

**DILSON NOVAIS ROCHA**

**RECUPERAÇÃO DE RECURSOS E RACIONALIZAÇÃO DE ENERGIA DO  
PROCESSAMENTO DE *Scenedesmus obliquus* BR003 PARA PRODUÇÃO DE  
COMBUSTÍVEIS E ALIMENTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Marcio Arêdes Martins  
Coorientadores: Alisson Carraro Borges  
André Pereira Rosa

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R672r  
2023

Rocha, Dilson Novais, 1981-

Recuperação de recursos e racionalização de energia do processamento de *Scenedesmus obliquus* BR003 para produção de combustíveis e alimentos / Dilson Novais Rocha. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (177 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Márcio Arêdes Martins.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Agrícola, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.227>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Alimentos - Biotecnologia. 2. Algas como alimento. 3. Combustíveis. 4. Biomassa. 5. Digestão anaeróbia. I. Martins, Márcio Arêdes, 1972-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Agrícola. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 664.022

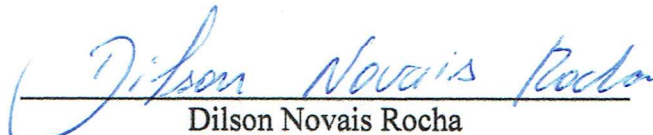
**DILSON NOVAIS ROCHA**

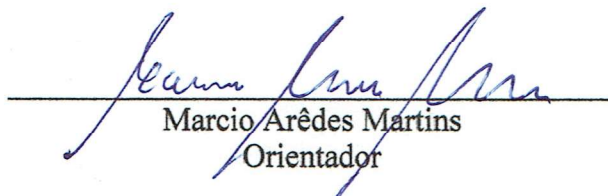
**RECUPERAÇÃO DE RECURSOS E AUMENTO DA EFICIÊNCIA ENERGÉTICA  
DO PROCESSAMENTO DE *Scenedesmus obliquus* BR003 PARA PRODUÇÃO DE  
COMBUSTÍVEIS E ALIMENTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 02 de março de 2023.

Assentimento:

  
Dilson Novais Rocha  
Autor

  
Marcio Arêdes Martins  
Orientador

A minha **mãe** Eponina (Nena) e ao meu **pai** Nilson (Son) pelo exemplo de vida. As minhas **irmãs** Darlene, Darleide, Conceição e Carol, pelo incentivo. Aos meus **sobrinhos** Daniel, Arnaldo, Benícia, Heitor, Carla e Arthur, pelo carinho. Ao meu **filho** Gabriel, anjo que ilumina o caminho. A minha **querida** Ana Paula, pelo Amor.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A pesquisa acadêmica é um trabalho de teimosia e persistência, e por muitas vezes uma atividade solitária, mas o êxito do trabalho só é possível quando há uma rede de apoio.

Por ter chegado até aqui, preciso agradecer a todos (as) que formaram essa rede de apoio:

A minha família e amigos pelo incentivo e apoio.

A Ana Paula e Gabriel pela compreensão, companheirismo e Amor.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola pela oportunidade de realizar o doutoramento com excelência.

A todos os colegas Técnico-administrativos e Docentes do Departamento de Engenharia Agrícola, pelo incentivo.

À Prof<sup>a</sup> Catariny Aleman, Chefe do Departamento de Engenharia Agrícola, e aos Professores da Área Técnica de Energia do DEA pela liberação para cursar o doutorado, e empenho na aprovação dos relatórios semestrais.

Especial agradecimento ao meu orientador e chefe imediato, Prof. Marcio Arêdes Martins, o principal responsável por ter chegado até aqui. A sua orientação, atenção, experiência, paciência, sabedoria e confiança foram essenciais para a conclusão da pesquisa.

Aos meus coorientadores Prof. André Pereira Rosa e Prof. Alisson Carraro Borges pela ajuda, sugestões e disponibilidade de uso do Laboratório da Qualidade Ambiental (LQA).

Aos amigos (as) do Laboratório da Qualidade Ambiental (LQA), Laboratório de Painéis e Energia da Madeira (LAPEM), Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) e Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental (LESA) pela ajuda.

Aos membros da banca examinadora Prof<sup>a</sup>. Jane Sélia dos Reis Coimbra, Prof. Alisson Carraro Borges, Prof<sup>a</sup> Natália dos Santos Renato e Prof. Evaldo Luiz Gaeta Espindola.

Ao CENPES/Petrobras, especialmente ao Dr. Leonardo Brantes Bacellar Mendes e Eng. Rafael Richard João pela troca de conhecimento na área de produção de microalgas.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Biocombustíveis por toda a ajuda concedida na execução deste trabalho, em especial ao Michael, Pedro e Javier.

Aos colegas Dr. Mauricio de Oliveira Leite e Elder Peixoto Xavier pelo incentivo e valiosas contribuições.

A todos os amigos que, de alguma forma contribuíram para este trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## **BIOGRAFIA**

DILSON NOVAIS ROCHA, filho de Nilson Rocha Silva e Eponina Novais Rocha, nasceu em 14 de junho de 1981, na cidade de Jussiape, Estado da Bahia.

Concluiu o ensino médio e técnico no Instituto Federal da Bahia, Campus de Vitória da Conquista, em dezembro de 2000.

Graduou-se em Agronomia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia em agosto de 2006.

Em 2013 foi admitido em concurso público, e desde então desenvolve suas atividades laborais no Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola da UFV, no cargo de Técnico em Agropecuária.

Em agosto de 2018 obteve o Título de Mestre em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa.

*“Não existe caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho”.*

(Mahatma Gandhi)

## RESUMO

ROCHA, Dilson Novais, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2023. **Recuperação de recursos e racionalização de energia do processamento de *Scenedesmus obliquus* BR003 para produção de combustíveis e alimentos.** Orientador: Marcio Arêdes Martins. Coorientadores: Alisson Carraro Borges e André Pereira Rosa.

A viabilidade de uso das microalgas como matéria prima para produção de alimentos e energia depende fortemente dos custos e eficiência energética dos processos utilizados na extração dos compostos de interesse. O objetivo deste trabalho foi avaliar os impactos do rompimento celular e da recuperação de energia pela digestão anaeróbia da biomassa residual, na melhoria da eficiência energética do processamento de *Scenedesmus obliquus* BR003. A cavitação hidrodinâmica (CH) apresenta-se como um método promissor para rompimento celular, devido ao baixo consumo de energia e facilidade de aumento de escala. Com a otimização dos parâmetros operacionais da CH foi possível obter rendimentos de 76,7%, 23,9% e 19,6% para extração de lipídios, proteínas e pigmentos, respectivamente, com o consumo de energia de 0,35MJ kg<sup>-1</sup> de microalga (base seca). O consumo de energia foi 5,5, 5,3 e 4,1 vezes menor quando comparado com o rompimento por ultrassom. A digestão anaeróbia da biomassa residual permitiu um incremento de 67,5% de recuperação de energia da biomassa residual após a extração de lipídios, com uso da CH para rompimento celular. Essa rota apresentou uma razão de energia líquida (REL) positiva, indicando que o uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento da biomassa de *S. obliquus* é energeticamente sustentável. Já as rotas que consideraram a extração de proteínas resultaram em menores eficiências energéticas. Contudo a microalga *S. obliquus* possui elevados teores de proteínas, que podem ser utilizadas para rações e alimentos, e o maior valor deste composto compensa a reduzida eficiência energética do processo. A toxicidade dos solventes na biomassa residual também foi avaliada. Na mistura dos solventes hexano e etanol, o hexano não apresentou efeito significativo, no entanto a concentração efetiva a 50% (CE<sub>50</sub>) do etanol foi 3,78, 26,97 e 4,97 g L<sup>-1</sup>, enquanto a CE<sub>50</sub> do acetato de etila foi 18,74, 18,02 e 5,85 g L<sup>-1</sup> para arqueias metanogênicas, *S. obliquus* e sementes de alface, respectivamente. Por se tratar de um solvente verde com baixa toxicidade, o uso do acetato de etila para extração dos lipídios, permite o uso da biomassa residual para recuperação de recursos e energia.

Palavras-chave: *Tetrademus obliquus*. Cavitação hidrodinâmica. Razão de energia líquida (REL). Digestão anaeróbia. CE<sub>50</sub>. Balanço de energia.

## ABSTRACT

ROCHA, Dilson Novais, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2023. **Resource recovery and energy rationalization from processing *Scenedesmus obliquus* BR003 for fuel and food production.** Adviser: Marcio Arêdes Martins. Co-advisers: Alisson Carraro Borges and André Pereira Rosa.

Feasibility of using microalgae as feedstock for food and energy production depends on costs and energy efficiency of processes used in compound extraction. This study evaluated impacts of cell disruption and energy recovery by anaerobic digestion of residual biomass to improve energy efficiency in processing of *Scenedesmus obliquus* BR003. Hydrodynamic cavitation (HC) presents as promising method for cell disruption, due to low energy consumption and facility of scale-up. With optimization of HC operational parameters, it was obtained yields of 76.7%, 23.9% and 19.6% for lipid, protein and pigment extraction, respectively, with energy consumption of 0.35MJ kg<sup>-1</sup>. Energy consumption was 5.5, 5.3, and 4.1 times lower when compared with ultrasonic disruption. Anaerobic digestion of residual biomass resulted in a 67.5% increase in energy recovery from residual biomass after lipid extraction using HC for cell disruption. This route showed a positive net energy ratio (NER), indicating the use of hydrodynamic cavitation for disruption of *S. obliquus* biomass is energetically feasible. In contrast, routes considering protein extraction resulted in lower energy efficiencies. *S. obliquus* microalgae has high protein contents, which can be used for feed and food, and higher value of this compound offsets low energy efficiency of process. Solvent toxicity in residual biomass was also evaluated. In solvent mixture of hexane and ethanol, hexane showed no significant effect, however effective concentration at 50% (EC<sub>50</sub>) of ethanol was 3.78, 26.97 and 4.97 g L<sup>-1</sup>, while EC<sub>50</sub> of ethyl acetate was 18.74, 18.02 and 5.85 g L<sup>-1</sup> for methanogenic archaea, *S. obliquus* and lettuce seeds, respectively. Ethyl acetate is environmentally suitable solvent with great potential for use in microalgae lipid extraction, enabling residual biomass to be used for resource and energy recovery.

