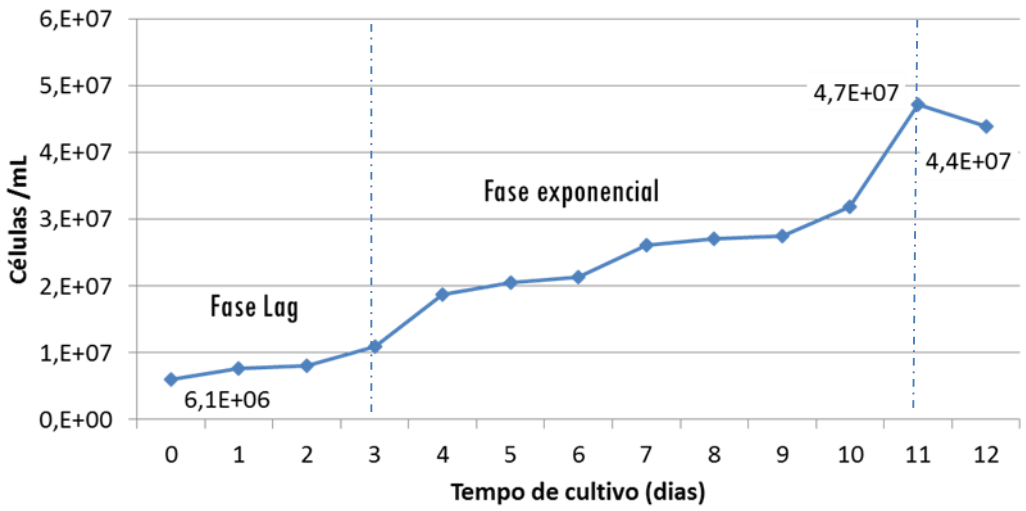


Figura 4.1. Curva de crescimento da microalga *Monoraphidium* sp. cultivada em fotobiorreator tipo Janela de 110 L.

Na Figura 4.2 relaciona-se o consumo de CO_2 com a quantidade de biomassa presente no fotobiorreator. Neste gráfico é possível visualizar o comportamento descrito anteriormente a partir dos resultados da Tabela 4.2.

De acordo com o gráfico 4.2 o maior consumo de CO_2 ocorreu durante os seis primeiros dias e depois começou a diminuir. Observa-se que ao longo do cultivo o crescimento da biomassa aumenta nestes seis primeiros dias e após começa a diminuir. Devido a isto o cultivo foi realizado até o dia doze já que o foco desta pesquisa foi monitorar o consumo de CO_2 na microalga *Monoraphidium* sp.

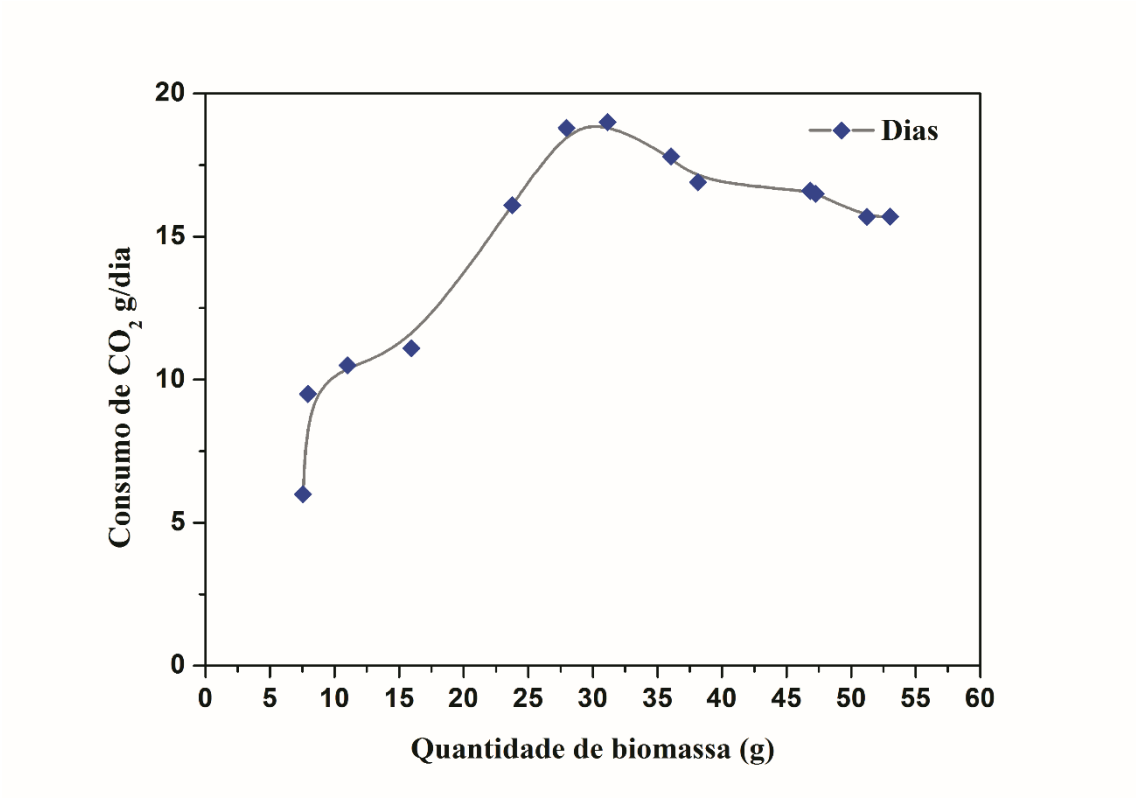


Figura 4.2 Quantidade de biomassa vs consumo de CO_2 no cultivo de *Monoraphidium* sp.

Vale salientar que o consumo de CO_2 foi contabilizado em um período de 12 horas, contemplando o intervalo entre 8:00 a 20:00 horas, incluindo o horário de maior incidência solar e por tanto de maior fotossínteses. O tempo de cada injeção de CO_2 foi em média de 11 a 15 segundos.

Na Figura 4.3 é possível observar o incremento da densidade celular no cultivo, percebendo-se uma mudança na coloração.

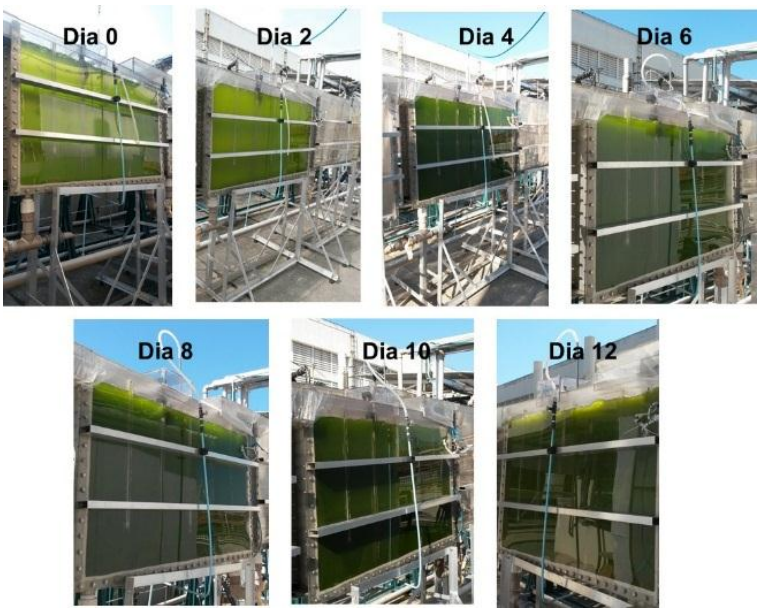


Figura 4.1 Aumento da densidade celular da biomassa de *Monoraphidium* sp. durante 12 dias de cultivo em fotobiorreator tipo Janela de 110 L.

4.3 Concentração de biomassa e determinação do teor de umidade

A biomassa de microalga concentrada por centrifugação, apresentou um elevado teor de umidade (91,45%). Aresta *et al* (2005), mencionaram que umas das questões mais importantes para a utilização de algas como proposta energética é seu elevado teor de água entre 80-90%, contudo, para obter energia a partir da biomassa algal a viabilidade do processo aumenta com a diminuição do teor de umidade da biomassa.

4.4 Caracterização da biomassa liofilizada

A biomassa da microalga *Monoraphidium* sp., cultivada no fotobiorreator, depois de centrifugada e liofilizada foi caracterizada seguindo os procedimentos descritos no item 3.7 do capítulo de materiais e métodos.Os resultados da caracterização são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Composição da biomassa da microalga *Monoraphidium* sp.

Espécie	Proteínas%	Carboidratos %	LT %	LCB %
***Monoraphidium* sp.**	34,26 ± 0,41	32 ± 3,37	17,33 ± 3,27	8,36 ± 2,79%

Os teores de proteínas e carboidratos obtidos neste estudo se correspondem com os valores reportados na literatura para esta espécie de microalga que estão entre 28 e 45% de proteínas e 17 – 35% de carboidratos (Díaz *et al.*, 2015, Jaruwan *et al.*, 2010). De acordo com estos resultados, a biomassa desta microalga é de interesse para a indústria de alimentos e para a produção etanol a partir dos carboidratos (Ramaraj, 2010).

O teor de lipídios totais (LT) nesta biomassa, obtido pela metodologia de Bligh & Dyer (1959), foi de 17,33%. Segundo a literatura o teor de lipídios na biomassa seca de *Monoraphidium* sp. está entre 15% e 35%, portanto o resultado obtido no presente trabalho está dentro da faixa de valores esperados (Díaz *et al*., 2015; Jaruwan *et al*. 2010). A concentração de lipídios pode variar dependendo do meio e das condições de cultivo utilizadas (Yu, *et al.*, 2012).

O teor de lipídios convertíveis em biodiesel (LCB) foi de 8,36%, valor considerado baixo quando comparado com outros estudos que aparecem na literatura que reportam valores entre 15 e 20% (Scragg *et al*., 2002). Alguns trabalhos também tratam sobre a possível manipulação dos meios de cultivo, visando maximizar o teor de lipídios convertíveis em biodiesel, através da deplexão de nutrientes como nitrogênio e fósforo (Wang *et al*., 2008).

Neste caso, o baixo teor de LCB presente na biomassa cultivada no fotobiorreator tipo Janela pode estar relacionado com a composição do meio de cultura ASM-1, utilizado fundamentalmente para manutenção de cepas em escala laboratorial e consequentemente com baixa concentração de nutrientes, quando comparado com outros meios de cultivo comunmente utilizados em maior escala como BG-11 ou Bolds Basal Medium (BBM) (Da Silva *et al.*, 2009).

Segundo Gomes, (2012), o teor de LCB extraído da microalga *Monoraphidium* sp. foi de 12,51%. Nesse estudo foram testadas diferentes técnicas de rompimento da parede celular.

Ciertamente a diferença entre os teores de lipídios totais e de lipídios convertíveis em biodiesel reportados na literatura, na maioria dos casos, deve-se às diferentes metodologias de rompimento celular e de extração utilizadas pelos autores.

A partir do óleo extraído na quantificação do teor de lipídios convertíveis em biodiesel foi identificado o perfil lipídico desta fração (Tabela 4.4), seguindo a metodologia descrita no item 3.7.3 do capítulo de materiais e métodos.

