

# REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

## ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROALGAS DE ÁGUA DOCE COMO FONTE POTENCIAL PARA A EXTRAÇÃO DE ÓLEO<sup>1</sup>

EVANDRO A. TAVARES<sup>2</sup>, GILSON R. FORTUNATO<sup>3</sup>, DOUGLAS J. M. S. PALMAS<sup>4</sup>,  
FERNANDA C. HUMANN<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Apresentado no 7º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP: 29 de novembro a 02 de dezembro de 2016 - Matão-SP, Brasil

<sup>2</sup>Evandro Augusto Tavares, Graduando em Tecnologia em Biocombustíveis, Bolsista PIBIT, CNPq, IFSP Câmpus Matão, eatavares1@gmail.com

<sup>3</sup>Gilson Roberto Fortunato, Graduando em Tecnologia em Biocombustíveis, IFSP Câmpus Matão

<sup>4</sup>Douglas Jorge Scarme Palmas, Graduando em Tecnologia em Biocombustíveis, IFSP Câmpus Matão

<sup>5</sup>Fernanda Carvalho Humann, Professora EBTT, IFSP Câmpus Matão

**RESUMO:** A limitação das reservas de petróleo e seu uso e de seus derivados tem causado grandes preocupações no cenário econômico, social e ambiental. Fontes de energia renováveis, como biocombustíveis, tem sido vistas como uma ótima alternativa sustentável. O biodiesel é um biocombustível que tem ganhado grande atenção, sendo produzido no Brasil a partir de diferentes espécies oleaginosas como mamona, canola, girassol, o amendoim e principalmente a soja. Entretanto, há várias limitações concernentes ao plantio e utilização dessas plantas. Uma promissora opção à essas oleaginosas são as microalgas, pois apresentam baixos custos de colheita e transporte, menor gasto de água e área de implantação menor comparado aos cultivos de plantas, além de poder ser realizado em condições não adequadas para a produção de outras culturas. Além do biodiesel, o óleo extraído das microalgas tem outros potenciais, entre eles a indústria farmacêutica, cosméticos, suplementos alimentares,

entre outros. No presente projeto, amostras de microalgas de água doce do lago do centro de Matão-SP foram crescidas em meios de cultura com condições que estimularam o seu crescimento, isoladas e identificadas, e seu óleo foi caracterizado como fonte em potencial para futura produção de biodiesel.

**PALAVRAS-CHAVE:** biodiesel; microalgas; óleo; energia renováveis; sustentabilidade

### **FRESH WATER MICROALGAE ISOLATION, CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION AS A POTENTIAL SOURCE TO OIL EXTRACTION**

**ABSTRACT:** The limitations of oil reserves and oil and oil derivatives usages concerns the world in ambiental, social and economical situation. Renewable energy sources, like biofuels, has been seen as a great sustainable alternative. Biodiesel has gained attention. It is produced in Brazil through the use of different oilseed plant species like castor bean, canola, sunflower, peanut and specially soy bean. However, there are limitations concerning to the plant crop and usage. Microalgae is a promising option compared to these oilseed plants, because their low cost crop and transport, lower water consumption, implantation area smaller related to others plant cultures. Besides biodiesel. The oil extracted from microalgae, has many potentials, among them their use in farmaceutical, cosmetic, food supplements industries, and others. In this project, fresh water microalgae probes captured in the central lake of Matão-SP were grown in culture media with growing stimulus conditions, isolated and identified, and its oils were characterized as a potencial source to biodiesel future production.

**KEYWORDS:** biodiesel; microalgae; oil; renewable energy; sustainability

### **INTRODUÇÃO**

Fontes de energias renováveis tem sido exploradas cada vez mais, e entre os biocombustíveis mais utilizados, o biodiesel, o qual pode ser extraído das mais diversas fontes renováveis, como diversas plantas oleaginosas e microalgas. As microalgas são grupo muito diverso de microrganismos, adaptados a uma grande diversidade de habitats. Muitas espécies de microalgas tem capacidade de produção de uma grande quantidade de triacilgliceróis (20-50% do peso seco) (Mutanda et al. 2011). Segundo Larkum e colaboradores (2012), microalgas tem vantagens significativas sobre plantas de terra para utilização e manutenção entre eles, ciclo de vida de horas ou dias ao invés de ciclos sazonais, uma vasta natureza

unicelular, fazendo com que prontamente caibam em sistemas de manutenção miniaturizados, reduzindo o custo; reprodução sexuada ou assexuada, entre outros. Além disso, as microalgas apresentam custos relativamente baixos de colheita e transporte, o cultivo tem menor gasto de água e a área necessária é menor se comparado aos cultivos de plantas, pode ser realizado em condições não adequadas aos cultivos tradicionais e podem ser utilizadas águas residuais, salobras e salgadas (Jiang et al. 2011, Chen et al. 2012, Georgianna e Mayfield 2012). As microalgas também tem a vantagem da rápida captação de nutrientes, possibilidade de cultivo durante todo o ano, alta eficiência fotossintética e capacidade de metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. (Chen et al. 2012). Sendo assim, o projeto desenvolvido teve como objetivo coletar amostras, expor e avaliar diferentes condições de cultivo, isolar, identificar, e caracterizar o óleo das espécies coletadas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 1.1 - Coleta de amostras:

As amostras foram coletadas de um lago localizado no centro da cidade de Matão-SP. Um recipiente de plástico com volume de 2 litros foi submerso, e assim que metade de seu volume fosse preenchido, recolhido.