Keywords: *Tetradesmus obliquus*. Hydrodynamic cavitation. Net energy ratio (NER). Anaerobic digestion; EC<sub>50</sub>; Energy balance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Artigos publicados nos últimos 20 anos sobre a utilização das microalgas para produção de biocombustíveis e alimentos. ....	27
Figura 3.2: Artigos publicados nos últimos 20 anos com os gêneros de microalgas do filo Chlorophyta utilizados para produção de biocombustíveis e alimentos. ....	28
Figura 3.3: Mecanismo de cavitação por onda acústica (ultrassom).....	48
Figura 3.4: Mecanismo de formação das microbolhas na cavitação hidrodinâmica.....	49
Figura 3.5: Sistema em batelada para geração da cavitação hidrodinâmica. Fonte: O autor .....	50
Figura 3.6: Patentes que utilizam o princípio da cavitação hidrodinâmica.....	54
Figura 4.1: Sistema para rompimento celular por cavitação hidrodinâmica.....	88
Figura 4.2: Gráfico de superfície de resposta para o rendimento de extração de lipídios com uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003.....	94
Figura 4.3: Gráfico de superfície de resposta para o rendimento de extração de proteínas solúveis com uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 .....	96
Figura 4.4: Gráfico de superfície de resposta para o rendimento de extração de pigmentos totais com uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 .....	98
Figura 4.5: Gráfico de superfície de resposta para o consumo intensivo de energia com uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003.....	100
Figura 4.6: Consumo de energia para o rompimento celular de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 .....	102
Figura 4.7: Microscopia confocal de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003.....	104
Figura 4.8: Redução no pH da suspensão após o rompimento celular de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 por cavitação hidrodinâmica .....	107
Figura 5.1: Extração de concentrado proteico, lipídios e lipídios após a extração das proteínas, de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR00.....	124
Figura 5.2: Biomassa residual obtida após a extração de lipídios (LE), proteínas e lipídios (PLE) e proteínas (PE).....	130
Figura 5.3: Produção de metano a partir da biomassa <i>in natura</i> e residual de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003. ....	134

Figura 5.4: Balanço de energia do processamento da biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003....	137
Figura 6.1: Lipídios totais e rendimento de extração, cromatografia em camada delgada e FAMES dos lipídios de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 .....	158
Figura 6.2: Produção acumulada de metano em testes de BMP.....	161
Figura 6.3: Curva de crescimento e taxa de crescimento específica de <i>S. obliquus</i> BR003 .....	164
Figura 6.4: Imagens de células de <i>S. obliquus</i> BR003 em microscopia de campo claro .....	165
Figura 6.5: Sementes de alface após 7 dias de germinação em extrato de microalgas .....	168
Figura 6.6: Curva de concentração-resposta dos solventes etanol e acetato de etila.....	170
Figura 6.7: <i>Heatmap</i> de similaridade entre os parâmetros avaliados.....	171

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Características do envoltório celular dos gêneros de microalgas do filo Chlorophyta.....	30
Tabela 3.2: Poder Calorífico Superior (PCS) da biomassa de microalgas e dos produtos obtidos na biorrefinaria.....	33
Tabela 3.3: Consumo de energia no processo <i>Downstream</i> para produção de biodiesel, extração de proteínas e digestão anaeróbia da biomassa de microalgas.....	34
Tabela 3.4: Vantagens e desvantagens dos principais métodos de rompimento celular .....	45
Tabela 3.5: Uso da cavitação hidrodinâmica como método de rompimento celular em microalgas ....	52
Tabela 3.6: Descrição e condições operacionais dos métodos utilizados em trabalhos com a digestão anaeróbia da biomassa de microalgas. ....	61
Tabela 4.1: Caracterização da biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003.....	86
Tabela 4.2: Fatores e níveis utilizados para otimização das condições de rompimento celular de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 pela cavitação hidrodinâmica .....	87
Tabela 4.3: Parâmetros hidrodinâmicos utilizados na otimização das condições operacionais para rompimento celular de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 por cavitação hidrodinâmica. ....	89
Tabela 4.4: Rendimento de extração de lipídios, proteínas solúveis, pigmentos totais e consumo intensivo de energia, utilizando a cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003.....	92
Tabela 4.5: Rendimento de extração dos compostos intracelulares de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 após rompimento por cavitação hidrodinâmica e ajuste do pH da suspensão.....	106
Tabela 4.6: Composição de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAMES) dos lipídios de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 rompida por cavitação hidrodinâmica, e com pH diferentes.....	108
Tabela 5.1: Caracterização da biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003.....	123
Tabela 5.2: Percentual de proteínas extraídas e composição do concentrado proteico .....	125
Tabela 5.3: Composição da água residuária da extração de proteínas (ARP).....	129
Tabela 5.4: Caracterização da biomassa residual obtida após a extração dos lipídios e proteínas de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003.....	132
Tabela 5.5: Dados observados e parâmetros cinéticos da produção de metano. ....	135

Tabela 5.6: Balanço de massa e energia (E) do processamento da biomassa de <i>S. obliquus</i> .....	138
Tabela 6.1: Propriedades dos solventes utilizados na extração dos lipídios de <i>S. obliquus</i> .....	152
Tabela 6.2: Concentrações de Hexano e Etanol utilizados no DCCR.....	153
Tabela 6.3: Parâmetros cinéticos e dados observados da produção de metano, pH e ácidos orgânicos ao final do ensaio de BMP .....	161
Tabela 6.4: Efeito da adição do extrato de <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003 contendo mistura dos solventes hexano e etanol, e acetato de etila na germinação de sementes de alface .....	167

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	16
1.1. REFERÊNCIAS .....	19
2. OBJETIVOS .....	22
3. <b>CAPÍTULO I:</b> Explorando a etapa do <i>downstream</i> no processamento de microalgas para produção de biocombustíveis e alimentos.....	23
3.1. INTRODUÇÃO .....	25
3.2. MICROALGAS .....	26
3.2.1. Características gerais do envoltório celular de <i>Chlorophyta</i> .....	29
3.3. BALANÇO DE ENERGIA.....	32
3.3.1. Premissas para o balanço de energia .....	32
3.3.2. Balanço de energia em uma biorrefinaria.....	34
3.4. ROMPIMENTO CELULAR.....	37
3.4.1. Métodos mecânicos.....	38
3.4.2. Métodos Não-mecânicos.....	43
3.4.3. Técnicas para avaliar o rompimento celular.....	46
3.5. O FENÔMENO DA CAVITAÇÃO .....	46
3.5.1. Princípio e mecanismos.....	46
3.5.2. O uso da cavitação hidrodinâmica no rompimento celular .....	50
3.5.3. Desafios do uso de cavitação hidrodinâmica em biorrefinarias de microalgas.....	54
3.6. BIOMASSA RESIDUAL .....	54
3.7. DIGESTÃO ANAERÓBIA DA BIOMASSA RESIDUAL .....	56
3.7.1. Efeito inibitório dos solventes utilizados para extração de lipídios .....	58
3.7.2. Métodos utilizados para avaliar a produção de metano.....	59
3.8. DESAFIOS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	63
3.9. CONCLUSÃO .....	64
3.10. REFERÊNCIAS .....	65

4. <b>CAPÍTULO II: Efeito combinado do pH e da cavitação hidrodinâmica na extração de lipídios, proteínas e pigmentos de <i>Scenedesmus obliquus</i></b> .....	82
4.1. INTRODUÇÃO .....	83
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	85
4.2.1. Produção e coleta da biomassa.....	85
4.2.2. Composição da biomassa de <i>S. obliquus</i> BR003 .....	86
4.2.3. Planejamento experimental .....	86
4.2.4. Rompimento celular por cavitação hidrodinâmica.....	87
4.2.5. Rompimento celular por ultrassom .....	89
4.2.6. Cálculo da energia requerida para rompimento .....	89
4.2.7. Indicadores de rompimento celular .....	90
4.2.8. Análises estatística .....	91
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	92
4.3.1. Otimização das condições operacionais da cavitação hidrodinâmica .....	92
4.3.2. Otimização multiobjetivo das condições operacionais da cavitação hidrodinâmica.....	101
4.3.3. Microscopia confocal .....	103
4.3.4. Efeito do pH no rompimento celular por CH .....	105
4.4. CONCLUSÕES.....	109
4.5. REFERÊNCIAS .....	109
5. <b>CAPÍTULO III: Racionalização de energia do processamento da biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> para produção de alimentos e energia</b> .....	114
5.1. INTRODUÇÃO .....	115
5.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	117
5.2.1. Produção da biomassa .....	117
5.2.2. Rompimento celular .....	117
5.2.3. Extração de proteínas e lipídios .....	118
5.2.4. Teste de Potencial Bioquímico do Metano (BMP) .....	119
5.2.5. Balanço de energia .....	120

5.2.6.	Procedimentos analíticos.....	122
5.2.7.	Análises estatísticas.....	122
5.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	123
5.3.1.	Produção e composição da biomassa de <i>S. obliquus</i> BR003.....	123
5.3.2.	Extração de proteínas .....	124
5.3.3.	Extração de lipídios.....	127
5.3.4.	Resíduos dos processos PLE e LE .....	128
5.3.5.	Digestão anaeróbia da biomassa residual.....	133
5.3.6.	Balanco de Energia.....	136
5.4.	CONCLUSÕES.....	141
5.5.	REFERÊNCIAS .....	141
6.	<b>CAPÍTULO IV: Impactos da toxidez de solventes orgânicos na recuperação de recursos do processo de extração de lipídios da microalga de <i>Scenedesmus obliquus</i>.....</b>	<b>148</b>
6.1.	INTRODUÇÃO .....	149
6.2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	151
6.2.1.	Produção e coleta da biomassa.....	151
6.2.2.	Extração de lipídios.....	151
6.2.3.	Ensaio de toxicidade .....	153
6.2.4.	Procedimentos analíticos.....	157
6.2.5.	Análise de dados.....	157
6.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	157
6.3.1.	Extração de lipídios.....	157
6.3.2.	Efeito inibitório dos solventes.....	160
6.3.3.	Determinação da concentração efetiva a 50% (CE <sub>50</sub> ) .....	169
6.4.	CONCLUSÕES.....	172
6.5.	REFERÊNCIAS .....	172
7.	CONCLUSÕES GERAIS .....	177

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas têm se destacado pelo grande potencial de produção de biomassa e possibilidade de uso nos setores agrícolas, de alimentos e biomédicos (GONZÁLEZ-BALDERAS et al., 2021; MOLINO et al., 2018; SILVA et al., 2020), e também como fonte de matéria-prima para a produção de biocombustíveis, tais como o biodiesel, etanol e biogás (GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2018; MAHMOOD; THEODOROPOULOS; GONZALEZ-MIQUEL, 2017; XU et al., 2019). Dentre as principais vantagens, destaca-se o grande potencial de produção de biomassa, e a possibilidade de serem cultivadas utilizando águas salobras ou residuárias, impróprias para o cultivo de plantas terrestres. Além disso, possuem grande potencial para captura do CO<sub>2</sub> proveniente de emissões antrópicas (KLIGERMAN; BOUWER, 2015).

A viabilidade do uso de biocombustíveis de microalgas depende fortemente dos custos de produção que estão diretamente associados ao balanço energético do processo. Estimativas apontam que o preço de biocombustíveis produzidos a partir das microalgas é muito superior ao preço de combustíveis derivados do petróleo (CHIA et al., 2018). Além disso, a energia necessária para a produção de biocombustíveis é maior que a sua própria energia (SHI; HANDLER; SHONNARD, 2019).