Tabela 4.4 Perfil lipídico da microalga *Monoraphidium* sp. cultivada no fotobiorreator tipo Janela.

Identificação			**% Área**
Láurico	C12:0	SAFA	0,19
Mirístico	C14:0	SAFA	1,65
Pentadecanóico	C15:0	SAFA	0,35
Cis-10 Pentadecanóico	C15:1:0	MUFA	0,03
Palmitíco	C16:0	SAFA	6,75
Palmitoléico	C16:1	MUFA	0,78
Esteárico	**C18:0**	**SAFA**	**41,71**
Oléico	**C18:1**	**MUFA**	**16,09**
Linoléico	C18:2	PUFA	10,19
Linolênico	**C18:3**	**PUFA**	**16,50**
Araquídico	C20:0	SAFA	2,04
Araquidônico	C20:4	PUFA	0,16
Eicosapentanóico	C20:5	PUFA	0,46
Erúcico	C22:1	MUFA	0,32
Cis-13,16-Docosadienóico	C22:2	PUFA	1,76
Lignocérico	C24:0	SAFA	1,02

Os resultados apresentados na Tabela 4.4 mostram a seguinte distribuição no perfil lipídico da microalga *Monoraphidium* sp. cultivada no fotobiorreator tipo Janela: teor de SAFA > PUFA > MUFA. Dentro dos SAFA`s destaca-se o C18:0 (esteárico) em relação aos PUFA`s C18:1 (Linoléico) e C18:3 (Linolênico), já o MUFA que se apresentou-se em maior quantidade foi o C18:1 (oléico).

Segundo (Yu *et al*, 2012) a *Monoraphidium* sp. cultivada em Yunnan-China apresentou 23,80 % de SAFA e 68 % de PUFAS.

O perfil lipídico das microalgas também depende do meio e das condições de cultivo.

Etapa 2: Produção de hidrocarbonetos renováveis, a partir do bio-óleo extraído da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp.

4.5 Processamento da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp. e extração do bio-óleo

4.5.1 Teor de umidade da biomassa

Na Tabela 4.5 apresenta-se o teor médio de umidade da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium sp*, após centrifugação, utilizada em cada uma das bateladas (ensaios). Conforme é possível verificar nos resultados, ainda após centrifugação, a biomassa tem um elevado teor de água. A maior parte desta água é impossível de extrair pelos processos convencionais de separação (centrifugação, floculação ou microfiltração) porque está no interior da célula.

Tabela 4.5 Teor de umidade da biomassa úmida de *Monoraphidium* sp.

Ensaio	Biomassa úmida processada (kg)	Teor médio de umidade (%)	Biomassa seca (kg)
1	12,95	78,90 ± 3,02	2,73
2	10,00	81,36 ± 2,78	1,86

4.5.2 Reação de hidrotatamento térmico da biomassa microalgal

A reação de hidrotratamento térmico da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp. foi realizada nas condições descritas no item 3.8.1 da seção de materiais e métodos. Durante o tempo de reação (1h) foram monitoradas as variações de pressão, mostradas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 Variação da pressão durante o tempo da reação de hidrotatamento térmico.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (psi) Ensaio 1	Pressão (psi) Ensaio 2
180	0	365	339
	15	400	357
	30	428	372
	45	447	383
	60	465	391

Em ambas as bateladas, realizadas à temperatura constante de 180 ºC observou-se um incremento da pressão na medida em que transcorria a reação, indicando formação de gases.

Durante o transcurso da reação foram percebidas características organolépticas como odor a amônia, provavelmente devido à desnaturalização das proteínas, e forte cheiro de café.

Uma das vantagens de processar a biomassa através do processo hidrotérmico está no fato de poder processar a biomassa úmida, sem necessidade de etapa de secagem.

4.5.2.1 Quantificação das fases e balanço de massa

Considerando a massa de biomassa úmida de *Monoraphidium* sp. processada em cada batelada (12,95 kg e 10,00 kg, respectivamente) e a massa de produtos ao final de cada reação, apresenta-se na Tabela 4.7 um balanço de massa. Observa-se que o rendimento da reação foi de aproximadamente 98% de fração líquida/sólido e 2% de gases.

Tabela 4.7 Balanço de massa da reação de hidrotratamento térmico biomassa úmida de *Monoraphidium sp*.

Ensaio	Massa inicial de biomassa úmida (kg)	Massa final de produtos (kg)	Perdas por formação de gases (kg)
1	12,95	12,70	0,25
2	10,00	9,80	0,20

Conforme descrito no item 3.8.2 do capítulo de materiais e métodos, o produto da reação foi transferido do copo do reator para um garrafão de vidro de vinte (20 L) e deixado em repouso por aproximadamente 20 h, para observar a separação das fases. Transcorrido o tempo, observaram-se duas fases, uma fase superior líquida e outra inferior líquida/sólido (Figura 3.23). Ambas as fases foram separadas e quantificadas (Tabela 4.8).

Tabela 4.8. Quantificação das fases formadas após reação de hidrotratamento térmico.

Ensaio	Fase superior líquida (g)	Fase inferior (líquida/sólido g)
1	4.600,00 (36,22%)	8.100,00 (63,78%)
2	6.100,00 (62,24%)	3.700,00 (37,76%)

A fase líquida superior na segunda batelada foi maior do que na primeira batelada porque a biomassa utilizada tinha maior teor de umidade.

4.5.2.2 Extração da fração apolar (bio-óleo) da fase superior líquida

Na fase superior líquida adicionou-se hexano e sal comum. As quantidades de cada produto estão descritas na Tabela 3.3. A mistura foi agitada para favorecer a extração dos componentes apolares e mantida em repouso até conseguir a separação das frações.

Após três horas, se observou a formação de três fases: apolar, polar e uma terceira de sólidos residuais (Figura 3.25). A fase apolar da cor marrom foi separada em um funil de 2.000 mL e lavada com água destilada para retirar qualquer resíduo de sal. Seguidamente, recuperou-se o hexano por rotaevaporação. As quantidades de bio-óleo, extraídas da fração líquida superior, e o volume de solvente recuperado são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Bio-óleo extraído da fase superior líquida e volume de hexano recuperado.

Ensaio	Fração apolar extraída (Bio-óleo) (g)	Volume de hexano recuperado (mL)
1	3,46	1.280,00
2	4,01	1.700,00

O bio-óleo extraído da fase líquida superior, resultante da reação hidrotratamento térmico, representa aproximadamente 0,13 e 0,22%, respectivamente, da biomassa seca utilizada em cada batelada (Tabela 4.5).

O volume de hexano recuperado representa praticamente a metade do volume adicionado devido à baixa capacidade de retificação do evaporador rotativo.

A fração polar separada da fase superior líquida foi descartada e os sólidos residuais, separados na terceira fração, misturados com a fração inferior líquida/sólido.

4.5.2.3 Extração da fração apolar (bio-óleo) da fase inferior líquida/sólido

Na fase inferior líquida/sólido adicionou-se hexano e sal comum. As quantidades de cada produto estão descritas na Tabela 3.4. A mistura foi agitada para favorecer a extração dos componentes apolares e deixada em repouso. Neste caso, o tempo necessário para conseguir a separação das fases foi de 20 horas devido à presença de sólidos em suspensão.

A fração apolar separada foi posteriormente filtrada para retirada de algumas partículas sólidas residuais que ficaram nessa fração e lavada com água destilada para eliminar qualquer resíduo de sal. Seguidamente, recuperou-se o hexano por rotaevaporação. As quantidades de bio-óleo, extraídas da fração inferior líquida/sólido e o volume de solvente recuperado são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Bio-óleo extraído da fase inferior líquida/sólido e volume de hexano recuperado.

Ensaio	Fração apolar extraída (Bio-óleo) (g)	Volume de hexano recuperado (mL)
1	223,60	2.475,00
2	220,48	900,00

O bio-óleo extraído da fase líquida/sólido inferior, representa aproximadamente 8,19 % e 11,85 %, respectivamente, em relação à biomassa seca utilizada em cada batelada (Tabela 4.5).

O volume de hexano recuperado representa praticamente a metade do volume adicionado devido à baixa capacidade de retificação do evaporador rotativo.

A fração polar separada da fase inferior líquida/sólido foi filtrada para separar a biomassa residual sólida que foi quantificada e caracterizada. O filtrado foi descartado.

4.5.2.4 Biomassa residual quantificação e caracterização

A biomassa úmida residual resultante do processo de filtração foi pesada, os resultados são apresentados na Tabela 4.11. Adicionalmente, determinou-se o teor de umidade dessa biomassa.

Tabela 4.11.Quantificação da biomassa residual.

Ensaio	Biomassa residual úmida (g)	Teor de umidade (%)	Biomassa residual seca (g)
1	3.400,00	42,56	1.952,96
2	2.925,82	64,61	1.035,44

O teor de proteínas na biomassa residual é apresentado na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. Teor de proteínas na biomassa residual seca.

Ensaio	Teor de proteínas (%)
1	23,19 ± 0,06
2	21,41 ± 1,00

Segundo os resultados da Tabela 4.12 é possível verificar que o teor médio de proteínas na biomassa residual foi de 22,3%. Esta biomassa poderia ser separada da fase inferior líquido/sólido antes de adicionar hexano e dessa forma evitaria-se a presença de qualquer resíduo de solvente. A biomassa residual, depois de um estudo mais aprofundado em relação aos tipos de proteínas presentes, poderia ser utilizada na indústria de alimentos.

4.5.3 **Caracterização da fração apolar (Bio-óleo)**

O extrato apolar (Bio-óleo) extraído da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp. foi misturado e caracterizado. Na Tabela 4.13 segue as propriedades físico-químicas desse bio-óleo.

Tabela 4.13. Caracterização físico-química do bio-óleo.

Características	Unidade	Resultado
Biomassa	-	*Monoraphidium* sp.
Aspecto	-	Líquido marrão escuro
Densidade relativa à 25ºC	g/cm^3	0,86
Viscosidade Cinemática, 40ºC	cSt	64,56
Índice de acidez, máx	mg KOH/g	32,00
Índice de iodo	g/100g	83,00
Nitrogênio (N)	% massa	2,00
Carbono (C)	% massa	73,70
Hidrogênio (H)	% massa	11,40
Enxofre	% massa	< 0,30
Oxigênio (O)	% massa	10,30

A densidade do extrato apolar da microalga *Monoraphidium* sp. é similar à densidade do óleo combustível leve (0,85 g cm^{-3}) (Bridgwater, 2001).

A viscosidade do bio-óleo foi elevada (64,56 cSt). Autores como Lin e Li, (2009), reportaram valores similares em extratos apolares da microalga *Chlorella* sp. e atribuíram essa elevada viscosidade à presença de ácidos graxos saturados e também à presença de hidrocarbonetos complexos como é o caso dos antioxidantes.

O índice de acidez do bio-óleo extraído foi de 32 mg KOH/g (acidez de 16 %), similar à de outros óleos brutos como é o caso de algumas palmáceas e elevado quando comparado com óleos refinados.

Em relação ao índice de iodo o valor apresentado na Tabela 4.13 foi de 83 g I_2/100g de amostra. Este valor é inferior ao índice de iodo do óleo de soja (120 – 141 g I_2/100g) que apresenta um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, fundamentalmente, linoléico. O grau de insaturação está diretamente relacionado com a estabilidade

oxidativa, quanto maior o teor de produtos insaturados menor será a estabilidade à oxidação do produto.