### 1.2- Meios de cultura:

As Microalgas coletadas foram inoculadas inicialmente em Meio Básico Bold (MBB) Bischoff & Bold (1963).

### 1.3- Cuidados e desinfecção de outros microrganismos:

Os meios e materiais usados durante o procedimento passaram pelo processo de desinfecção conhecido como método de calor úmido usando o auxílio de uma autoclave (Lourenço, S.,2006). No processo de autoclavagem, meios e materiais foram submetidos a temperatura de 121° durante 15 minutos em pressão de 1,5 atm. Após a autoclave, os materiais foram submetidos a 30 minutos em uma capela de fluxo laminar com radiação ultravioleta (UV-C).

### 1.4- – Inoculação:

Após a desinfecção de todos os materiais, inoculou-se 1 ml de amostra de microalgas em cada erlenmeyer e cada um deles foi introduzido em um sistema fechado com aeração (bomba de oxigênio), fotoperíodo de 16h de luz e 8 sem luz, com temperatura controlada de 27°C.



Figura 1. Sistema de crescimento utilizado para crescimento e replicação das culturas.

#### 1.5 - Crescimento:

Utilizou-se três diferentes métodos para o crescimento das culturas: método líquido/líquido; método líquido/sólido e método sólido/sólido (figura 1).

Foi utilizado o espectrofotômetro, 620nm, medindo o crescimento das primeiras gerações, e de gerações de culturas já isoladas e adaptadas ao meios.

#### 1.6-Isolamento:

Foi utilizada no processo de isolamento, a técnica de diluição em série, em culturas líquidas e sólidas.

#### 1.7 - Identificação e caracterização das espécies:

As espécies isoladas passaram por análise em microscópios ópticos, (aprox. 100x), do campus do IFSP – Matão, e enfim identificadas com o auxílio da Profa. Dra. Fernanda Humann, e pela obra Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras (SANT'ANNA, C.L; et al 2012.)

#### 1.8 - Otimização dos Meios:

Após o isolamento de algumas culturas, percebeu-se que o Meio Básico Bold (MBB) favorecia mais algumas espécies, o que dificultava o crescimento e isolamento das outras. Foram testados outros 6 meios diferentes: AF6 (Kato, 1982); BG11 (Stainer, et al 1971); CHU10 (Chu 1942); VS (Gargiulo et al. 2001) ; ASM1 (Gorham et al. 1964; e Zagatto & Aragão 1992).

#### 1.9 - Extração de óleo:

Cada cultura foi separada do meio por centrifugação a 7000rpm, 10 min, após o término do processo as biomassas passaram por secagem em estufa por 12 horas, a temperatura de 60°C. A técnica de ultrassom foi utilizada para a extração de óleo de microalgas, com o auxílio do aparelho de ultrassom foram adicionadas as respectivas biomassas das espécies analisadas já secas da estufa, com 50ml de solvente (hexano) e submetido a 2h de ultrassom.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

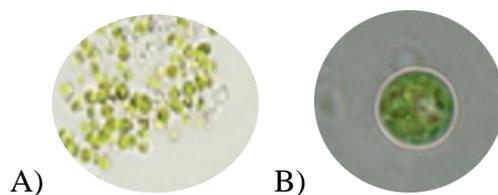
Os sistemas utilizados para o crescimento das culturas são viáveis e eficazes, porém cada um tem pontos negativos e positivos (tabela 1), e devem ser utilizados conforme a necessidade do pesquisador. A tabela a seguir mostra pontos positivos e negativos de cada um dos métodos (sólido/ líquido), em fatores importantes da pesquisa, ambos em B.O.D com fotoperíodo de 16 horas com luz e 8 horas sem luz, em temperatura constante de 27°C:

TABELA1. – Comparação dos métodos de crescimento abordados no projeto.