Avanços tecnológicos e sistemas de produção otimizados são necessários para obter um balanço energético positivo. Uma alternativa é a integração dos processos produtivos no formato de biorrefinarias, visando a recuperação de recursos e energia, além de agregar valor aos produtos (HEMALATHA et al., 2019). Neste conceito, deve-se utilizar a biomassa úmida como matéria prima, haja vista que o processo de secagem requer uma quantidade de energia superior a 50% da energia contida na biomassa de microalgas (KOUHIA et al., 2019).

O processamento da biomassa em uma biorrefinaria ocorre na etapa *downstream*, que compreende as etapas de coleta e concentração da biomassa, rompimento do envoltório celular, extração e transformação dos compostos de interesse e o reaproveitamento da biomassa residual (POSTMA et al., 2015). O rompimento celular e a extração de lipídios são responsáveis por 90% do consumo total de energia dessa etapa (PRÉAT et al., 2020).

Nos últimos anos vários métodos de rompimento têm sido propostos para uso em biorrefinarias de microalgas, porém a eficiência energética e a viabilidade econômica restringem o uso em escala industrial (ONUMAEGBU et al., 2018). Dentre os métodos mecânicos, a cavitação hidrodinâmica é bastante promissora pela simplicidade do sistema, facilidade no aumento de escala, e por apresentar baixo custo de implantação e baixo consumo

de energia (FARDINPOOR et al., 2021; LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; LEE; HAN, 2015; LEE; OH; HAN, 2019; WAGHMARE et al., 2019)

A cavitação hidrodinâmica ocorre quando no escoamento em constrições, como válvula de estrangulamento, placa de orifício, tubos de Venturi, dentre outros, gerando uma zona de baixa pressão devido ao aumento da velocidade do fluido (GOGATE; KABADI, 2009). Esse fenômeno é caracterizado quando a pressão do fluido que escoar atinge valores abaixo da pressão de vapor do fluido. Nessa situação haverá a formação de bolhas cavitantes e, assim que o fluido atingir uma zona de maior pressão, as bolhas entram em colapso produzindo ondas de choque (LEE; HAN, 2015).

Estudos realizados com a cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de microalgas demonstram o quanto esse método é eficiente energeticamente. Waghmare et al. (2019) por exemplo, obtiveram consumo de energia 6,3 vezes menor quando comparado com o rompimento por ultrassom, para extração de lipídios de *Chlorella pyrenoidosa*. Enquanto Lee et al. (2015) verificaram um consumo de 3,0 MJ kg<sup>-1</sup> para extração de lipídios de *Tetraselmis suecica*. Porém, nos poucos trabalhos publicados foi avaliada apenas a extração de lipídios (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; LEE; HAN, 2021, 2015; LEE; OH; HAN, 2019; SETYAWAN et al., 2018; SETYAWAN; MULYONO; SURYA, 2020; WAGHMARE et al., 2019). Assim, é necessário estudar os efeitos do rompimento celular por cavitação hidrodinâmica para extração de outros produtos, tais como proteínas e pigmentos.

A eficiência energética das operações unitárias de extração dos compostos de interesse das microalgas é crucial para determinar a viabilidade econômica do uso destas como matéria prima para produção de alimentos e energia (PRÉAT et al., 2020). A extração de proteínas e lipídios de microalgas apresenta uma baixa eficiência energética quando comparada com culturas tradicionais, como por exemplo a soja (TREDICI et al., 2015). Assim, para se tornar viável o uso das microalgas como fonte de alimentos e energia, é necessário identificar processos com maior eficiência energética para extração dos compostos de interesse.

Após a extração dos lipídios e proteínas há a geração de um resíduo que representa de 60 a 85% (em base seca) da biomassa inicial (PRÉAT et al., 2020), além da água proveniente do cultivo. Essa biomassa residual é formada por compostos orgânicos rico em carbono e nitrogênio, presos aos fragmentos da parede celular (GÜNERKEN et al., 2015). Rocha et al. (2020) verificaram que a biomassa desengordurada de *Scenedesmus obliquus* continha uma energia de 16,7 MJ kg<sup>-1</sup>, e continha 38% de proteínas, 2,2% de lipídios e 22% de carboidratos. Assim, a digestão anaeróbia da biomassa residual é uma estratégia para a recuperação de recursos, pois permite recuperar energia por meio da produção de metano, e contribui para a

melhoria da eficiência energética das operações unitárias de extração de lipídios e proteínas (GANESH et al., 2018). Vários trabalhos têm verificado o potencial de uso dessa biomassa para produção de metano e recuperação de energia (MARKOU et al., 2020; ROKICKA et al., 2020). Porém, não foram identificados trabalhos publicados com linhagens de *S. obliquus* que avaliaram o efeito do rompimento por cavitação hidrodinâmica na produção de metano.

A biomassa residual obtida após a extração de lipídios contém solventes orgânicos, em quantidade que depende de suas características, principalmente a solubilidade em água. Para definir a melhor destinação dessa água residuária, é importante avaliar a toxicidade dos solventes para as comunidades de microrganismos anaeróbios, microalgas e plantas. Dentre os poucos estudos que avaliaram a toxicidade dos solventes na digestão anaeróbia, Sánchez-Bayo et al. (2020) observaram um aumento na produção de metano devido à presença de acetato de etila na biomassa residual de *Isochrysis galbana*. Yun et al. (2016) verificaram que concentrações de hexano com demanda química de oxigênio (DQO) acima de  $4 \text{ g L}^{-1}$  inibe a produção de metano na digestão anaeróbia da biomassa de *Chlorella vulgaris*. Porém, não há estudos que investigaram o efeito de diferentes concentrações de acetato de etila, e o efeito combinado do etanol e hexano na digestão anaeróbia da biomassa residual. Esses solventes e suas misturas são apontados como de grande potencial para a extração de lipídeos de microalgas (ESCORSIM et al., 2020; SÁNCHEZ-BAYO et al., 2020). Também não há informações sobre a toxicidade do acetato de etila e da mistura de hexano e etanol em cultivos fotoautotróficos de microalgas, e da fitotoxicidade desses solventes em plantas.

Assim, se faz necessário um estudo integrado para avaliar o efeito do rompimento celular por cavitação hidrodinâmica no balanço de energia do processamento da microalga para produção de alimentos e combustíveis. Além disso, a toxicidade dos solventes orgânicos presentes na biomassa residual deve ser avaliada, visando o uso para recuperação de energia por meio da digestão anaeróbia e como substrato para cultivos de microalgas e germinação de sementes.

Para atingir os objetivos supracitados, a tese foi organizada na forma de capítulos independentes, precedida desta introdução geral e com as conclusões gerais destacadas ao final do texto. No primeiro capítulo apresenta-se uma revisão de literatura que explora a etapa do *downstream* no processamento de microalgas para produção de biocombustíveis e alimentos. No segundo capítulo é apresentado o efeito combinado do pH e da cavitação hidrodinâmica na extração de lipídios, proteínas e pigmentos de *Scenedesmus obliquus*. No terceiro capítulo, a racionalização de energia do processamento da biomassa de *Scenedesmus obliquus* para produção de alimentos e energia foi explorado. Por fim, no quarto capítulo foram avaliados os

impactos da toxidez de solventes orgânicos na recuperação de recursos do processo de extração de lipídios da microalga de *Scenedesmus obliquus*.

## 1.1. REFERÊNCIAS

- CHIA, S. R. et al. Analysis of Economic and Environmental Aspects of Microalgae Biorefinery for Biofuels Production: A Review. **Biotechnology Journal**, p. 1700618, 9 fev. 2018.
- FARDINPOOR, M. et al. Effects of Hydrodynamic Cavitation-Assisted NaOH Pretreatment on Biofuel Production from Cyanobacteria: Promising Approach. **BioEnergy Research** **2021 15:1**, v. 15, n. 1, p. 289–302, 1 maio 2021.
- GANESH, R. et al. Bioresource Technology A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. **Bioresource Technology**, v. 262, n. March, p. 319–332, 2018.
- GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal** Elsevier, , 15 abr. 2009.
- GONZÁLEZ-BALDERAS, R. M. et al. Identification and effect of ozone and ultrasound pretreatments on *Desmodesmus* sp. and *Tetradesmus obliquus* proteins. **Algal Research**, v. 60, p. 102514, 1 dez. 2021.
- GONZALEZ-FERNANDEZ, C. et al. Biochemical methane potential of microalgae biomass using different microbial inocula. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 184, 29 dez. 2018.
- GÜNERKEN, E. et al. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 2, p. 243–260, 1 mar. 2015.
- HEMALATHA, M. et al. Microalgae-biorefinery with cascading resource recovery design associated to dairy wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 284, p. 424–429, 2019.
- KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1834–1846, dez. 2015.
- KOUHIA, M. et al. Energy analysis of algae-to-biofuel production chains integrated with a combined heat and power plant. **International Journal of Sustainable Engineering**, v. 12, n. 4, p. 281–290, 4 jul. 2019.
- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1881–1889, 16 out. 2015.
- LEE, I.; HAN, J.-I. Development of a pretreatment method based on Fenton-like reaction

- combined with hydrodynamic cavitation for lipid extraction from wet microalgae. **Renewable Energy**, v. 175, p. 415–421, set. 2021.
- LEE, I.; HAN, J. I. Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 246–251, 1 jun. 2015.
- LEE, I.; OH, Y.-K.; HAN, J.-I. Design optimization of hydrodynamic cavitation for effectual lipid extraction from wet microalgae. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 102942, 1 abr. 2019.
- MAHMOOD, W. M. A. W.; THEODOROPOULOS, C.; GONZALEZ-MIQUEL, M. Enhanced microalgal lipid extraction using bio-based solvents for sustainable biofuel production. **Green Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 5723–5733, 27 nov. 2017.
- MARKOU, G. et al. Methane production through anaerobic digestion of residual microalgal biomass after the extraction of valuable compounds. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 31 mar. 2020.
- MOLINO, A. et al. Microalgae Characterization for Consolidated and New Application in Human Food, Animal Feed and Nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 2436, 1 nov. 2018.
- ONUMAEGBU, C. et al. Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 93, n. April 2017, p. 16–26, out. 2018.
- POSTMA, P. R. et al. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 297–304, 1 maio 2015.
- PRÉAT, N. et al. Identification of microalgae biorefinery scenarios and development of mass and energy balance flowsheets. **Algal Research**, v. 45, n. November 2019, p. 101737, 2020.
- ROCHA, D. N. et al. Improving biofuel production by thermochemical conversion of defatted *Scenedesmus obliquus* biomass. **Journal of Cleaner Production**, v. 275, 2020.
- ROKICKA, M. et al. Effects of Ultrasonic and Microwave Pretreatment on Lipid Extraction of Microalgae and Methane Production from the Residual Extracted Biomass. **Bioenergy Research**, p. 1–9, 12 out. 2020.
- SÁNCHEZ-BAYO, A. et al. Biodiesel and biogas production from *Isochrysis galbana* using dry and wet lipid extraction: A biorefinery approach. **Renewable Energy**, v. 146, p. 188–195, 1 fev. 2020.
- SETYAWAN, M. et al. Optimum extraction of algae-oil from microalgae using hydrodynamic cavitation. **International Journal of Renewable Energy Research**, v. 8, n. 1, p. 451–458, 2018.
- SETYAWAN, M.; MULYONO, P.; SURYA, Y. Effect of Devices and Driving Pressures on Energy Requirements and Mass Transfer Coefficient on Microalgae Lipid Extraction Assisted by Hydrodynamic Cavitation. v. 9, n. 3, p. 467–473, 2020.