- **Determinação do perfil de ésteres de ácidos graxos**

O perfil lipídico do bio-óleo extraído da microalga *Monoraphidium* sp., determinado por cromatografia gasosa, é apresentado na Tabela 4.14.

Tabela 4.14. Perfil lipídico do bio-óleo extraído da microalga *Monoraphidium* sp. cultivada no Raceway da UFRN - Natal.

Identificação			**% Área**
Láurico	C12:0	SAFA	0,72
Mirístico	C14:0	SAFA	5,90
Palmitíco	C16:0	SAFA	9,33
Palmitoléico	C16:1	MUFA	1,23
Esteárico	C18:0	SAFA	**31,74**
Oléico	C18:1	MUFA	**10,51**
Linoléico	C18:2	PUFA	5,28
Linolênico	C18:3	PUFA	**17,53**
Araquídico	C20:0	SAFA	7,97
Gadoléico	C20:1	MUFA	1,55
Behênico	C22:0	SAFA	0,53
Erúcico	C22:1	MUFA	0,71
Lignocérico	C24:0	SAFA	2,40
Nervônico	C24:1	MUFA	5,57

Os resultados apresentados na Tabela 4.14 mostram a seguinte distribuição no perfil lipídico da microalga *Monoraphidium* sp. cultivada no Raceway da UFRN - Natal: teor de SAFA > PUFA > MUFA. Destacam-se o SAFA C18:0 (esteárico), o PUFA C18:3 (Linolênico) e o MUFA C18:1 (oléico).

- **Análise elementar**

Os resultados de analisis elementar permitiram verificar que o teor de nitrogênio no bio-óleo extraído da microalga *Monoraphidium* sp. é ligeiramente superior à do petróleo (0,11 - 1,7%).

Os teores de carbono (73,7%) e hidrogênio (11,4%) também são similares aos encontrados em alguns tipos de petróleos (83 - 86% de carbono e 11 - 14% de hidrogênio) Chaiwong, *et al*, (2013).

O teor de oxigênio é elevado quando comparado com as concentrações presentes em petróleos (0,1 - 2%), devido à presença de compostos oxigendos como triglicerídeos e ácidos graxos.

- **Destilação simulada ASTM D2887**

Realizou-se a destilação simulada do bio-óleo com o objetivo de identificar a temperatura inicial e final de ebulição e o rendimento dos principais cortes. Os resultados desta análise, usados na construção da curva de destilação (Figura 4.4), são apresentados na Tabela 4.15. Observa-se que o ponto inicial de ebulição (PIE) foi à temperatura de 54,7 ºC e o ponto final (PFE) a 607,3 ºC.

Tabela 4.15 Destilação simulada do bio-óleo extraído da microalga *Monoraphidium* sp.

Rendimento (% massa)	**Temperatura (ºC)**
PIB	54,7
1.0	60,9
2.0	67,1
3.0	70,4
4.0	81,0
5.0	104,0
6.0	106,4
7.0	118,4
8.0	135,2
9.0	138,9
10.0	145,0
11.0	154,2
12.0	158,3
13.0	170,2
14.0	177,0
15.0	185,3
16.0	194,4
17.0	204,5
18.0	215,0
19.0	228,7
20.0	232,7
21.0	240,9
22.0	244,6
23.0	251,1
24.0	261,8
25.0	272,0
26.0	278,4
27.0	280,3
28.0	285,4
29.0	291,1
30.0	295,4
31.0	304,3
32.0	308,4
33.0	314,1
34.0	320,1
35.0	321,0
36.0	321,8
37.0	324,0
38.0	328,4
39.0	334,2
40.0	335,5
41.0	336,3
42.0	337,7
43.0	339,0
44.0	340,4
45.0	342,5
46.0	343,8
47.0	346,6
48.0	353,6
49.0	356,6
50.0	358,8
51.0	361,2
52.0	362,5

53.0	363,4
54.0	364,3
55.0	365,1
56.0	365,8
57.0	366,5
58.0	367,5
59.0	370,1
60.0	374,3
61.0	379,5
62.0	382,7
63.0	384,9
64.0	391,0
65.0	398,5
66.0	405,6
67.0	414,3
68.0	421,5
69.0	428,8
70.0	434,0
71.0	440,3
72.0	447,4
73.0	454,8
74.0	461,8
75.0	465,9
76.0	468,5
77.0	469,9
78.0	474,7
79.0	481,4
80.0	487,5
81.0	491,0
82.0	495,9
83.0	501,3
84.0	503,9
85.0	507,0
86.0	513,1
87.0	519,5
88.0	527,0
89.0	533,5
90.0	537,9
91.0	544,3
92.0	547,8
93.0	553,7
94.0	561,6
95.0	569,9
96.0	576,2
97.0	582,8
98.0	589,6
99.0	600,5
PFE	607,3

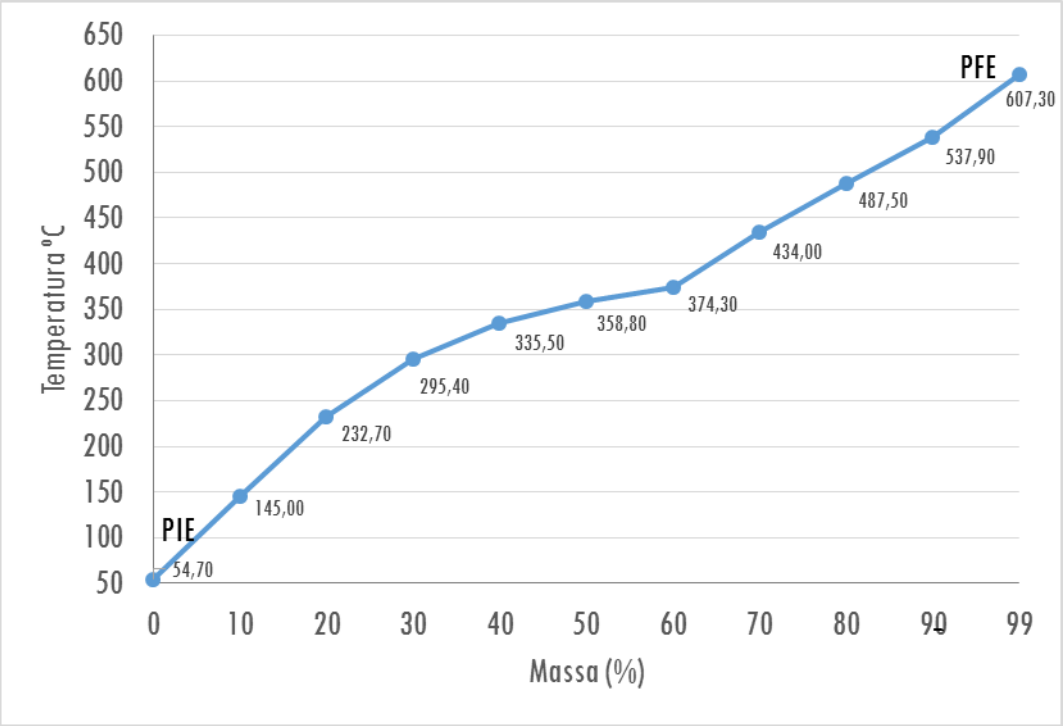


Figura 4.2 Curva de destilação para o bio-óleo bruto.

Segundo os resultados anteriores é possível definir que:

- Na amostra ainda existia aproximadamente 3 % de hexano usado como solvente extrator;
- Aproximadamente 15 % do bio-óleo destilou no intervalo de temperatura de uma nafta (80 – 220 ºC)
- 20 % de amostra destilou no intervalo de temperatura dos hidrocarbonetos usados na formulação de querosene de aviação (150 – 300 ºC);
- 35 % da amostra destilou no intervalo de temperatura de um gasóleo (300 – 400 ºC);
- 15% da amostra destilou acima de 510 ºC, considerado resíduo na indústria de petróleo.

Mendes, (2010) em seu estudo de extração de bio-óleo a partir de lodo de esgoto encontrou que cerca de 33 %m/m da amostra de bio-óleo destilou a menos de 170 °C, 27,2 % m/m destilou entre 170-370 °C e cerca de 38,8 %m/m acima dessa temperatura.

4.6 Produção de hidrocarbonetos renováveis a partir do bio-óleo

4.6.1 Catalisador

O catalisador utilizado neste trabalho foi de 5% de rutênio suportado em alumina (Ru/Al_2O_3) tipo H213B/D, fornecido pela empresa "Evonik Degussa". Selecionado a partir dos resultados positivos obtidos em testes realizados no Laborátorio de Tecnologias Verdes – Greentec visando a produção de hidrocarbonetos a partir de óleo de soja refinado. As características do catalisador, relacionadas no certificado de qualidade do produto, são apresentadas na Tabela 4.16.

Tabela 4.16. Características do catalisador 5% Ru/Al_2O_3.

Característica	Método	Resultado
Área superficial específica (BET), $m^2.g^{-1}$	Adsorção física do nitrogênio	105
Tamanho da partícula do metal, nm	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	2,5 ± 1,1
Tamanho de partícula, nm	Quimissorção de hidrogênio	3,49

A área superficial específica deste catalisador foi de 105 $m^2.g^{-1}$, inferior à área do suporte (γ-alumina = 188,44 $m^{2\cdot}g^{-1}$). Esta redução da área deve-se possívelmente ao bloqueio parcial dos poros do suporte pelas partículas de rutênio Wildschut, *et al*, (2009).

Wildschut *et al*, (2009), utilizaram o catalisador Ru/Al_2O_3 na produção de bio-óleo em reator batelada com condições de reação de 4 h, pressão de 200 bar e temperatura de 350 ºC, conseguindo uma conversão a hidrocarbonetos de 78%.

Os catalisadores a base de metais nobres (Ru, Rh, Pd e Pt) mostram-se com potencial para a produção de hidrocarbonetos, similares aos hidrocarbonetos presentes no petróleo, a partir de óleos e gorduras.

4.6.2 Reação de produção de hidrocarbonetos a partir do bio-óleo obtido da microalga *Monoraphidium* sp.

Foram realizadas duas reações, conforme descrito no item 3.10.3. A primeira, realizada em condições mais severas (temperatura de 350 ºC e pressão de 3.250,00 psi) e a segunda, em condições mais brandas (300 ºC e pressão de 1.150 psi). Em ambas as reações utilizou-se o mesmo catalisador.

Na Tabela 4.17 apresentam-se os valores de temperatura e pressão resultantes do monitoramento destes parâmetros durante o processamento do bio-óleo.

Tabela 4.17. Condições operacionais durante o processamento do bio-óleo.

Tempo (min)	Temperatura 300 °C	Pressão (psi)	Temperatura 350ºC	Pressão (psi)
0	26	*	26	*
15	97	*	107	*
30	178	*	181	300
45	228	350	242	450
60	300	800	310	850
75	300	850	350	1.100
90	300	920	350	1.900
105	300	1.150	350	2.200
120	300	980	350	3.250
135	-	-	350	2.800

Nota-se que para atingir as temperaturas de reação de 300 ºC e 350 ºC precisou-se de 1 hora para a reação a 300 ºC e de 1 hora e 15 minutos para a reação a 350 ºC. Também, percebeu-se formação de gases que provocaram aumento da pressão. Este comportamento deve-se à formação de hidrogênio, produzido por reações de reforma em fase líquida do glicerol e também à formação de gases por reações de hidrocraqueamento. Logo, verifica-se uma redução leve de pressão na mesma condição de temperatura devido ao consumo de parte do hidrogênio produzido.