FATORES INFLUENTES NA PESQUISA:	MEIO LIQUÍDO	MEIO SÓLIDO
Menor quantidade utilizada de meio	X	✓
Menor tempo para crescimento das culturas	X	✓
Maior resistência a contaminações	✓	X
Maior tempo de vida útil das culturas	✓	X
Menor utilização de recursos de infraestrutura	X	✓
Facilidade para análises em microscópio	✓	X
Utilização em extração e caracterização de óleo	✓	X

Ao longo do projeto, usando os métodos de isolamento apresentados, apenas dois dos tipos de espécies se sobressaíram usando o Meio Básico Bold (BBM): *Chlorella* e *Clamydomonas* (figura 2).

Figura 2. Fotos das espécies isoladas no projeto utilizando BBM. a)Chlorella spp, b)Clamydomonas.



Sete meios foram utilizados para teste de crescimento para microalgas, o meio ASM1 (Gorham et al.1964 e Zagatto & Aragão 1992) apresentou resultados satisfatórios para as espécies Scenedesmus e Desmosdesmus, as quais apresentaram crescimento muito maior que as outras. Após o processo de isolamento semelhante ao anterior, obtivemos êxito no isolamento da cultura de *Desmosdesmus communis* (figura 3).

Antes e após a extração de óleo das microalgas, foi realizada a pesagem da biomassa seca para a análise do rendimento do método (tabela 2). Após análise de rendimento, notou-se que outros métodos podem se mostrar mais eficazes na extração de óleo, pois está abaixo do esperado. São necessárias novas pesquisas sobre esses métodos e seus rendimentos.

Figura 3- Imagem da amostra isolada de *D. communis*.



Tabela 2. Análise do rendimento do óleo das microalgas: a) *Chlamydomonas sp.* B) *Chlorella sp.*

A)

EXTRAÇÃO DE ÓLEO UTILIZANDO UTRASSOM DA ESPÉCIE <i>Chlamydomonas sp</i>	
<b>PESO SECO SEM EXTRAÇÃO (g) :</b>	<b>4,0084</b>
<b>PESO FINAL (g) :</b>	<b>3,6329</b>
<b>TOTAL DE ÓLEO RETIRADO(g/mL) :</b>	<b>0,3755</b>
<b>PORCENTAGEM DE ÓLEO RETIRADO:</b>	<b>9,36%</b>

B)

EXTRAÇÃO DE ÓLEO UTILIZANDO UTRASSOM DA ESPÉCIE <i>Chlorella sp.</i>	
<b>PESO SECO (g) :</b>	<b>4,6484</b>
<b>PESO FINAL (g) :</b>	<b>3,9976</b>
<b>TOTAL DE ÓLEO RETIRADO (g/mL):</b>	<b>0,6508</b>
<b>PORCENTAGEM DE ÓLEO RETIRADO:</b>	<b>14,18%</b>

### CONCLUSÕES:

Os resultados apresentados foram satisfatórios, além dos métodos e condições propostas para o cultivo, isolamento e crescimento das espécies, pode-se obter muitas outras informações como quais meios mais eficientes para cada uma das culturas isoladas, quais os métodos mais eficazes para crescimento rápido e isolamento, cuidados que devem ser tomados para evitar contaminação, entre outros, cujo não se encontra nenhum registro em livros e artigos sobre as microalgas de água doce. Além dos mesmo, as espécies encontradas e isoladas no lago de Matão-SP mostram-se uma fonte promissora de biodiesel, pelo percentual de óleo encontrado em suas células.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao IFSP Campus Matão pela estrutura de pesquisa, e ao apoio do CNPq PIBIT Evandro Augusto Tavares (156430/2015-0).

### REFERÊNCIAS

Chen R, Li R, Deitz L, Liu Y, Stevenson RJ, Liao W. (2012) Fresh water algal cultivation with animal waste for nutrient removal and biomass production. *Biomass and Bioenergy*, 39: 128-138.

Georgianna R, Mayfield SP (2012) Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*, 488: 329-335.

Jiang L, Luo S, Fan X, Yang Z, Guo R. (2011) Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal waste water and high concentration of CO<sub>2</sub>. *Applied Energy*, 88: 3336–3341.

Larkum AWD, Ross IL, Kruse O, Hankamer B (2012) Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 30 (4): 198-205.

Larkum AWD (2010) Limitations and prospects of natural photosynthesis for bioenergy production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 271–276

Lourenço, S. O. Cultivo de Microalgas marinhas – princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. 606p. il.

Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, Kumari S, Anandraj A, Bux F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology* 2011.

Sant’Anna, C.L.; Tucci, A.; Azevedo, M.T.P.; Melcher, S.S.; Werner, V.R.; Malone, C.F.S.; Rossini, E.F.; Jacinavicius, F.R.; Hentschke, G.S.; Osti, J.A.S.; Santos, K.R.S.; Gama-Júnior, W.A.; Rosal, C. & Adame, G. Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. Instituto de botânica – São Paulo, 2012 Publicação online.

Sipaúba-Tavares, L.H; Rocha, O. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos. São Carlos: RiMa, 2003.