- SHI, R.; HANDLER, R. M.; SHONNARD, D. R. Life cycle assessment of novel technologies for algae harvesting and oil extraction in the renewable diesel pathway. **Algal Research**, v. 37, p. 248–259, 1 jan. 2019.
- SILVA, M. E. T. DA et al. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 103711, fev. 2020.
- TREDICI, M. R. et al. Energy balance of algal biomass production in a 1-ha “Green Wall Panel” plant: How to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. **Applied Energy**, v. 154, p. 1103–1111, 15 set. 2015.
- WAGHMARE, A. et al. Hydrodynamic cavitation for energy efficient and scalable process of microalgae cell disruption. **Algal Research**, v. 40, n. March, p. 101496, 2019.
- XU, S. et al. Evaluation of bioethanol and biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* grown in biodiesel waste glycerol: A sequential integrated route for enhanced energy recovery. **Energy Conversion and Management**, v. 197, p. 111907, 1 out. 2019.
- YUN, Y.-M. et al. Inhibition of residual n-hexane in anaerobic digestion of lipid-extracted microalgal wastes and microbial community shift. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7138–7145, 13 abr. 2016.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os impactos do rompimento celular e da recuperação de energia pela digestão anaeróbia da biomassa residual, na melhoria da eficiência energética do processamento da microalga verde *Scenedesmus obliquus* BR003.

Os objetivos específicos foram:

1. Discutir o estado-da-arte do processamento da biomassa de microalgas do filo Chlorophyta, para produção de biocombustíveis e alimentos, com enfoque no impacto do rompimento celular e na digestão anaeróbia da biomassa residual no balanço de energia do processo (Capítulo I);
2. Caracterizar o efeito da cavitação hidrodinâmica como método de rompimento celular, e otimizar as condições operacionais para a máxima extração de lipídios, proteínas e pigmentos, com o mínimo consumo de energia (Capítulo II);
3. Descrever por meio de balanço de energia o efeito do rompimento celular por cavitação hidrodinâmica e da digestão anaeróbia da biomassa residual, de 3 (três) rotas de extração de lipídios e proteínas (Capítulo III):
  - Extração de proteínas;
  - Extração de lipídios;
  - Extração de lipídios após a extração de proteínas.
4. Avaliar a toxicidade dos solventes orgânicos utilizados na etapa de extração do óleo de microalgas, na digestão anaeróbia, no cultivo de microalgas, e na germinação de sementes (Capítulo IV).

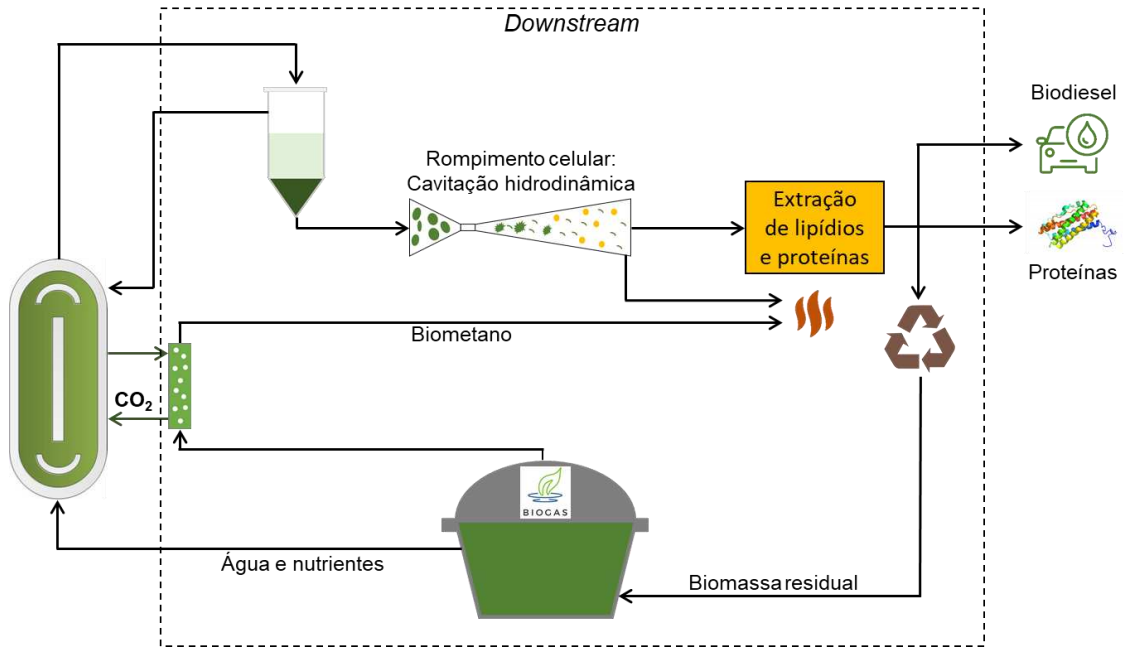
### 3. CAPÍTULO I: Explorando a etapa do *downstream* no processamento de microalgas para produção de biocombustíveis e alimentos

#### RESUMO

A viabilidade do uso de biocombustíveis de microalgas depende fortemente dos custos de produção e do balanço de energia do processo. O objetivo desse trabalho é fornecer informações sobre o processamento da biomassa na etapa *downstream*, com enfoque na extração de proteínas e produção de biodiesel de microalgas do filo Chlorophyta. Para tal, uma revisão de literatura das características do envoltório celular e dos métodos de rompimento foi realizada. A cavitação hidrodinâmica apresenta-se como um método promissor, devido ao baixo consumo de energia e facilidade de aumento de escala. A digestão anaeróbia da biomassa desengordurada e desproteinizada é uma estratégia para reduzir os custos de produção com a recuperação de nutrientes, carbono e água, além de melhorar o balanço energético do processo com a produção do biogás, que pode ser utilizado para geração de calor na recuperação dos solventes. Assim, enfatiza-se a importância do balanço de energia para avaliar e otimizar o dimensionamento de uma biorrefinaria.

**PALAVRAS-CHAVE:** cavitação hidrodinâmica; digestão anaeróbia; Chlorophyta; Potencial Bioquímico de Metano (BMP); balanço de energia.

### RESUMO GRÁFICO



### 3.1. INTRODUÇÃO

A viabilidade do uso de biocombustíveis de microalgas depende fortemente dos custos de produção que estão diretamente associados ao balanço energético do processo. Estimativas apontam que o preço de biocombustíveis produzidos a partir das microalgas é muito superior ao preço de combustíveis derivados do petróleo (CHIA et al., 2018). Além disso, a energia necessária para a produção de biocombustíveis é maior que a sua própria energia (SHI; HANDLER; SHONNARD, 2019).

Avanços tecnológicos e sistemas de produção otimizados são necessários para obter um balanço energético positivo. Uma alternativa é a integração dos processos produtivos no formato de biorrefinarias, visando a recuperação de recursos e energia, além de agregar valor aos produtos (HEMALATHA et al., 2019). Neste conceito, deve-se utilizar a biomassa úmida como matéria prima, haja vista que o processo de secagem requer uma quantidade de energia superior a 50% da energia contida na biomassa de microalgas (KOUHIA et al., 2019).

O processamento da biomassa em uma biorrefinaria ocorre na etapa *Downstream*, que compreende as etapas de coleta e concentração da biomassa, rompimento do envoltório celular, extração e transformação dos compostos de interesse e o reaproveitamento da biomassa residual (POSTMA et al., 2015). O rompimento celular e a extração de lipídios são responsáveis por 90% do consumo total de energia dessa etapa (PRÉAT et al., 2020).

Nos últimos anos, vários métodos mecânicos de rompimento celular têm sido propostos para uso em biorrefinarias de microalgas, porém a eficiência energética e a viabilidade econômica restringem o uso em escala industrial (ONUMAEGBU et al., 2018). Dentre os métodos, a cavitação hidrodinâmica é bastante promissora pela simplicidade do sistema, facilidade no aumento de escala, baixo custo de implantação e baixo consumo de energia (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; LEE; HAN, 2015; LEE; OH; HAN, 2019; WAGHMARE et al., 2019b).

No que se refere à etapa de extração de lipídios, os maiores consumos de energia ocorrem na separação das fases, com o uso de centrífuga para quebra da emulsão formada pela interação do solvente com a fração aquosa, e na evaporação do solvente (MARTIN, 2016; ORFIELD et al., 2015; PRÉAT et al., 2020b; SHI; HANDLER; SHONNARD, 2019). O consumo de energia para recuperação do solvente pode ser reduzido com o reaproveitamento do calor gerado na etapa do rompimento celular, e com o uso do biogás produzido pela digestão anaeróbia da biomassa residual (PRÉAT et al., 2020).

A digestão anaeróbia é um fenômeno bem estabelecido, amplamente utilizado para o tratamento de vários tipos de resíduos, e que possibilita a recuperação de energia, água e

nutrientes da biomassa residual das microalgas (KENDIR; UGURLU, 2018). Porém, a recalitrância da parede celular, a amônia liberada em razão da baixa relação entre carbono e nitrogênio (C:N), e o efeito inibitório dos solventes limitam o uso dessa tecnologia em biorrefinarias de microalgas (NEVES; SALES; PERELO, 2016).

Uma estratégia para agregar valor à cadeia de produção de biocombustíveis de microalgas é a extração das proteínas, que representa de 40 a 60% da biomassa (AMORIM et al., 2020a). Destaca-se que o preço desse produto é oito vezes maior que o preço de mercado do óleo de microalgas (BARSANTI; GUALTIERI, 2018b). Também há possíveis ganhos energéticos, já que a extração de lipídios a partir da biomassa desproteïnizada reduz a estabilidade da emulsão e facilita a recuperação de solventes (AMORIM et al., 2020b). Além disso, a digestão anaeróbia a partir da biomassa desengordurada e desproteïnizada apresenta maiores rendimentos de metano (HERNÁNDEZ et al., 2014; WU et al., 2020).

Este artigo de revisão tem como objetivo contribuir para o conhecimento sobre o processamento da biomassa na etapa *Downstream*, com enfoque na extração de proteínas e produção de biodiesel, a partir de microalgas do filo Chlorophyta. Os pontos críticos e as limitações do processo foram identificados com a realização do levantamento do consumo de energia em todas as etapas. As características do envoltório celular e os métodos de rompimento são discutidos, com ênfase na cavitação hidrodinâmica. A digestão anaeróbia é apresentada como uma estratégia para recuperação de energia a partir da biomassa residual.