Nesta reação ocorre formação de hidrogênio devido à reforma em fase líquida do glicerol, formado durante a hidrólise dos triglicerídeos, e também a partir do glicerol adicionado propocitalmente para aumentar a produção de hidrogênio in-situ. Este hidrogênio é consumido nas reações de hidrodesoxigenação, hidrocraqueamento e hidrotratamento.

Depois de concluídas as reações, em ambos os casos observou-se a formação de duas fases: uma orgânica e outra aquosa com resíduos de catalisador (Figura 3.33).

Na Figura 4.5 apresenta-se um balanço de massa da primeira reação, realizada a 350 ºC.

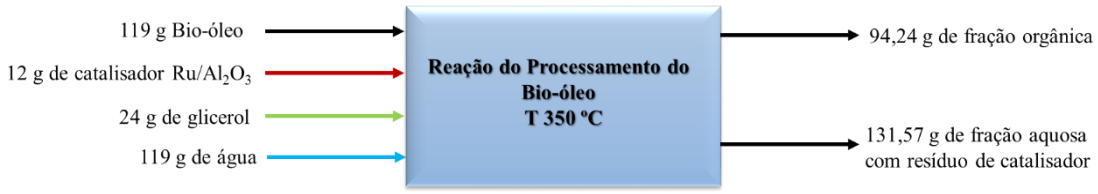


Figura 4.3 Reação de processamento do bio-óleo a 350 ºC para produção de hidrocarbonetos.

Segundo a Figura 4.5 a massa total de produto após a reação de processamento do bio-óleo foi de 225,81 g, com uma perda de 48,19 g (17,6 %) em relação à massa inicial (274 g) por formação de gases. Do produto final 41,73 % correspondem à fração orgânica e 58,27 % à fração aquosa com resíduo de catalisador.

Na Figura 4.6 apresenta-se um balanço de massa da segunda reação, realizada a 300 ºC.

Figura 4.4 Reação de processamento do bio-óleo a 300 ºC para produção de hidrocarbonetos.

Segundo a Figura 4.6 a massa total de produto após a reação de processamento do bio-óleo foi de 249,63 g, com uma perda de 24,37 g (8,89 %) em relação à massa inicial (274

g) por formação de gases. Do produto final 35 % correspondem à fração orgânica e 65 % à fração aquosa com resíduo de catalisador.

4.6.3 Caracterização da fase orgânica obtida na reação de produção de hidrocarbonetos

A fase orgânica obtida na reação de produção de hidrocarbonetos a partir do bio-óleo extraído da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp. foi caracterizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.10.4.

Na Tabela 4.18 apresenta-se a caracterização da fase orgânica obtida em ambas as reações em quanto a índice de acidez e índice de iodo.

Tabela 4.18 Caracterização da fase orgânica.

Características	Fase orgânica reação a 350 ºC	Fase orgânica reação a 300 ºC
Índice de acidez, mg KOH/g	20,00	45,00
Índice de iodo, g/100g	5,00	12,00

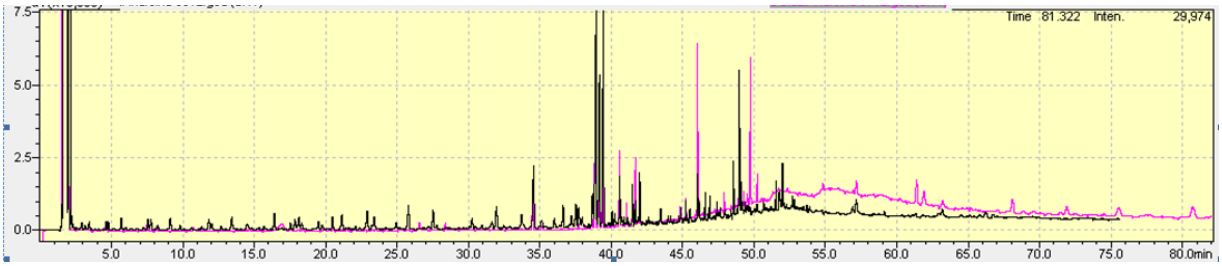
Os resultados da Tabela 4.18 mostram que o índice de iodo nas frações orgânicas, produzidas nas duas condições experimentais, diminuiu consideravelmente em relação ao índice de iodo da matéria-prima (bio-óleo) que era de 83 g de I_2/g de amostra. Mostrando a ocorrência de hidrogenação dos compostos insaturados. No entanto, não chegou a ser uma hidrogenação completa, condição na qual o índice de iodo chegaria a zero.

Em relação ao índice de acidez observa-se na reação realizada a 350 ºC uma redução, caindo de aproximadamente 15 % na matéria-prima para 10 % na fração orgânica. Este resultado indica que ainda quedaram ácidos graxos livres que não foram convertidos em hidrocarbonetos.

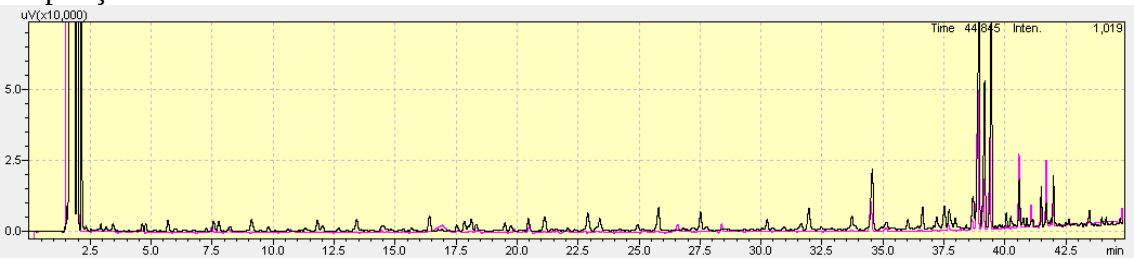
Já na reação realizada à temperatura de 300 ºC houve um aumento do índice de acidez de aproximadamente 15 % na matéria-prima para 22,5 % na fração orgânica. Este aumento indica que a essa temperatura predominou a reação de hidrólise dos triglicerídeos,

formando ácidos graxos livres, em lugar das reações de hidrodesoxigenação e hidrocraqueamento para a formação de hidrocarbonetos.

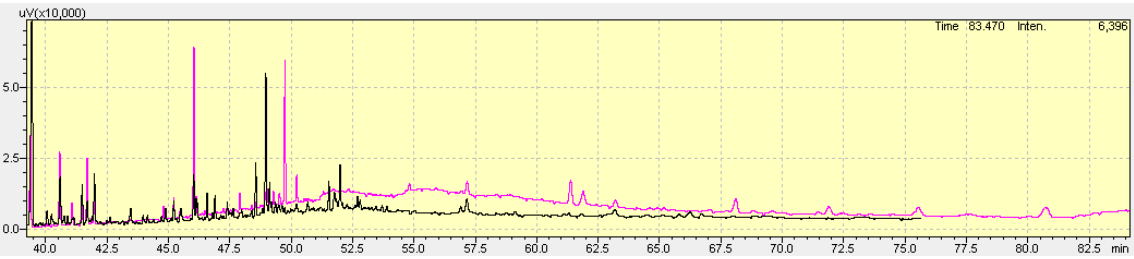
As frações orgânicas também foram analisadas em cromatografia gasosa para identificação dos hidrocarbonetos formados na reação, seguindo o procedimento descrito no item 3.10.4. Na Figura 4.7 apresenta-se o cromatograma das frações orgânicas obtidas do processamento do bio-óleo da microalga *Monoraphidium* sp. Nos Anexos 03 e 04 encontram-se as tabelas com a identificação dos picos de acordo com os padrões disponíveis.



Ampliação da área até 45min



Ampliação da área após 45min



*Cromatograma em preto: Reação a 350 ºC

*Cromatograma em rosa: Reação a 300 ºC

Figura 4.5. Cromatograma das frações orgânicas obtidas do processamento do bio-óleo da microalga *Monoraphidium* sp.

Analisando o cromatograma da fração orgânica obtida a partir do processamento do bio-óleo à temperatura de 350 ºC (Anexo 03 - Identificação dos picos) é possível dizer que o teor de hidrocarbonetos nessa fração orgânica é de aproximadamente 81,54 % (considerando os picos com tempo de retenção entre 2,33 e 47,98 minutos).

Considerando como alcoóis graxos os picos com tempo de retenção entre 48 – 50 min, de acordo com o padrão disponível, o teor de alcoóis graxos na amostra é de aproximadamente 9,63 %. Estes alcoóis graxos são produzidos por reação dos ácidos graxos com hidrogênio.

Depois dos picos de alcoóis graxos aparecem os picos de ácidos graxos. Na reação a 350 ºC o teor de ácidos graxos identificados na cromatografia foi de aproximadamente 8,83 %, similar ao valor de acidez determinado através da análise de índice de acidez (10%).

Analisando o cromatograma da fração orgânica obtida a partir do processamento do bio-óleo à temperatura de 300 ºC (Anexo 04 - Identificação dos picos) é possível dizer que o teor de hidrocarbonetos nessa fração orgânica é de aproximadamente 69,37 % (considerando os picos com tempo de retenção entre 2,33 e 47,98 minutos).

Considerando como alcoóis graxos os picos com tempo de retenção entre 48 – 50 min, de acordo com o padrão disponível, o teor de alcoóis graxos na amostra é de aproximadamente 13,54 %.

O teor de ácidos graxos identificados na fração orgânica produzida a partir do processamento do bio-óleo a 300 ºC foi de 22,58 %.

Os resultados apresentados anteriormente mostram que foi possível conseguir uma elevada conversão a hidrocarbonetos com o catalisador utilizado na condição experimental de 350 ºC. No entanto, à temperatura de 300 ºC beneficiou-se a reação de hidrólise, obtendo maior teor de ácidos graxos livres e menor rendimento de hidrocarbonetos. Em ambas as condições observou-se a hidrogenação das cadeias insaturadas.

Capítulo 5. Conclusões

As conclusões inferidas com base nos resultados obtidos e análises dos dados realizadas são:

1. Nas condições de cultivo utilizadas no fotobiorreator tipo Janela, a microalga *Monoraphidium* sp. mostrou-se eficiênte na fixação de CO_2, consumindo no dia de maior crescimento celular 1,2 g de CO_2 por grama de biomassa produzida;
2. Nos cultivos em batelada observa-se um aumento no consumo de CO_2 apenas nos primeiros dias de cultivo, depois esse consumo começa a diminuir;
3. Nos cultivos em contínuo, como usualmente acontece em escala comercial, é possível manter o nível de absorção de CO_2 sempre em níveis elevados;
4. Os sistemas de cultivo de microalgas poderiam ser acoplados às chaminés de grandes indústrias emissoras de CO_2 utilizando esse gás, resultante de processos de combustão, no processo de fotossínteses;
5. O CO_2 extraído na etapa de purificação do biogás poderia ser injetado nos fotobiorreatores de microalgas com o objetivo de dar um destino ecológico para esse gás contaminante, responsável pelo efeito estufa;
6. Na fase de crescimento a produtividade média de biomassa no fotobiorreator tipo Janela foi de 58 $mg.L^{-1}.dia^{-1}$;
7. A biomassa cultivada no fotobiorreator acumulou elevados teores de proteínas e carboidratos. Este último poderia ser utilizados na produção de etanol via fermentação;
8. O teor de lipídios convertíveis em biodiesel acumulado na biomassa não foi muito elevado. Se o foco desta biomassa fosse a produção de biodiesel, as condições e meios de cultivo deverão ser modificadas visando o acumulo dos lipídios de interesse;
9. O perfil lipídico do óleo presente na biomassa da microalga *Monoraphidium* sp., cultivada no fotobiorreator tipo Janela, apresentou o seguinte comportamento: SAFA > PUFA > MUFA. Destacando-se o SAFA C18:0 (esteárico), os PUFA`s C18:1 (Linoléico) e C18:3 (Linolênico) e o MUFA C18:1 (oléico);
10. A partir da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp., cultivada no Raceway da UFRN – Natal, foi possível extrair em média aproximadamente 10 % de bio-óleo; A maior parte deste bio-óleo foi extraído da fase inferior líquido/sólido obtida na reação de hidrotratamento térmico da biomassa úmida;

11. Na extração do bio-óleo deve utilizar-se uma mistura de solventes, tais como: hexano-etanol, com o objetivo de maximizar a extração de triglicerídeos e de outros componentes com polaridade média, como é o caso dos ácidos graxos;
12. O índice de acidez do bio-óleo extraído foi de 32 mg KOH/g (acidez de 16 %), similar à de outros óleos brutos;
13. O índice de iodo foi de 83 g I_2/100g de amostra, inferior ao índice de iodo do óleo de soja (120 – 141 g I_2/100g) que apresenta um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, fundamentalmente, linoléico;
14. Segundo a destilação simulada, aproximadamente 35 % dos componentes do bio-óleo destilam antes da temperatura final de ebulição dos destilados médios (300 ºC), 35 % no intervalo do gasóleo e 15 % acima de 510 ºC;
15. A composição elementar do bio-óleo foi bastante similar à composição de um petróleo, com exceção do teor de oxigênio que foi muito superior;
16. O perfil lipídico do bio-óleo extraído da biomassa úmida da microalga *Monoraphidium* sp., cultivada no Raceway da UFRN – Natal, apresentou o seguinte comportamento: SAFA > PUFA > MUFA. Destacando-se o SAFA C18:0 (esteárico), o PUFA C18:3 (Linolênico) e o MUFA C18:1 (oléico);
17. A biomassa residual, separada da reação de hidrotratamento térmico da biomassa úmida apresentou um teor de proteínas de 22,3 ± 053 %. Vale salientar que não foram identificados os tipos de proteínas presentes;
18. A fração orgânica obtida a partir do processamento do bio-óleo à temperatura de 350 ºC apresentou a seguinte composição: aproximadamente 81,54 % de hidrocarbonetos, 9,63 % de álcoóis graxos e 8,83 % de ácidos graxos livres;
19. A fração orgânica obtida a partir do processamento do bio-óleo à temperatura de 300 ºC apresentou a seguinte composição: aproximadamente 69,37 % de hidrocarbonetos, 13,54 % de álcoóis graxos e 22,58 % de ácidos graxos livres;
20. Na condição experimental de 350 ºC foi possível conseguir uma elevada conversão a hidrocarbonetos com o catalisador utilizado;
21. Na condição experimental de 300 ºC beneficiou-se a reação de hidrólise, obtendo maior teor de ácidos graxos livres e menor rendimento de hidrocarbonetos;
22. Em ambas as reações observou-se a hidrogenação das cadeias insaturadas;
23. As reações de hidrodesoxigenação, hidrocraqueamento e hidrotratamento consumiram o hidrogênio produzido in-situ por reforma em fase líquida do glicerol.

Capítulo 6. Sugestões

Para continuar com esta linha de pesquisa recomenda-se:

- ✓ Utilizar um meio de cultivo com maiores concentrações de nutrientes;
- ✓ Realizar estudos visando o aumento do teor de lipídios nesta microalga;
- ✓ Complementar o sistema atual de controle do pH, através da injeção de CO_2, com um sensor que permita monitorar o consumo de CO_2 de forma automática num computador;
- ✓ Avaliar a absorção de CO_2, proveniente de processos de combustão, pelas microalgas;
- ✓ Avaliar a absorção de CO_2, extraído de biogás, pelas microalgas;
- ✓ Avaliar outros métodos de extração do bio-óleo;
- ✓ Testar outros catalisadores na reação de processamento do bio-óleo, visando à produção de hidrocarbonetos;
- ✓ Avaliar a produção de hidrocarbonetos, através das reações utilizadas, partindo do biodiesel de microalgas.

Capítulo 7. Referências bibliográficas

Almares A. Produção de biodiesel mediante o processo de hidroesterificação da biomassa das microalgas Scenedesmus dimorphus e Nannochloropsis oculata. Universidade Federal do Rio de Janeiro –EQ/UFRJ, p 85, 2012.

Aresta, Michele, Angela Dibenedetto, Maria Carone, Teresa Colonna, and Carlo Fragale. 2005. "Production of Biodiesel from Macroalgae by Supercritical CO_2 Extraction and Thermochemical Liquefaction," 136–39. doi:10.1007/s10311-005-0020-3.

Ayodele O, Togunwa OS, Abbas HF, Daud WMAW. Preparation and characterization of alumina supported nickel-oxalate catalyst for the hydrodeoxygenation of oleic acid into normal and iso-octadecane biofuel. Energy Convers Manage 2014;88:1104–10.

Balzer I, Hardeland R. 1991. "Photoperiodism and Effects Ofindoleamines in a Unicellular Alga, Gonyaulax Polyedra." *Science*, 253:795–97.

Benemann J. 2012. "Microalgae for Biofuels and Animal Feed. Energies." 2013;6:5869–86. http://dx.doi.org/10.3390/en6115869.

Bligh, G. and Dyer, W. 1959 A Rapid Method for Total Lipid Extraction and Purification. Canadian Journal of Bio- chemistry and Physiology, 37, 911-917. http://dx.doi.org/10.1139/059-099.

Brennan, L.; Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and sustainable energy reviews, v. (14), n. 2, p. 557-577.

Bridgwater A.V., S. Czernik, J. Piskorz, in: Progress in Thermochemical Biomass Conversion, Blackwell Wissenschafts-Verlag, 2001, pp. 977–997.

B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Ed.Ac. Soc. Plant Physiology.

Cao JP, Zhao XY, Morishita K, Li LY, Xiao XB, Obara R, et al. Triacetonamine formation in a bio-oil from fast pyrolysis of sewage sludge using acetone as the absorption solvent. Bioresour Technol 2010;101:4242–5.

Chaiwong, K.T. Kiatsiriroat, N. Vorayos, C. Thararax. Study of bio-oil and bio-char production from algae by slow pyrolysis. Biomass and bioenergy 56 (2013) 600 e 606.

Cheng, Lihua, Lin Zhang, Huanlin Chen, and Congjie Gao. 2006. "Carbon Dioxide Removal from Air by Microalgae Cultured in a Membrane-Photobioreactor" 50: 324–29. doi:10.1016/j.seppur.2005.12.006.

Chisti, Y. 2008. "Biodiesel from Microalgae Beats Bioethanol." *Trend Biotechnol. 26, 126–131.*

Chiu, Sheng-yi, Chien-ya Kao, Chiun-hsun Chen, Tang-ching Kuan, Seow-chin Ong, and Chih-sheng Lin. 2008. "Reduction of CO_2 by a High-Density Culture of Chlorella Sp. in a Semicontinuous Photobioreactor" 99: 3389–96. doi:10.1016/j.biortech.2007.08.013.

Chiu, Sheng-yi, Chien-ya Kao, Ming-ta Tsai, Seow-chin Ong, Chiun-hsun Chen, and Chih-sheng Lin. 2009. "Bioresource Technology Lipid Accumulation and CO_2 Utilization of Nannochloropsis Oculata in Response to CO_2 Aeration." *Bioresource Technology* 100 (2). Elsevier Ltd: 833–38. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.061.

Choix, F. J., De-Bashan, L. E., Bashan, Y. 2012. "Enhanced Accumulation of Starch and Total Carbohydrates in Alginate-Immobilized Chlorella Spp. Induced by Azospirillum Brasilense: II. Heterotrophic Conditions. 2011." *Enzyme. Microb.*, 51, p.300–309.

Costa, Jorge Alberto Vieira, and Michele Greque de Morais. 2007. "Carbon Dioxide Fixation by Chlorella Kessleri , C . Vulgaris , Scenedesmus Obliquus and Spirulina Sp . Cultivated in Flasks and Vertical Tubular Photobioreactors," 1349–52. doi:10.1007/s10529-007-9394-6.

Da Silva, T.L., Reis, A., Medeiros, R., Oliveira, A.C., Gouveia, L., 2009. Oil production towards biofuel from autotrophic microalgae semicontinuous cultivations monitorized by flow cytometry. Appl. Biochem. Biotechnol. 159 (2), 568–578

Díaz, Gisel Chenard, Yordanka Reyes Cruz, René González Carliz, Rosa C Vitorino De Paula, Donato A Gomes Aranda, Marcellus A G Dario, Gustavo Saraiva Marassi, and Nelson C Furtado. 2015. "Cultivation of Microalgae *Monoraphidium* sp ., in the Plant Pilot the Grand Valle Bio Energy , for Biodiesel Production," no. July: 370–78.

Díaz, Gisel.Hidrólise e hidrogenação simultânea (óleo de soja e de sebo bovino) – efeito do metal Suportado. Universidad Federal de Rio de Janeiro, 2012.

Dieckelmann, G., Heinz, H.J., The basics of industrial oleochemistry. A comprehensive survey of selected technologies based on natural oils and fats.1ra edição. Mulheim/Ruhr,Germany: Peter Pomp Gmbh. p. 13 –37 e 177 – 180, 1988.

EBC.http://www.ebc.com.br/noticias/economia/2013/02/fabrica-de-biodiesel-vai-suprir-demanda-pelo-combustivel-no-rio. Acesso em: Setembro de 2015.

Fernandes M, C.S. Escalonamento do Cultivo e Extração de Óleo das Microalgas *Monoraphidium* sp. e Scenedesmus sp. para a Produção de Biodiesel.UFRJ-RJ. 2014.

Fernandez S, M.J. Interacción de las microalgas con la luz,2014. Disponível em: http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-6-interaccion-con-la-luz.html. Acesso em: Novembro 2015.

Franceschini, I.M.; Burliga, A.L.; Reviers, B.; Prado, J.F.; Rezig, S.H. Algas: uma abordagem filogenetica, taxonomica e ecologica. 332p. Artmed, Porto Alegre, 2010.

Fortes M. Fotobiorreatores para o cultivo de microalgas destinadas à produção de biodiesel. Disertação de Doutorado. UFRJ, 2015.