### 3.2. MICROALGAS

A produção comercial de microalgas se iniciou na década de 1960, e atualmente os gêneros *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella* e *Haematococcus* são responsáveis pela produção mundial de biomassa, que é de aproximadamente 20.000 ton ano<sup>-1</sup>, sendo mais de 90% dessa produção comercializada como produtos alimentícios (BENEMANN; WOERTZ; LUNDQUIST, 2018). Essas microalgas são classificadas pela agência Norte Americana FDA (*Food and Drug Administration*) como fontes de alimentos que se enquadram na categoria geralmente reconhecida como segura (em inglês GRAS) (CAPORGNO; MATHYS, 2018). Destaca-se que *Arthrospira* (spirulina) é uma cianobactéria e os demais gêneros são microalgas verdes (Chlorophyta).

O termo microalga não possui um significado taxonômico e engloba os microrganismos que realizam fotossíntese (DE CARVALHO et al., 2020). Estima-se que existam cerca de 500 mil espécies de microrganismos agrupados como microalgas (AMORIM et al., 2020a). Recentemente, muitas dessas espécies têm recebido atenção devido à capacidade de oferecer

diversos produtos de valor agregado, além da produção de biocombustíveis. Nas duas últimas décadas foi notável o crescimento das pesquisas a este respeito (Figura 3.1), com um total de 9.307 e 4.654 artigos publicados sobre a utilização de microalgas para produção de biocombustíveis e alimentos, respectivamente.

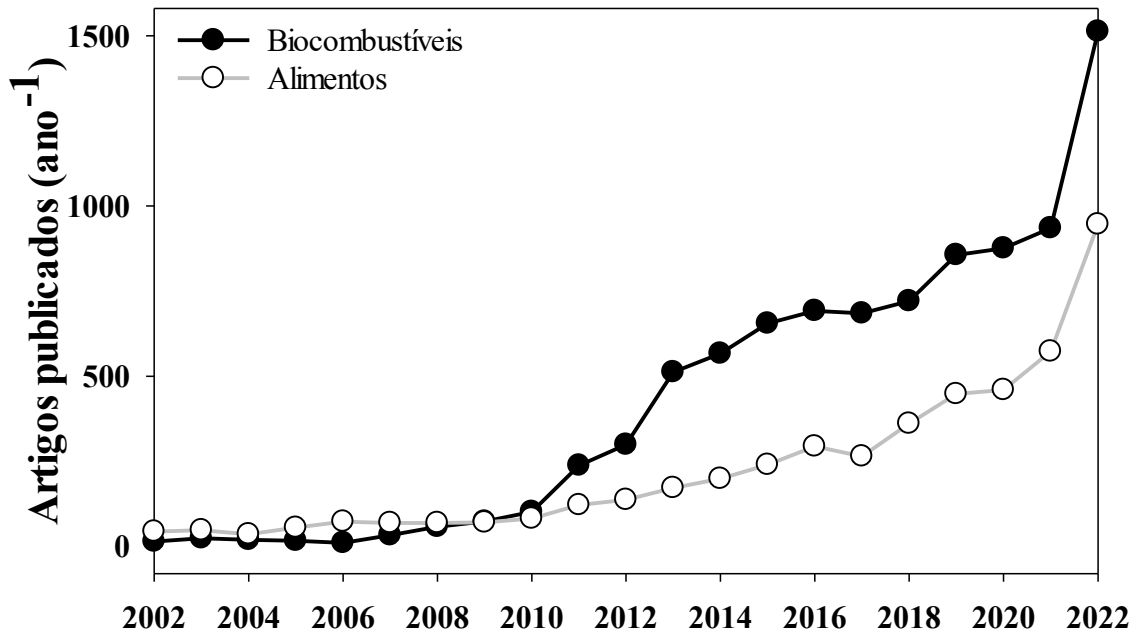


Figura 3.1: Artigos publicados nos últimos 20 anos sobre a utilização das microalgas para produção de biocombustíveis e alimentos. Dados obtidos a partir de busca na plataforma *Scopus* utilizando as palavras-chave: *microalgae and (energy or fuels or methane or biodiesel or ethanol)* para biocombustíveis; e *microalgae and (feed or food)* para alimentos. Data da pesquisa 28/01/2023

Dentre os artigos publicados entre os anos de 2002 e 2022, aproximadamente 50 e 35% focaram especificamente com microalgas do filo Chlorophyta (dados não apresentados) para produção de biocombustíveis e alimentos, respectivamente. Esse grupo é constituído por aproximadamente 6.750 espécies que vivem em ambientes aquáticos de água doce, salobras ou salgadas (GUIRY; GUIRY, 2020). Membros do filo Chlorophyta são tradicionalmente utilizados para a alimentação, principalmente os gêneros *Chlorella*, *Dunaliella* e *Haematococcus*. Porém, recentemente também têm recebido atenção devido à capacidade de oferecer diversos produtos de valor agregado, além da produção de biocombustíveis, tratamento de águas residuárias e sequestro de carbono (AMORIM et al., 2020a; VOIGT et al., 2014). Na Figura 3.2 são apresentados os gêneros de Chlorophyta mais pesquisados para produção de biocombustíveis e alimentos.

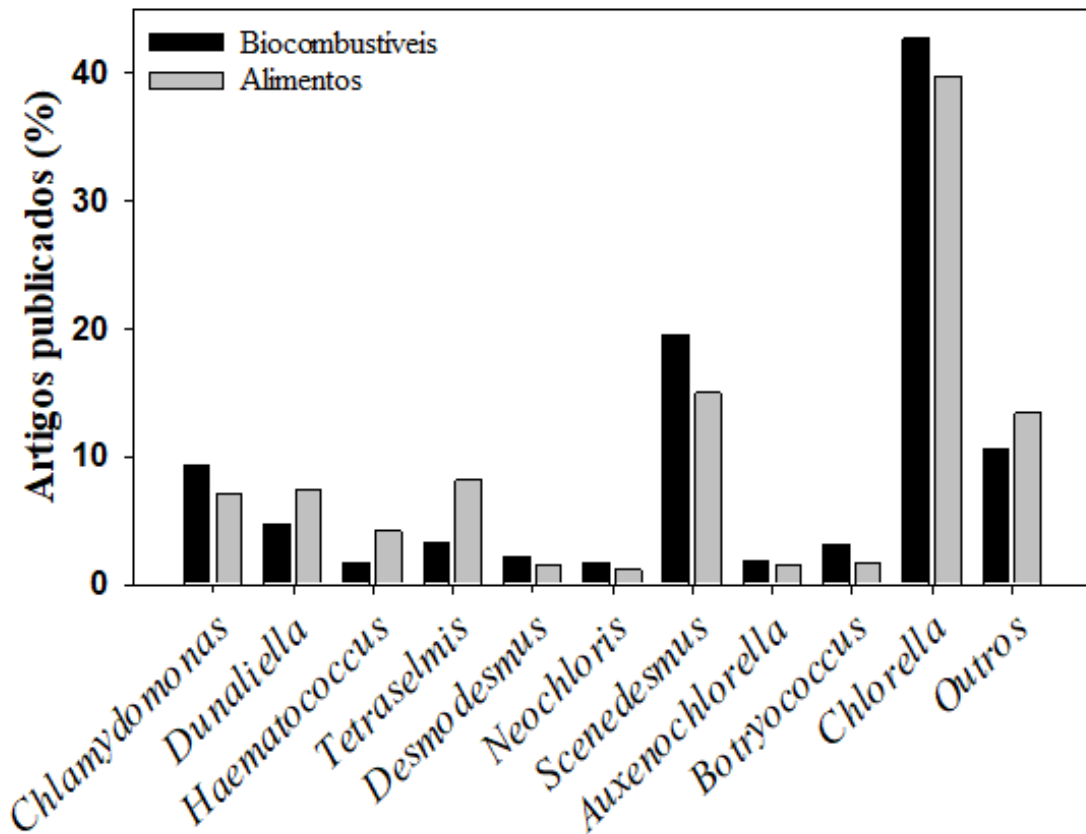


Figura 3.2: Artigos publicados nos últimos 20 anos com os gêneros de microalgas do filo Chlorophyta utilizados para produção de biocombustíveis e alimentos. Dados obtidos a partir de busca na plataforma *Scopus* utilizando as palavras-chave: *microalgae and (energy or fuels or methane or biodiesel or ethanol)* para biocombustíveis; e *microalgae and (feed or food)* para alimentos. Data da pesquisa 28/01/2023

As microalgas dos gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* (Figura 3.2) são as mais estudadas para a produção de biocombustíveis e alimentos. Esses gêneros são compostos por várias espécies que despertam grande interesse na produção de biodiesel, etanol, biogás, bio-óleo e carvão, além de alimentos, rações e nutracêuticos (KHOO et al., 2019).

As pesquisas com os gêneros *Dunaliella*, *Haematococcus* e *Tetraselmis* são desenvolvidas principalmente para produção de alimentos (Figura 3.2). A capacidade de algumas espécies de *Dunaliella* em acumular grandes quantidades de carotenoides ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e cantaxantina) estimulou o interesse industrial por seu uso. (BAUDELET et al., 2017). Já *Haematococcus* tem a capacidade de produzir a astaxantina, que pode ser usada como nutracêutico (AMORIM et al., 2020a). As microalgas do gênero *Tetraselmis* é comumente utilizada como alimento para aquicultura, e recentemente surgiu a demanda de seu emprego na produção de biocombustíveis, tendo em vista os altos teores de lipídios dessa microalga (BAUDELET et al., 2017).

O gênero *Botryococcus* também se destaca pelos alto teores de lipídios (13,5 a 65% em base seca), além da capacidade de armazenar grande parte desses lipídios como hidrocarbonetos

(TASIC<sup>Ć</sup> et al., 2016). Além disso, também produz exopolissacarídeos largamente utilizados na indústria química, e carotenoides, com predominância da luteína (CHENG et al., 2019). Já o gênero *Chlamydomonas* é amplamente utilizado como modelos em estudos genéticos e metabólicos, tendo como espécie mais conhecida a *Chlamydomonas reinhardtii* (BAUDELET et al., 2017).

### 3.2.1. Características gerais do envoltório celular de Chlorophyta

As microalgas armazenam compostos de interesse para indústria (lipídios, proteínas, carboidratos e pigmentos) dentro da célula, protegida por um envoltório celular. Esse envoltório é uma estrutura rígida que protege a célula de estresses bióticos e abióticos, além de fornecer plasticidade, permitindo que elas se expandam e assumam formas diferentes (RASHIDI; TRINDADE, 2018).