Furimsky, E F.E. Massoth, Catal. Today 52 (1999) 381–495.Embrapa. Diponível: https//www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/3392348/estudo-busca-bio-oleo-com-melhor-qualidade.Acesso em: 20/02_2016.

Gomes, Anderson, Marta Costa. 2012. "Estudo Térmico Da Degradação Do Material Lipídico Da Microalga *Monoraphidium* sp . Durante Seu Armazenamento . Resultados E Discussão," 2012.

González, A., V. Kafarov y A. Guzmán 2009. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. Prospect,2, 53-60.

Gorham, P.R., McLachlan, R.W. and Hammer, U.T. (1964) Isolation and Culture of Toxic Strains of (Lyngb.) de Breb. Anabaena flos-aquae. Verhandlungen der Internationalen Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie, 15, 796-804.

Greenwell, H. C. et al. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. Journal of Royal Society Interface. v. 7, p. 703-726, 2010.

Gunstone F.D.; An Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Fatty Acids andtheir Glycerides, Chapman & Hall, London 2, 1967.

Halim R, Danquah MK, Webley PA. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. Biotechnology Advances 2012;30(3):709–32.

Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. Renew. Sustain. Energy Rev. 14, 1037e1047.

Herzog, H., Golomb, D. 2004. "Carbon Capture and Storage from Fossil Fuel Use." *Encycl. Energy, 1e19.*

Ho, Shih-hsin, Wen-ming Chen, and Jo-shu Chang. 2010. "Bioresource Technology Scenedesmus Obliquus CNW-N as a Potential Candidate for CO_2 Mitigation and Biodiesel Production." *Bioresource Technology* 101 (22). Elsevier Ltd: 8725–30. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.112.

Holbrook, Gabriel P., Zachary Davidson, Robert a. Tatara, Norbert L. Ziemer, Kurt a. Rosentrater, and W. Scott Grayburn. 2014. "Use of the Microalga Monoraphidium Sp. Grown in Wastewater as a Feedstock for Biodiesel: Cultivation and Fuel Characteristics." *Applied Energy* 131: 386–93. doi:10.1016/j.apenergy.2014.06.043.

Huang, G.; Chen, F.; Wei, D. Biodiesel production by microalgal biotechnology. Applied Energy, v. 87, p. 38–46, 2010.

Jaruwan, Chonsongkram, Wanida Pan-utai, Afrasiab Khan Tareen, Imrana Niaz Sultan, and Pramuk Parakulsuksatid. 2010. “Screening of High-Lipid Content Microalgae for Biodiesel Production.”

Jeong H, Lee J, Cha M. 2013. “Energy Efficient Growth Control of Microalgae Using Photobiological Methods.” *Renewable Energy*, 54:161–65.

Kang, Juhyon, and Zhiyou Wen. 2015. “Use of Microalgae for Mitigating Ammonia and CO2 Emissions from Animal Production Operations — Evaluation of Gas Removal Efficiency and Algal Biomass Composition.” *Algal Research* 11. Elsevier B.V.: 204–10. doi:10.1016/j.algal.2015.06.020.

Kirk JTO (ed.) (1983) Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosys- tems. Cambridge University Press, Cambridge, 401 pp.

Kommareddy, A., Anderson, G. (2003). 2003. “Study of Light as a Parameter in the Growth of Algae in a Photo-Bio-Reactor (PBR). Las Vegas, USA.” *ASAE Annual International Meeting Presentation, Paper 034057.*

Lee, S. J.B. D. Yoon and H. M. Oh. 1998. “Biotechnol. Tech., 12, 553–556.”

Li, Y. 2006. “Utilization of Carbon Dioxide from Coal-Fired Power Utilização de Microalgas Para Mitigação de CO_2 Industrial.” Design Engineering of Energy and Geo-Environmental Systems Course (EGEE 580), 75.

Li Z, Savage PE. Feedstocks for fuels and chemicals from algae: treatment of crude bio-oil over HZSM-5. Algal Res 2013;2:154–63.

Lin,C-Y; Li,R-J. Fuel Properties of biodiesel produced from the crude fish oil from the soapstock of a marine fish, Fuel Processing Tecnology, 90, 130-136, 2009.

Mata TM, Martins AA, Caetano NS. 2010. “Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review.” *Renew Sust Energ Rev*, 14:217–32.

Martinez ME, Jimenez JM, Yousfi El. 1999. “Influence of Phosphorus Concentration and Temperature on Growth and Phosphorus Uptake by the Microalga Scenedesmus Obliquus.” *Bioresource Technology*, 67:233–40.

Meldon, Jerry H. 2011. “Amine Screening for Flue Gas CO 2 Capture at Coal-Fired Power Plants : Should the Heat of Desorption Be High, Low or in between ?” *Current Opinion in Chemical Engineering* 1 (1). Elsevier Ltd: 55–63. doi:10.1016/j.coche.2011.08.006.

Mendes M.J., O.A.A. Santos, E. Jordão, A.M. Silva, Appl. Catal. A: Gen. 217 (2001) 253–262.

Mercer P, Armenta RE. Developments in oil extraction from microalgae. European Journal of Lipid Science and Technology 2011;113(5):539–47.

Mendes E. Tesis: Aplicação do processo de pirólise lenta ao lodo de esgoto adicionado de óxido de cálcio e ferro para obtenção de bioóleo Combustível. Palmas,2010, 91.

Miyamoto K, Wable O, Benemann JR. n.d. "Vertical Tubularreactor for Microalgae Cultivation." *Biotechnology Letters*, 10:703–8.

Moheimani NR, Borowitzka MA. 2006. "The Long-Term Culture of the Coccolitho-Phorid Pleurochrysis Carterae (Haptophyta) in Outdoor Raceway Ponds." *Journal of Applied Phycology ;*, 18:703–12.

Morita, T., Assumpção, R. m. V., Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação. 2. Ed. São Paulo: Edgard blucher, 1972, 627.

Moretto, E.; Fett, R., Tecnologia de óleos de gorduras vegetais na indústria de alimentos. São Paulo, Varela, V.150, 1998.

Myklestad, S. & Haug, A. 1972. Production of carbohydrates by the marine Chaetoceros affinis var. O Willei (Gran.) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the cu1ture medium. J. exp mar. Biol. Ecol (9):125-136.

Navarro, R. M., Iriondo, A., Barrio, V. L, cambra, J. F., Arias, P.L., Guemez, M.B. Hydrogen production from glycerol over nickel catalysts supported on Al_2O_3 modified by Mg, Zr, Ce or La. Top Catal., v. 49, n. (1 - 2), p. 46 – 58, 2008.

Nele, Marcio; Lopez Moreno Esteban; Martins Carvalho, Heloysa. Cinética de redução do catalisador $CuO/ZnO/Al_2O_3$.Quím. Nova vol.30 no.8 São Paulo 2007.

Neto AMP, Sotana de Souza RA, Leon-Nino AD, da Costa JDA, Tiburcio RS, Nunes TA, et al. Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. Renewable Energy 2013;55:525–31.

Ono, Y. A survey of the mechanism in catalitic isomerization of alkanes. Catalysis Today, v. 81, p. 3 – 16, 2006.

Ohse S, Bianchini R, Avila R, Cunha P, Pavan C, Estevã M, Brantes L. Revisao: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de producao de lipidios pelas microalgas. Insula, Florianopolis 2007.

Ota, M., Kato, Y., Watanabe, H., Watanabe, M., Sato, Y., Smith, R.L., Inomata, H., 2009. "Fatty Acid Production Froma Highly CO_2 Tolerant Alga, Chlorocuccumlittorale,in the Presence of Inorganic Carbon and Nitrate." *Bioresour. Technol. 100, 5237–5242.*

PBL Netherlands Environmental Assessment Agency. 2011. "Long-Term Trend in Global CO2 Emissions, Report."

Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. 1993. "Microbiology: Concepts and Applications." *McGraw-Hill Companies; 6th Ed. New York.*

Perlingeiro G, Carlos Augusto. Biocombustíveis No Brasil: Fundamentos, Aplicações e Perspectivas. Synergia 241-247 (2014).

Peter J B, and Lieve M L Laurens. 2010. "Microalgae as Biodiesel & Biomass Feedstocks : Review & Analysis of the Biochemistry , Energetics & Economics †," no. i: 554–90. doi:10.1039/b924978h.

Prates, J. A diferença entre o H-Bio e o Biodiesel. Disponível em: http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/diferença-hbio-biodiesel-04-07-06.htm. Acesso em: Abril de 2016.

Pulz O, Gerbsch N, Buchholz R. 1995. "Light Energy Supplyin Plate-Type and Light Diffusing Optical Fiber Bioreactors." *Journal of Applied Phycology ;7:145–9*.

Rachlin JW, Grosso A. 1991. "The Effects of pH on the Growth of Chlorella Vulgaris and Its Interactions with Cadmium Toxicity." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20(4):505–8.

Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ Jr, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL et al. 2006. "The Path Forward for Biofuels and Biomaterials." *Science*, 311(5760):484–89.

Ramaraj, R. 2010. Freshwater microalgae growth and Carbon dioxide Sequestration.

Raven H, PeterH,Ray F, EichhornSE. 2010. "Biology of Plants." 7 thed. Ne: 124–27.

Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F. 2013. "Biodiesel from Microalgae: A Critical Evaluation from Laboratory to Large Scale Production." *Appl. Energy*, 103, 444–67.

Razzak, Shaikh A., Mohammad M. Hossain, Rahima A. Lucky, Amarjeet S. Bassi, and Hugo de Lasa. 2013. "Integrated CO_2 Capture, Wastewater Treatment and Biofuel Production by Microalgae culturing—A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27. Elsevier: 622–53. doi:10.1016/j.rser.2013.05.063.

Reaume, S. J.; Ellins, N. Synergistic effects of skeletal issomerization on oleic and palmitic acid mixtures for the reduction in cloud point of their methyl esters. Energy & Fuel, v.26, p. 4.514-4.520, 2012.

Report, Annual. 1987. "FY 1986 Aquatic Species Program."

Reviers, B. Biologia e filogenia das algas. Traducao: Iara Maria Franceschini. 280 p. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Richmond, A. "Mass Production of Microalgae: Photobioreactors." *Editor. Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell 2004;*, p. 273–80.

Ruiz, Ana. “Puesta En Marcha de Un Cultivo de Microalgas Para la Eliminación de Nutrientes de Un Agua Residual Urbana Previamente Tratada Anaeróbicamente.” Universidad Polictenica de Valencia. Barcelona.2011

Saber, M, Nakhshiniev B, Yoshikawa K. A review of production and upgrading of algal bio-oil. Renewable and Sustainable Energy Reviews 58 (2015)918–930.

Sandoval, I. Avaliação da produtividade de biomassa e do conteúdo de óleo da microalga *Desmodesmus* sp. em diferentes condiçoes de cultivo para aplicações industriais. Dissertação de Mestrado. UFRJ. Brasil, 2015.

Schenk, P. M, Thomas-Hall,S. S. R., Stephens, E., Marx, U. C, Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O. & Hankamer, B., 2008. Second Generation Biofuels:High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. Bioenergy. Res.1:20–43.

Scragg AH, Illman AM, Carden A, Shales SW (2002). 2002. “Growth of Microalgae with Increased Calorific Values in a Tubular Bioreactor. Biomass Bioenergy,” 23:67–73.

Shrivastav, Anupama, Sanjiv K Mishra, William I Suh, Wasif Farooq, Myounghoon Moon, Tae-hyoung Kim, Kanhaiya Kumar, Gang-guk Choi, Min S Park, and Ji-won Yang. 2015. “Characterization of Newly Isolated Oleaginous Microalga Monoraphidium sp . for Lipid Production under Different Conditions.” *ALGAL* 12. Elsevier B.V.: 289–94. doi:10.1016/j.algal.2015.08.015.

Silva, N. Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel. Tese de Doutorado Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – Brasil, 2014.

Schmid-Bondzynski-Ratzlaff. 2012. Extração e quantificação de lipídios em microalgas. Modificado pela Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Sistema de Estimativa de Emissões de Gases de Efeito Estufa -SEEG. Emisões Totais. Disponível em: <http://plataforma.seeg.eco.br/total_emission>. Acesso em: Dezembro 2015.

Sushil Adhikari, Sandun D. Fernando, Agus Haryanto**,** Hydrogen productionfrom glycerin by steam reforming over nickel catalysts**.** Renewable Energy 33, p. 1097–1100,2008.

Sushil Adhikari, Sandun D. Fernando, Agus Haryanto. Hydrogen productionfrom glycerol: An update Energy Conversion and Management 50, p. 2600–2604, 2009.

Tavares, V.R.L, M.L; Costa, S.I.G.L ; Medeiros, and C.R.O.L; Souto. 2015. “Analises de microscopia eletrônica e termogravimetria para acompanhamento da extracão de lipídios da *Monoraphidium* sp.”

Tolomini C. Avaliação dos efeitos da intensidade luminosa no crescimento e produção de lipídios por ankistrodesmus sp. (chlorophyceae) visando à produção de biodiesel. Pos-graduação em biotecnologia vegetal-UFRJ. P. 21, 2011.

Tuchman. 1996. “The Role of Heterotrophy in Algae. In: Stevenson, R.J., Bothwell, M., Lowe, R.L.” Algal Ecology. *Freshwater Benthic Ecosystems.*, p. 299–319.

Ugwu C.U, Aoyagi H, Uchiyama H. 2008. “Photobioreactors for Mass Cultivation of Algae.” *Bioresource Technology ;99(10):4021–8.*

Venderbosch R.H., W. Prins, Biofuels Bioprod. Biorefin. 4 (2010) 178–208.

Vieira V.C. "Produção de biodiesel e de coprodutos a partir de microalgas comerciais: abordagem de biorrefinaria". Dissertação de Doutorado. UFRJ, 2015.

Wang, Bei, Yanqun Li, Nan Wu, and Christopher Q Lan. 2008. “CO_2 Bio-Mitigation Using Microalgae,” 707–18. doi:10.1007/s00253-008-1518-y.

Williams P.J.LeB, Thomas, D.N., Reynolds, C.S. (2002) Phytoplankton productivity: carbon assimilation in marine and freshwater ecology. Wiley-Blackwell, Oxford.

Wildschut, J. Pyrolysis oil upgrading to transportation fuels by catalytic hydrotreatment, Ph.D. thesis, Rijksuniversiteit Groningen, 2009.

Wu LF, Chen PC, Lee CM. 2013. “The Effects of Nitrogen Sources and Temperature on Cell Growth and Lipid Accumulation of Microalgae.” *Int Biodeterior Biodegrad 2013;85:506–10*.

Yang, H., Xu, Z., Fan, M., Gupta, R., Slimane, R.B., Bland, A.E., Wright, I. 2010. “Progress in Carbon Dioxide Separation and Capture: A Review.” *Environ. Sci. 20, 14e27*.

Yoo, C., Jun, S.Y. and Lee, J.Y. 2010. Selection of Microalgae for Lipid Production under High Levels Carbon Dioxide. Bioresource Technology, 101, S71-S74. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.030.

Yun. 1997. “Journal of Chemical Technology and Biotechnology.”

Yu, Xuya, Peng Zhao, Cian He, Junjun Li, Xianhua Tang, Junpei Zhou, and Zunxi Huang. 2012. “Bioresource Technology Isolation of a Novel Strain of *M*onoraphidium sp and Characterization of Its Potential Application as Biodiesel Feedstock.” *Bioresource Technology* 121. Elsevier Ltd: 256–62. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.002.

Anexo 01

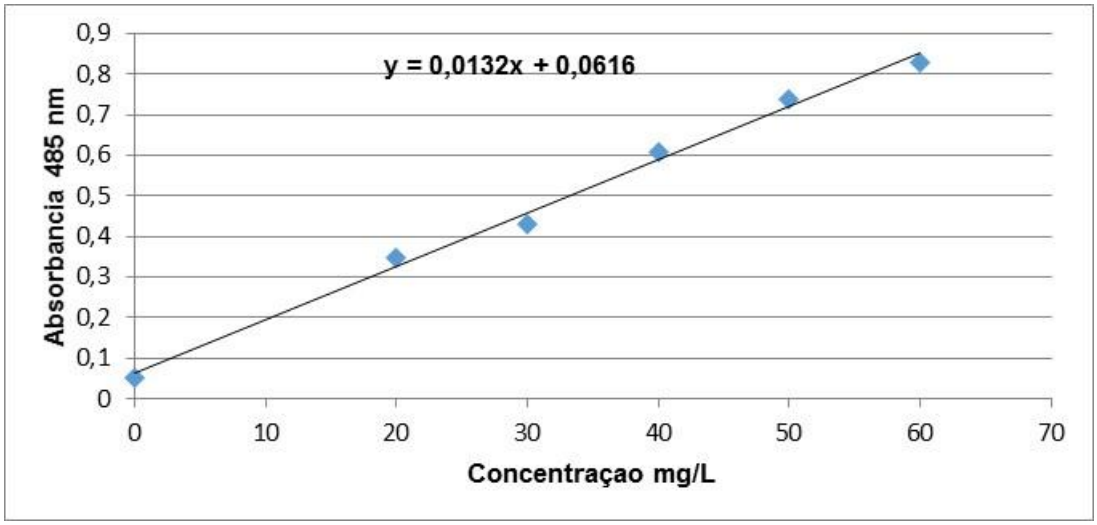


Figura A1. Curva de calibração da glicose para obtenção de carboidratos.

Anexo 02

Tabela A1. Resultados do cromatograma da fração orgânica obtida do processamento do bio-óleo à temperatura de 350 ºC

Tempo de retenção (min)	Composto químico	Área %		Tempo de retenção (min)	Composto químico	Área %
2.330		0,0759		10.087		0,0468
2.405		0,0160		10.163		0,0219
2.531		0,0877		10.458		0,0447
2.632		0,0691		11.151		0,0580
2.849		0,1700		11.324		0,1841
2.935		0,2207		11.473		0,0683
3.156		0,2667		11.573		0,0373
3.323		0,0793		11.818		0,5481
3.435		0,3433		12.023	n-dodecano	0,3338
3.606		0,0488		12.171	n-dodecano	0,0235
3.884		0,0800		12.255		0,0462
4.102		0,0534		12.464		0,0674
4.373		0,0373		12.679		0,2259
4.431	Tolueno	0,0366		13.042		0,1341
4.634		0,2776		13.425		0,7092
4.774		0,2949		13.611		0,1392
5.148		0,1063		13.799		0,1195
5.361		0,0321		14.061		0,1625
5.690		0,4954		14.273		0,0420
5.992		0,2273		14.514		0,5423
6.384		0,2447		14.668		0,1178
6.572		0,0590		14.831		0,1998
6.729		0,0909		15.083		0,0467
6.804		0,0720		15.195		0,0910
6.958		0,0255		15.324		0,1884
7.086		0,0621		15.529		0,0422
7.258		0,1848		15.679		0,2700
7.563	Xileno	0,4760		15.848		0,0535
7.769		0,4754		15.914		0,0529
7.981		0,0355		16.187		0,1314
8.073		0,0208		16.412		0,8480
8.230		0,2855		16.748		0,1543
8.623		0,0244		16.926		0,1727
8.956		0,1035		17.166		0,1491
9.114		0,6326		17.344		0,1000
9.463		0,0831		17.523		0,3811
9.807		0,2418		17.714		0,0235

17.840		0,5502		27.522		0,8598
18.003		0,2005		27.772		0,2244
18.128		0,6365		28.146		0,0617
18.315		0,4164		28.383		0,1461
18.494		0,2585		28.522		0,1607
18.809		0,0804		28.680		0,1389
19.073		0,1186		28.940		0,0809
19.189		0,1440		28.828		0,0751
19.320		0,0736		29.157		0,0280
19.497		0,5015		29.304		0,1537
19.750		0,4106		29.489		0,0328
19.497		0,5015		29.610		0,1433
19.750		0,4106		29.869		0,1359
19.988		0,0335		30.055		0,1569
20.094		0,1133		30.250		0,5757
20.245		0,1227		30.459	n-hexadecano	0,2346
20.461		0,6776		30.767	n-hexadecano	0,0663
20.753		0,0448		30.949	n-hexadecano	0,2869
20.910		0,0831		31.125		0,0228
21.137		0,8675		31.217		0,0621
21.415	n-tetradecano	0,1916		31.421		0,0793
21.613	n-tetradecano	0,2559		31.649		0,5339
21.873		0,0871		31.960		1,1931
22.088		0,2422		32.189		0,0868
22.350		0,1954		32.326		0,0537
22.899		1,2138		32.475		0,2432
23.251		0,2327		32.750		0,1023
23.391		0,7353		32.913		0,1955
23.670		0,1457		33.203		0,0891
23.889		0,0814		33.388		0,0533
24.060		0,1076		33.727		0,8006
24.213		0,2334		33.851		0,1885
24.522		0,0988		34.061		0,0419
24.701		0,0687		34.562		2,9153
24.944		0,4065		34.947		0,1145
25.167		0,1920		35.143		0,4652
25.364		0,0845		35.409		0,1769
25.800		1,2340		35.604		0,0299
26.152		0,1621		36.021		0,4279
26.372		0,0332		36.174		0,0678
26.479		0,0648		36.437		0,1816
26.622		0,0528		36.621		0,8668
26.818		0,1631		36.867		0,0569
26.960		0,0546		36.946		0,0236
27.217		0,2511		37.071		0,1265