O filo Chlorophyta, alvo dessa revisão, sub-filo Chlorophytina é dividido em cinco classes distintas: Chlorophyceae, Trebouxyphyceae, Chlorodendrophyceae, Ulvophyceae e Pedinophyceae (GUIRY; GUIRY, 2020), sendo que as duas últimas são pouco estudadas para fins biotecnológicos. As clorófitas possuem tipos de parede celular com morfologia e composição química variadas, e essas informações geralmente são utilizadas como ferramentas para classificação taxonômica das espécies (BAUDELET et al., 2017).

O conhecimento sobre a composição e morfologia das paredes celulares é ainda importante para a escolha de métodos de rompimento celular eficientes e economicamente viáveis, visando a máxima extração de produtos de interesse, com qualidades desejáveis (ALHATTAB; KERMANSHAHI-POUR; BROOKS, 2019). Na Tabela 3.1, as características dos envoltórios dos principais gêneros de Chlorophyta são apresentadas.

Tabela 3.1: Características do envoltório celular dos gêneros de microalgas do filo Chlorophyta

Classes	Ordens	Famílias	Gêneros	Características do envoltório celular	Referência	
Chlorophyceae	Chlamydomonadales	Chlamydomonadaceae	<i>Chlamydomonas</i>	Matriz extracelular formada por cinco camadas e composta principalmente de proteínas, incluindo glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (Hyp)	(IMAM et al., 1985) (SIERRA; DIXON; WILKEN, 2017)	
		Dunaliellaceae	<i>Dunaliella</i>	Ausência de parede celular rígida. As células são recobertas por revestimentos composto de glicoproteínas.	(BAUDELET et al., 2017)	
	Sphaeropleales	Haematococcaceae	<i>Haematococcus</i>	Matriz extracelular formada por multicamadas de fibras, composta de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (Hyp). Na fase vegetativa há presença do Algaenan.	(HAGEN; SIEGMUND; BRAUNE, 2002)	
		Scenedesmaceae	<i>Tetrademus</i>	Matriz extracelular composta por parede celular de duas camadas: uma microfibrilar composta de glicoproteínas e uma bainha trilaminar (TLS) que contém Algaenan.	(BAUDELET et al., 2017)	
			<i>Scenedesmus</i>	As células são agrupadas em cenóbios e unidas por uma camada opaca de elétrons.		
	Neochloridaceae	<i>Neochloris</i>	Parede celular de duas camadas: uma camada interna mais fina e uma camada externa trilaminar composta de glicoproteínas e polissacarídeos.	(RASHIDI; TRINDADE, 2018)		
	Trebouxophyceae	Trebouxiales	Botryococcaceae	<i>Botryococcus</i>	Matriz extracelular formada por rede de hidrocarbonetos de cadeia longa; bainha da colônia formada por fibras de polissacarídeos compostos de galactose e arabinose.	(CHENG et al., 2019) (TATLI et al., 2018)
			Chlorellaceae	<i>Chlorella</i>	Matriz extracelular formada por camada microfibrilar composta de polissacarídeos.	(BAUDELET et al., 2017)
				<i>Auxenochlorella</i>	Matriz extracelular formada de duas camadas: a interna composta de polissacarídeos, e a externa trilaminar.	(BAUDELET et al., 2017)
	Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	Chlorodendraceae	<i>Tetraselmis</i>	Parede rígida chamada “Teca” composta principalmente por polissacarídeos.	(BECKER; MELKONIAN; KAMERLING, 1998)

Conforme apresentado na Tabela 3.1, as microalgas apresentam diferentes estruturas e composições da parede celular. Baudelet *et al.* (2017) agruparam as classes de Chlorophyta de acordo com as características gerais do envoltório celular. Segundo os autores, as classes Chlorophyceae e Trebouxiophyceae fazem parte do mesmo grupo, e de uma forma geral apresentam parede celular de polissacarídeos, principalmente  $\beta$ -(1,3) ou  $\beta$ -(1,3) Glucano, e estrutura formada por multicamadas, com exceção do gênero *Dunaliella* que não apresenta parede celular rígida, e as células são recobertas por uma camada de glicoproteínas. Outra característica dessas classes é a presença do biopolímero Algaenan, uma macromolécula alifática insolúvel, localizada na bainha trilaminar (TLS), que reduz a suscetibilidade das microalgas à degradação por meio dos métodos de rompimento como mecânicos, enzimáticos e químicos (ALHATTAB; KERMANSHAHI-POUR; BROOKS, 2019). A família Chlorellaceae é uma das poucas exceções de microalgas pertencentes às classes Chlorophyceae e Trebouxiophyceae, que não possuem Algaenan (RASHIDI; TRINDADE, 2018).

O gênero *Tetraselmis*, pertencente à classe Chlorodendrophyceae apresenta uma parede rígida chamada “Teca”, composta de polissacarídeos incomuns como o ácido 3-desoxi-mano-2-octulosônico (Kdo), ácido 3-desoxi-5-O-metilmano-2-octulosônico (5OMeKdo), e ácido 3-desoxi-lyxo-2-heptulosárico (Dha), além do ácido galacturônico, galactose, gulose e arabinose (BECKER; MELKONIAN; KAMERLING, 1998). Destaca-se que as linhagens da classe Chlorodendrophyceae não possuem Algaenan na composição da parede celular (RASHIDI; TRINDADE, 2018).

O envoltório celular pode ser formado por múltiplas camadas de escamas ou paredes celulares de fibras estruturais complexas (ALHATTAB; KERMANSHAHI-POUR; BROOKS, 2019). A rigidez e formação da parede celular das microalgas verdes nem sempre é conferida pela celulose. Por exemplo, as linhagens do gênero *Chlamydomonas* e *Haematococcus* destacam-se por não ter celulose na composição da parede celular, mas os carboidratos de alto peso molecular e outros polímeros são essenciais para a estrutura da parede (CRONMILLER et al., 2019; HAGEN; SIEGMUND; BRAUNE, 2002). Já as linhagens da família Scenedesmaceae possuem celulose na camada interna e Algaenan na bainha trilaminar (TLS), conferindo resistência ao tratamento com várias enzimas líticas como celulasas, hemicelulasas, liozima, protease e outras hidrolases (VOIGT et al., 2014).

### 3.3. BALANÇO DE ENERGIA

#### 3.3.1. Premissas para o balanço de energia

A produção de biocombustíveis a partir de microalgas visa a extração de compostos e/ou transformação em produtos com uma maior concentração de energia por massa, tais como: lipídios, hidrocarbonetos, bio-óleo, metano, álcool, carvão, dentre outros (CHENG; LABAVITCH; VANDERGHEYNST, 2015; PRÉAT et al., 2020; ROCHA et al., 2020). Porém, a viabilidade da produção de biocombustíveis depende de um balanço de energia favorável (SLADE; BAUEN, 2013). Devido a inexistência de plantas de produção em escala industrial, vários trabalhos têm realizado o balanço de energia a partir de dados coletados em escala laboratorial, e extrapolado para uma escala maior (ANDERSSON et al., 2020; KOUHIA et al., 2019; PRÉAT et al., 2020b; SLADE; BAUEN, 2013).

O balanço de energia é feito com a quantificação das entradas de energia, para extração e transformação dos compostos microalgais em produtos energéticos, e as saídas de energia, que é a energia contida nos produtos. Assim, pode-se avaliar a sustentabilidade energética de um processo por meio da Razão de Energia Líquida (*REL*) (Equação 3.1) (ORFIELD et al., 2015). Valores de *REL* maior que 1 indicam que o processo é energeticamente sustentável, ou seja, a quantidade de energia que é produzida é maior que a quantidade de energia utilizada para a sua produção.

$$REL = \frac{\sum E_{Saída}}{\sum E_{Entrada}} \quad (3.1)$$

em que,  $\sum E_{Saída}$  representa a somatória de todas as energias contidas nos produtos de saída do processo ( $MJ\ kg^{-1}$  de produto), e  $\sum E_{Entrada}$  é a somatória da energia consumida pelos equipamentos ( $MJ\ kg^{-1}$  de produto), para extração e transformação dos compostos intracelulares em produtos energéticos. Os valores de *REL* para produção de biocombustíveis de microalgas varia de 0,44 a 2,0, e ainda não os tornam competitivos com os combustíveis fósseis, que tem um *REL* de 5,55 (BARSANTI; GUALTIERI, 2018b).

As energias de entrada são quantificadas em cada operação unitária, utilizando os dados de consumo do equipamento e o tempo de operação. Os valores de consumo são normalizados para unidade de massa de um produto, como por exemplo 1 kg de biomassa seca, conforme a equação 3.2 (HA et al., 2020).

$$E_E = \frac{P \times t}{M} \times 10^6 \quad (3.2)$$

em que,  $E_E$  é a energia específica consumida em cada operação unitária ( $MJ\ kg^{-1}$  de produto),  $P$  é a potência do equipamento (W),  $t$  é o tempo de operação (s) e  $M$  é a massa do produto (kg).

Já a eficiência energética de cada operação unitária pode ser determinada por meio do rendimento do equipamento ( $\eta$ ) (Equação 3.3), que é a relação entre a potência do equipamento e a potência que efetivamente foi utilizada para a realização do trabalho (KOUHIA et al., 2019).

$$n = \frac{P_u}{P_t} \quad (3.3)$$

em que,  $P_u$  é a potência útil (W) e  $P_t$  é a potência total do equipamento (W). A potência útil pode ser calculada a partir de equações teóricas, ou obtida com o fabricante do equipamento.

A energia de saída do processo, contida nos produtos, pode ser quantificada com o uso de equipamentos específicos, como bombas calorimétricas usadas para determinar o Poder Calorífico Superior (PCS) (ROCHA et al., 2020), ou estimada por meio de equações teóricas, para os produtos líquidos (lipídios e biodiesel) (KOUHIA et al., 2019), sólidos (biomassa residual) (EHIMEN et al., 2009) e biogás (BRIGAGÃO et al., 2019). Nessas equações os valores de PCS são calculados utilizando a análise elementar ou imediata dos produtos. Na Tabela 3.2 constam os valores de PCS para a biomassa de microalgas e para alguns produtos obtidos a partir das microalgas.

Tabela 3.2: Poder Calorífico Superior (PCS) da biomassa de microalgas e dos produtos obtidos na biorrefinaria

<b>Material</b>	<b>PCS</b>	<b>Referência</b>
Microalga	22,2 MJ kg <sup>-1</sup>	(TREDICI et al., 2015)
Microalga desengordurada	16,7 MJ kg <sup>-1</sup>	(ROCHA et al., 2020)
Lipídios	38,5 MJ kg <sup>-1</sup>	(ROCHA et al., 2020)
Biodiesel	38,1 MJ kg <sup>-1</sup>	(RAJESH BANU et al., 2020)
Glicerol	19 MJ kg <sup>-1</sup>	(DASAN et al., 2019)
Etanol	26,8 MJ kg <sup>-1</sup>	(DASAN et al., 2019)
Biogás	39,3 MJ m <sup>-3</sup>	(ANDERSSON et al., 2020)

Além da REL, é importante determinar a eficiência ( $E_f$ ) do processo para a extração dos compostos energéticos (Equação 3.4). Essa eficiência é a razão entre a quantidade do composto extraído e o total deste composto na célula.

$$E_f = \frac{MP_e}{MP_t} \quad (3.4)$$

em que,  $MP_e$  é a massa do produto extraída (g kg<sup>-1</sup>) e  $MP_t$  é a massa total do produto disponível para extração (g kg<sup>-1</sup>).