37.201		0,5937		44.887		0,4734
37.517		1,0334		45.108	docosano	0,1689
37.713	n-octadecano	0,9945		45.220	docosano	0,5576
37.963	n-octadecano	0,4362		45.332	docosano	0,1039
39.167	1-octadeceno	5,0928		38.138	n-octadecano	0,0971
39.448	1-octadeceno	7,8065		38.413	n-octadecano	0,1024
39.629		0,0900		38.690	1-octadeceno	1,4753
39.778		0,1415		38.936	1-octadeceno	8,3219
39.891		0,0929		45.513	docosano	0,5977
40.061		0,4551		45.726	docosano	0,0761
40.241		0,3652		45.812	docosano	0,0399
40.311		0,1285		45.921		0,1216
40.421		0,1044		46.033		1,0426
40.591		1,4437		46.130		0,4967
40.753		0,3475		46.185		0,3566
40.897		0,2777		46.312		0,0834
41.006		0,0712		46.361		0,0861
41.085		0,2118		46.487		0,1019
41.149		0,2059		46.575		0,5927
41.309		0,0943		46.792		0,2388
41.488		1,0239		46.898		0,5393
41.698		0,7714		46.989		0,0610
41.822		0,1079		47.144	tetracosano	0,1780
41.893		0,2106		47.235	tetracosano	0,1058
41.989	eicosano	1,3699		47.401	tetracosano	0,4754
42.213	eicosano	0,1370		47.486	tetracosano	0,2027
42.309	eicosano	0,0720		47.553	tetracosano	0,1647
42.498	eicosano	0,1947		47.636	tetracosano	0,2985
42.624	eicosano	0,2574		47.752	tetracosano	0,0502
42.800	eicosano	0,2128		47.912	tetracosano	0,2127
42.914		0,1686		47.981	tetracosano	0,2496
43.132		0,1741		48.114		0,1390
43.268		0,0665		48.236		0,1658
43.412		0,1630		48.401		0,2557
43.471		0,3521		48.560		1,2640
43.557		0,0541		48.668		0,1116
43.707		0,0453		48.764		0,1242
43.837		0,0216		48.831		0,2421
43.971		0,2430		48.970		3,3091
44.149		0,2015		49.121	etoestearilico	0,8185
44.256		0,0298		49.195	cetoestearilico	0,3992
44.388		0,1373		49.361	cetoestearilico	0,4418
44.574		0,0662		49.510	cetoestearilico	0,4902
44.646		0,0260		49.628	cetoestearilico	0,3316
44.724		0,1728		49.735		0,1835

49.881		0,1695		55.856	oléico	0,1777
49.987		0,1560		56.081		0,0284
50.056		0,1300		56.178		0,0489
50.214		0,4651		**Total**		**100,00**
50.402		0,1288				
50.678		0,2563				
50.842		0,0522				
50.921	palmítico	0,0598				
51.077	palmítico	1,2601				
51.180	palmítico	0,1636				
51.335	palmítico	0,0539				
51.538	palmítico	0,6944				
51.623	palmítico	0,0253				
51.758	palmítico	0,6684				
51.836	palmítico	0,3521				
51.995		0,0359				
52.080		0,2745				
52.276	heptadecanóico	0,3544				
52.396	heptadecanóico	0,1577				
52.472	heptadecanóico	0,0772				
52.619	heptadecanóico	0,3077				
52.707	heptadecanóico	0,4448				
52.810	heptadecanóico	0,3682				
52.960	heptadecanóico	0,2419				
53.044	heptadecanóico	0,1257				
53.135	heptadecanóico	0,2084				
53.282	heptadecanóico	0,2307				
53.458		0,3332				
53.603		0,1320				
53.701		0,2162				
53.788		0,0231				
53.893		0,2740				
54.044	esteárico	0,1389				
54.231	esteárico	0,0737				
54.352	esteárico	0,2237				
54.461	esteárico	0,1186				
54.576	esteárico	0,1183				
54.705	esteárico	0,1374				
54.773	esteárico	0,1196				
55.025	oléico	0,2272				
55.212	oléico	0,0619				
55.269	oléico	0,0671				
55.389	oléico	0,0618				
55.571	oléico	0,1046				
55.673	oléico	0,0357				

Anexo 03

Tabela A2. Resultados do cromatograma da fração orgânica obtida do processamento do bio-óleo à temperatura de 300 ºC

Tempo de retenção (min)	Composto químico	Área %		Tempo de retenção (min)	Composto químico	Área %
2.330		0,0625		10.087		0,0385
2.405		0,0132		10.163		0,0180
2.531		0,0722		10.458		0,0368
2.632		0,0569		10.598		0,1267
2.849		0,1400		11.075		0,0416
2.935		0,1817		11.151		0,0478
3.156		0,2196		11.324		0,1515
3.323		0,0653		11.473		0,0562
3.435		0,2827		11.573		0,0307
3.606		0,0402		11.818		0,4512
3.884		0,0659		12.023	n-dodecano	0,2748
4.102		0,0440		12.171	n-dodecano	0,0194
4.373		0,0307		12.255		0,0381
4.431	Tolueno	0,0301		12.464		0,0555
4.634		0,2285		12.679		0,186
4.774		0,2428		13.042		0,1104
5.148		0,0875		13.425		0,5839
5.361		0,0264		13.611		0,1146
5.690		0,4078		13.799		0,0984
5.992		0,1871		14.061		0,1338
6.384		0,2014		14.273		0,0346
6.572		0,0486		14.514		0,4465
6.729		0,0748		14.668		0,0970
6.804		0,0592		14.831		0,1645
6.958		0,021		15.083		0,0384
7.086		0,0511		15.195		0,0749
7.258		0,1521		15.324		0,1551
7.563	Xileno	0,3919		15.529		0,0347
7.769		0,3914		15.679		0,2223
7.981		0,0292		15.848		0,0441
8.073		0,0171		15.914		0,0435
8.230		0,2351		16.187		0,1082
8.623		0,0201		16.412		0,6982
8.956		0,0852		16.748		0,1271
9.114		0,5208		16.926		0,1422
9.463		0,0684		17.166		0,1227
9.807		0,1991		17.344		0,0823

17.523		0,3137		27.522		0,7079
17.714		0,0194		27.772		0,1847
17.840		0,4530		28.146		0,0508
18.003		0,1651		28.383		0,1203
18.128		0,5240		28.522		0,1323
18.315		0,3428		28.680		0,1144
18.494		0,2128		28.828		0,0618
18.809		0,0662		28.940		0,0666
19.073		0,0977		29.157		0,0230
19.189		0,1186		29.304		0,1265
19.320		0,0606		29.489		0,0270
19.497		0,4129		29.610		0,1180
19.750		0,3381		29.869		0,1119
19.988		0,0276		30.055		0,1291
20.094		0,0933		30.250		0,4740
20.245		0,1010		30.459	n-hexadecano	0,1931
20.461		0,5579		30.767	n-hexadecano	0,0546
20.753		0,0369		30.949	n-hexadecano	0,2362
20.910		0,0684		31.125		0,0188
21.137		0,7142		31.217		0,0511
21.415	n-tetradecano	0,1578		31.421		0,0653
21.613	n-tetradecano	0,2107		31.649		0,4396
21.873		0,0717		31.960		0,9823
22.088		0,1994		32.189		0,0715
22.350		0,1609		32.326		0,0442
22.899		0,9993		32.475		0,2003
23.251		0,1916		32.750		0,0842
23.391		0,6054		32.913		0,1609
23.670		0,1199		33.203		0,0733
23.889		0,0671		33.388		0,0439
24.060		0,0885		33.727		0,6591
24.213		0,1922		33.851		0,1552
24.522		0,0814		34.061		0,0345
24.701		0,0565		34.562		2,4002
24.944		0,3347		34.947		0,0942
25.167		0,1581		35.143		0,3830
25.364		0,0696		35.409		0,1456
25.800		1,0159		35.604		0,0247
26.152		0,1334		36.021		0,3523
26.372		0,0273		36.174		0,0558
26.479		0,0534		36.437		0,1495
26.622		0,0435		36.621		0,7137
26.818		0,1343		36.867		0,0469
26.960		0,045		36.946		0,0194
27.217		0,2067		37.071		0,1042

37.201		0,4888		44.388		0,1712
37.517		0,8508		44.574		0,1000
37.713	n-octadecano	0,8188		44.646		0,0363
37.963	n-octadecano	0,3591		44.724		0,1773
38.138	n-octadecano	0,0800		44.887		0,4599
38.413	n-octadecano	0,0843		45.108	docosano	0,1793
38.690	1-octadeceno	1,2146		45.220	docosano	0,4992
38.936	1-octadeceno	6,8516		45.332	docosano	0,1131
39.167	1-octadeceno	4,1930		45.513	docosano	0,5630
39.448	1-octadeceno	6,4273		45.726	docosano	0,1047
39.629		0,0741		45.812	docosano	0,0561
39.778		0,1165		45.921		0,1477
39.891		0,0765		46.033		0,9096
40.061		0,3747		46.130		0,4410
40.241		0,3007		46.185		0,3354
40.311		0,1058		46.312		0,1058
40.421		0,0860		46.361		0,1141
40.591		1,1886		46.487		0,1336
40.753		0,2861		46.575		0,5655
40.897		0,2286		46.792		0,2981
41.006		0,0586		46.898		0,5176
41.085		0,1744		46.989		0,1001
41.149		0,1695		47.144	tetracosano	0,2475
41.309		0,0776		47.235	tetracosano	0,1477
41.488		0,8430		47.401	tetracosano	0,5077
41.698		0,6351		47.486	tetracosano	0,2221
41.822		0,0889		47.553	tetracosano	0,1885
41.893		0,1734		47.636	tetracosano	0,3475
41.989	eicosano	1,1279		47.752	tetracosano	0,1012
42.213	eicosano	0,1128		47.912	tetracosano	0,2908
42.309	eicosano	0,0593		47.981	tetracosano	0,2931
42.498	eicosano	0,1603		48.114		0,2295
42.624	eicosano	0,2119		48.236		0,2684
42.800	eicosano	0,1752		48.401		0,3472
42.914		0,1388		48.560		1,2050
43.132		0,1433		48.668		0,1823
43.268		0,0829		48.764		0,1860
43.412		0,1831		48.831		0,3028
43.471		0,3330		48.970		2,9628
43.557		0,0957		49.121		1,8104
43.707		0,0842		49.195		0,5042
43.837		0,0661		49.361		0,5553
43.971		0,2734		49.510		0,6344
44.149		0,2121		49.628		0,4698
44.256		0,0536		49.735		0,3241

49.881		0,3851		55.673	oléico	0,0696
49.987		0,2896		55.856	oléico	0,2603
50.056		0,2551		56.081		0,0627
50.214		0,7920		56.178		0,1310
50.402		0,4414		**Total**		**100,00**
50.678		0,9749				
50.842		0,4163				
50.921	palmítico	0,4781				
51.077	palmítico	1,3102				
51.180	palmítico	0,5725				
51.335	palmítico	0,9422				
51.538	palmítico	1,1315				
51.623	palmítico	0,1252				
51.758	palmítico	0,9365				
51.836	palmítico	0,5110				
51.995		1,3927				
52.080		0,5076				
52.276	Heptadecanóico	0,6546				
52.396	Heptadecanóico	0,3445				
52.472	Heptadecanóico	0,1878				
52.619	Heptadecanóico	0,5330				
52.707	Heptadecanóico	0,5738				
52.810	Heptadecanóico	0,5307				
52.960	Heptadecanóico	0,4358				
53.044	Heptadecanóico	0,2267				
53.135	Heptadecanóico	0,3713				
53.282	Heptadecanóico	0,4280				
53.458		0,5868				
53.603		0,2605				
53.701		0,3506				
53.788		0,0706				
53.893		0,4609				
54.044	esteárico	0,3224				
54.231	esteárico	0,1860				
54.352	esteárico	0,3637				
54.461	esteárico	0,2035				
54.576	esteárico	0,2023				
54.705	esteárico	0,2080				
54.773	esteárico	0,1996				
55.025	oléico	0,4081				
55.212	oléico	0,1190				
55.269	oléico	0,1192				
55.389	oléico	0,1244				
55.571	oléico	0,1891				