Geralmente a determinação desses compostos é feita a partir da biomassa seca, utilizando métodos analíticos para lipídios (Soxhlet, Folch, Bligh Dyer) (KHOO et al., 2020), proteínas (BRADFORD, 1976; LOWRY et al., 1951) e carboidratos (MASUKO et al., 2005).

Porém, como o processo de extração em uma biorrefinaria é realizado a partir da biomassa úmida, essa quantificação também deve ser feita nas mesmas condições, para determinar a massa do composto disponível para extração, naquela condição de umidade (DE JESUS et al., 2019). O rompimento do envoltório celular por ultrassom é indicado como método padrão, pois é comumente utilizado em laboratórios para desintegração completa da biomassa para extração e análise dos compostos intracelulares a partir da biomassa úmida (DE CARVALHO et al., 2020). Assim, os dados obtidos em um balanço de energia, são comparáveis ao consumo de energia para conduzir o tratamento com ultrassom.

### 3.3.2. Balanço de energia em uma biorrefinaria

Uma biorrefinaria pode ser definida como o processamento dos produtos de microalgas após o cultivo, visando a recuperação de recursos e energia, além de agregar valor aos produtos (HEMALATHA et al., 2019). A etapa após o cultivo é chamada de *Downstream process*, e compreende as etapas de coleta e concentração da biomassa, rompimento celular, extração e transformação dos compostos de interesse, e o reaproveitamento da biomassa residual (POSTMA et al., 2015). Na Tabela 3.3 o consumo de energia de cada etapa do processo *Downstream* é apresentado a partir de uma revisão de trabalhos publicados.

Tabela 3.3: Consumo de energia no processo *Downstream* para produção de biodiesel, extração de proteínas e digestão anaeróbia da biomassa de microalgas

Espécie	Condições	Consumo de Energia (MJ kg <sup>-1</sup> )	Fonte
<b>Coleta e Concentração</b>			
<i>Chlorella vulgaris</i>	Centrifuga de discos (120 m <sup>3</sup> /h); eficiência 95%; concentração inicial 0,2%, final 15%	2,34	(PRÉAT et al., 2020)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Centrifuga; concentração inicial 0,19% e final 15%	2,25	(TREDICI et al., 2015)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Floculação com cloreto de ferro; eficiência 98%	0,44	(TOGARCHETI et al., 2017)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Floculação utilizando quitosana; eficiência 95%; concentração inicial 0,05%	0,20	(SHI; HANDLER; SHONNARD, 2019)
<b>Rompimento celular</b>			
<i>Chlorella vulgaris</i>	Homogeneização de Alta Pressão com 4 ciclos e pressão de 1.000 Bar; concentração de 15%; eficiência de rompimento 92%	7,65	(PRÉAT et al., 2020)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Homogeneização de alta pressão com pressão de 1.000 Bar; concentração de 10%	3,08	(YAP et al., 2015)

<i>Tetraselmis suecica</i>	Cavitação hidrodinâmica; pressão 10 Bar; concentração 1,5-2%; eficiência de extração de lipídios 50%	3,0	(LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015)
<b>Extração de lipídios</b>			
<i>Chlorella vulgaris</i>	Hexano; agitação (40°C, 2h, 60rpm); separação de fases (centrifugação 15min, 9000rpm); recuperação do solvente. Rendimento: 25%	12,80	(PRÉAT et al., 2020)
Não informado	Hexano; agitação (2,5h); separação de fases (centrifugação); recuperação de solvente; 10% de sólidos na biomassa; relação BM: solvente 1:1	8,4	(MARTIN, 2016)
Não informado	Solvente Hexano	2,8	(ORFIELD et al., 2015)
Não informado	Solvente Hexano	11,97	(SHI; HANDLER; SHONNARD, 2019)
<b>Conversão a biodiesel</b>			
Não informado	Transesterificação com metanol, considerando uma eficiência de conversão de 90%	0,49	(ORFIELD et al., 2015)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Transesterificação com metanol (6:1)	0,10	(ANDERSSON et al., 2020)
<b>Extração de Proteínas</b>			
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extração a partir da biomassa desengordurada; precipitação das proteínas pH 4; separação (centrifugação 10 min, 10.000 g); secagem do concentrado até obter 50% de massa seca; rendimento 52,8%;	1,45	(PRÉAT et al., 2020)
<b>Digestão anaeróbia</b>			
<i>Chlorella vulgaris</i>	Digestão da biomassa residual após extração de lipídios e proteínas; concentração 5%; tempo de retenção hidráulica 46 dias; produção de metano 93,03 g kg <sup>-1</sup> de BM seca (entrada)	-4,17*	(PRÉAT et al., 2020)
Não informado	Energia para agitação	1,4	(ANDERSSON et al., 2020)

(\*) Balanço de energia positivo. O biogás produzido foi utilizado no aquecimento do biodigestor e o excesso para geração de calor na biorrefinaria.

A etapa de coleta e concentração consiste na remoção de parte da água até se obter uma biomassa com concentração de 15 a 25% de sólidos. Esse processo representa de 20 a 30% do custo total da produção de biocombustíveis de microalgas (MILANO et al., 2016). O custo é alto devido à dificuldade de concentração das células com tamanho pequeno (3 a 30  $\mu\text{m}$ ) (ROSELET et al., 2017) e baixas concentrações de biomassa no cultivo, na ordem de 0,5 a 4 g L<sup>-1</sup> (CHATUNGNOEN; CHISTI, 2016). Assim, vários métodos tem sido propostos tais como

centrifugação, filtração e eletrocoagulação que são caracterizados pelo alto consumo de energia, além do método da floculação seguida pela sedimentação (KUMAR et al., 2019).

O uso da centrifugação como método de concentração da biomassa representa um consumo de energia de aproximadamente 10% da energia contida na biomassa da microalga (Tabela 3.2 e Tabela 3.3). Dessa forma, os métodos que utilizam o princípio da floculação e sedimentação devem ser priorizados. Deconinck et al. (2018) verificaram que os métodos de floculação e sedimentação apresentam melhores índices econômicos, energéticos e ambientais. Destaca-se que nesse método só há consumo de energia para bombeamento, agitação e dispersão do floculante na suspensão de microalgas (SHI; HANDLER; SHONNARD, 2019). Porém, a eficiência e tempo do processo depende do tamanho das células, sendo que um processo demorado não é aceitável, devido à degradação dos compostos de interesse (DECONINCK et al., 2018).

O rompimento do envoltório celular é uma etapa crítica para extração dos compostos intracelulares a partir da biomassa úmida. Essa etapa afeta diretamente a eficiência de extração de lipídios, proteínas e produção de metano na digestão anaeróbia (PRÉAT et al., 2020). A homogeneização de alta pressão é o método de rompimento mecânico mais utilizado em escala piloto para o pré-tratamento da biomassa das microalgas (YAP et al., 2015), porém apresenta como desvantagem o alto consumo de energia, que representa de 15 a 35% da energia contida na microalga (Tabela 3.2 e Tabela 3.3). O alto consumo de energia nessa etapa inviabiliza o uso das microalgas para produção de biocombustíveis. Assim, é necessário o desenvolvimento de métodos de rompimento com uma maior eficiência energética.

A extração de lipídios das microalgas ocorre após a etapa do rompimento celular. A extração por solvente orgânico é o método mais utilizado para extrair lipídios a partir da biomassa úmida (KHOO et al., 2020). Nesse método, os solventes apolares extraem os lipídios que estão presos aos fragmentos da parede celular e do citoplasma (KHOO et al., 2020). Dentre os solventes orgânicos, o hexano se destaca para extração de lipídios em biorrefinarias, devido a sua alta seletividade e baixa toxicidade, possibilitando o uso da biomassa residual como fonte de alimento (MARTIN, 2016).

O consumo de energia na etapa da extração é de 2,8 a 12,8 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca, o que equivale a aproximadamente 10 a 60% da energia contida na microalga (Tabela 3.2 e Tabela 3.3). Esse consumo ocorre em três operações unitárias: (1) extração, que compreende a agitação da mistura de solventes e biomassa úmida de microalgas; (2) separação das fases, geralmente feito com o uso de centrifugas; e (3) recuperação do solvente. Préat et al. (2020) verificaram que a etapa de separação de fases, com uso de centrifuga, foi responsável por 80% do consumo

de energia da extração. Enquanto Martin (2016) verificou que 73% da energia consumida na extração era para evaporação do solvente. Essa grande variação nos dados de consumo de energia é devido ao uso de dados obtidos em escala laboratorial para projeções do aumento de escala, assumindo condições que muitas vezes não representam a realidade.

De qualquer maneira, o consumo de energia da etapa de extração depende dos teores de lipídios neutros da microalga, concentração de sólidos da biomassa, proporção do volume de solvente para o volume de biomassa e estabilidade da emulsão formada após a mistura (DE JESUS et al., 2019; MARTIN, 2016; RAJESH BANU et al., 2020). O consumo de energia para evaporação do solvente pode ser reduzido com o reaproveitamento do calor gerado na etapa do rompimento celular, assim como o uso do biogás produzido a partir da biomassa residual (PRÉAT et al., 2020).

Poucos trabalhos exploram o balanço de energia para extração de proteínas, mesmo que esse procedimento seja bastante comum na indústria de cosméticos devido às propriedades emulsificantes, e de alimentos (PRÉAT et al., 2020). O procedimento para extração começa com o rompimento celular em meio aquoso para solubilizar as proteínas, e pode ocorrer antes ou após a extração de lipídios (AMORIM et al., 2020b; SAFI et al., 2017). Duas opções são comumente usadas para a recuperação das proteínas solúveis: precipitação baseada no ponto isoelétrico ou ultrafiltração. A precipitação é frequentemente utilizada devido ao seu baixo custo operacional e menor consumo de energia (PRÉAT et al., 2020). Nesse método o pH do extrato de microalgas é ajustado de acordo com o ponto isoelétrico, seguido de agitação e centrifugação para separação das proteínas. Assim, as entradas de energia são estimadas como o consumo dos equipamentos para agitação e separação.

O processo de conversão dos lipídios à biodiesel geralmente é feito por meio da transesterificação, em que o álcool (metílico ou etílico) reage com os triglicerídeos em meio ácido ou alcalino (ANDERSSON et al., 2020). Estima-se que 1 g de lipídios da biomassa de algas possa produzir 1 g de biodiesel, porém há a necessidade de purificação do óleo antes da transesterificação (RAJESH BANU et al., 2020). Atualmente o consumo de energia dessa etapa é estimado a partir de dados laboratoriais do consumo de energia para agitação e aquecimento da mistura.

### **3.4. ROMPIMENTO CELULAR**

O rompimento do envoltório celular é um pré-tratamento da biomassa de microalgas. Essa etapa consiste em romper, dissolver ou permear o envoltório celular para extração dos compostos de interesse para a indústria (lipídios, pigmentos, proteínas e carboidratos) (DE

CARVALHO et al., 2020). Assim, devido a diversidade e complexidade da parede celular de Chlorophyta, vários métodos têm sido propostos com o objetivo de maximizar a extração dos compostos. Esses métodos são divididos em dois grandes grupos: mecânicos e não-mecânicos, conforme o mecanismo de rompimento celular (GÜNERKEN et al., 2015; LEE et al., 2017b).

Nessa seção serão discutidos os métodos de rompimento celular que podem ser utilizados em biorrefinarias para extração de compostos intracelulares de microalgas a partir da biomassa úmida. Uma discussão mais aprofundada será feita acerca do método da cavitação hidrodinâmica, devido ao grande potencial para ser utilizado nas biorrefinarias de microalgas. Ao final da seção serão apresentados alguns métodos para avaliar e/ou quantificar os danos causados nas células de microalgas após pré-tratamento para rompimento celular.

### 3.4.1. Métodos mecânicos

#### *Moinho de esferas*

O moinho de esferas é um equipamento muito utilizado em escala industrial para moagem de minerais e redução do tamanho de partículas de tintas e vernizes (MONTALESCOT et al., 2015; POSTMA et al., 2015). No campo da biotecnologia tem sido aplicado com sucesso para rompimento celular de microrganismos (BALASUNDARAM; PANDIT, 2001; BALASUNDARAM; SKILL; LLEWELLYN, 2012; CHISTI; MOO-YOUNG, 1986). O mecanismo de rompimento celular neste equipamento é a compactação mecânica e tensão de cisalhamento, e o seu uso apresenta vantagens como: alta eficiência de rompimento; possibilidade de uso de biomassa com altas concentrações de sólidos; facilidade para controle de temperatura; facilidade no aumento de escala; e equipamentos disponíveis comercialmente (GÜNERKEN et al., 2015).

Postma et al. (2015) avaliaram a extração de proteína solúveis de *Chlorella vulgaris* com o uso de moinho de esferas, obtendo uma eficiência de 32 a 42%, com consumo de energia de 2,9 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca, com concentração de 14,5% (m v<sup>-1</sup>). Os autores destacaram que o baixo consumo de energia foi obtido devido a extração seletiva das proteínas ocorrer antes da desintegração total das células. Enquanto Doucha and Lívanský (2008) obtiveram valores em torno de 36 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca, com eficiência de rompimento de 90%. Taleb et al. (2016) avaliaram várias espécies de microalgas para produção de biodiesel, e verificaram que as clorófitas *Parachlorella kessleri* e *Scenedesmus obliquus* apresentaram 90 e 73% de células rompidas, respectivamente, utilizando moinho de esferas e alta pressão (1750 bar). Esse achado científico reforça que a eficiência de rompimento em moinho de esfera depende da morfologia e composição da parede celular.

Embora o moinho de esferas apresente uma alta eficiência de rompimento, o custo de instalação, consumo de energia e a necessidade de resfriamento da amostra representam gargalos para sua aplicação em biorrefinarias de microalgas (LEE et al., 2017b). Postma et al. (2015) observaram que 70 a 85% da energia consumida pelo moinho de esferas é dissipada, e não utilizada diretamente no rompimento celular.

#### *Homogeneização de alta pressão*

O homogeneizador de alta pressão é um equipamento muito utilizado na indústria de laticínios, e tem sido muito utilizado para o rompimento celular de microrganismos. O mecanismo de rompimento celular neste equipamento é o uso da tensão de cisalhamento e cavitação (GÜNERKEN et al., 2015). A homogeneização de alta pressão apresenta vantagens como: alta eficiência de rompimento; baixo tempo de residência da amostra e facilidade no aumento de escala (YAP et al., 2015).

Mulchandani et al. (2015) obtiveram uma eficiência de 90% na extração de lipídios com a pressão de 800 bar e 10 ciclos em *Chlorella saccharophila* com concentração de 0,2% (m v<sup>-1</sup>). Praveenkumar et al. (2020) observaram que 690 bar e 3 ciclos é o suficiente para obter 91% de rompimento celular para extração de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* em concentração de 0,1% (m v<sup>-1</sup>). Já Xie et al. (2016) verificaram que o consumo de energia foi de 82,7 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca para *Desmodesmus sp.*, com eficiência de 90% de rompimento celular, pressão de 2.760 bar com três ciclos e concentração de 1% (m v<sup>-1</sup>). Safi et al. (2017) obtiveram um consumo de energia de 1,15 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca para extração de proteínas solúveis em *Nannochloropsis gaditana*, com pressão de 1.000 bar, 1 ciclo e concentração de 10% (m v<sup>-1</sup>). Destaca-se que o máximo de extração de proteínas solúveis deve ser alcançado em condições mais suaves de rompimento celular (SAFI et al., 2017).

O consumo específico de energia para o rompimento celular utilizando este método depende da concentração de sólidos da biomassa, morfologia e composição da parede celular da microalga e características do produto de interesse. Yap et al. (2015) verificaram uma variação no consumo de energia de 0,5 a 100 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca em concentrações de 0,1 a 25%, com pressão de 1.500 bar. Assim, o uso de biomassa com baixas concentrações de sólidos, além do custo de instalação, consumo de energia e a necessidade de resfriamento da amostra, representam gargalos para aplicação da homogeneização de alta pressão em biorrefinarias de microalgas (LEE et al., 2017b).

### *Cavitação hidrodinâmica*

A cavitação hidrodinâmica é gerada pela passagem do líquido através de uma constrição, gerando uma zona de baixa pressão e a formação de microbolhas cavitantes (GOGATE; KABADI, 2009). Quando a pressão do líquido retorna ao nível acima da pressão de vapor, há um colapso das microbolhas, produzindo ondas de choque devido ao aumento da pressão (100 a 5.000 bar) e de temperatura (500 a 15.000 K) (LEE; HAN, 2015).

O uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular das microalgas é promissor pela simplicidade do sistema, facilidade no aumento de escala, baixo custo de implantação e baixo consumo de energia quando comparado a outros métodos de rompimento mecânicos (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; LEE; HAN, 2015; LEE; OH; HAN, 2019; WAGHMARE et al., 2019b). Waghmare et al. (2019) obtiveram eficiência de 96,4% na extração de lipídios de *Chlorella pyrenoidosa* utilizando a cavitação hidrodinâmica. Além disso, os autores verificaram que esse método é 6,3 vezes mais eficiente energeticamente quando comparado com o rompimento por ultrassom. Já Lee et al. (2015) verificaram um consumo de 3,0 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca, utilizando a cavitação hidrodinâmica para extração de lipídios de *Tetraselmis suecica*, que é um consumo de energia 15 vezes menor que do ultrassom.

### *Ultrassom*

A sonicação é comumente utilizada em laboratórios para desintegração completa da biomassa para extração e análise dos compostos intracelulares (DE CARVALHO et al., 2020). O mecanismo para rompimento é baseado na cavitação acústica, responsável pela formação de microbolhas, seguida de propagação por ondas de choque e implosão das microbolhas que causa a ruptura celular por forças de cisalhamento elevadas (LEE et al., 2017b). Esse método tem como vantagem a alta eficiência de rompimento (GÜNERKEN et al., 2015).

Natarajan et al. (2014) obtiveram um consumo de energia de 1.440 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca para o rompimento celular de *Tetraselmis suecica* e *Chlorella* sp. com concentração de 0,2% (m v<sup>-1</sup>), utilizando potência de 1.000 W e frequência de 20 kHz. Foram observadas as eficiências de rompimento de 99% para *T. suecica* e 75% para *Chlorella* sp., sendo que a maior eficiência de extração de lipídios foi obtida em *Chlorella* sp. (75%). A maior rigidez da parede celular e menor diâmetro das células de *Chlorella* sp. exige um maior consumo de energia para o rompimento quando comparado com *T. suecica*, porém, após o rompimento a membrana celular danificada de *T. suecica* forma bastonetes para retenção dos lipídios, contribuindo com a menor eficiência de extração de lipídios dessa linhagem (NATARAJAN et al., 2014). Ha et

al. (2020) otimizaram a extração de carboidratos, proteínas e lipídios de *Pseudochlorella sp.*, *Chlamydomonas mexicana* e *Chlamydomonas pitschmannii*. Os autores utilizaram a biomassa microalgal com concentrações de 4 % (m v<sup>-1</sup>), potência de 450 W e frequência de 40 kHz, e obtiveram um consumo de energia de 162 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca. Martínez-Sanz et al. (2020) observaram que os teores de pigmentos e ácidos graxos poli-insaturados foram reduzidos com o emprego da sonicação para o rompimento de *Arthrospira platensis*, *Nannochloropsis gaditana* e *Scenedesmus almeriensis*, devido ao aquecimento e a degradação induzida pelos radicais livres que são formados durante o pré-tratamento.

O alto consumo de energia e a necessidade de resfriamento da amostra, representam desafios para sua aplicação em biorrefinarias de microalgas (GÜNERKEN et al., 2015). Além disso, não há relatos científicos do uso de sonicadores em larga escala. A maioria dos trabalhos da literatura que preconiza o uso desse processo descreve resultados promissores em pequena escala ou para o consorcio entre sonicação e outros métodos de extração (DE CARVALHO et al., 2020).

#### *Micro-ondas*

O tratamento por micro-ondas é muito utilizado para aquecimento, secagem e ruptura de células (KAPOORE et al., 2018). As micro-ondas interagem seletivamente com as moléculas dielétricas ou polares (por exemplo a água) que atingem o ponto de ebulição rapidamente, resultando na expansão dentro da célula e um aumento na pressão interna, que são responsáveis por danos ao envoltório celular (GÜNERKEN et al., 2015). Esse método apresenta como vantagens a alta eficiência de rompimento, curto tempo de processamento e simplicidade técnica (GÜNERKEN et al., 2015; LEE et al., 2017b).

Ha et al. (2020) otimizaram a extração de carboidratos, proteínas e lipídios de *Pseudochlorella sp.*, *Chlamydomonas mexicana* e *Chlamydomonas pitschmannii* com concentrações de 4 % (m v<sup>-1</sup>), utilizando micro-ondas com potência de 210 W e tempo de 2 minutos, obtendo uma eficiência energética de 5 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca, valor 32 vezes menor que o tratamento com ultrassom. Onumaegbu et al. (2019) obtiveram uma eficiência de extração de lipídios de 49% em *S. quadricauda* com potência de 600 W e tempo de 8 minutos. A maioria dos trabalhos reportados na literatura foram desenvolvido com soluções de microalgas com baixas concentrações de sólidos, pois são as moléculas de água que absorvem as micro-ondas e posteriormente liberam o calor e radicais (GÜNERKEN et al., 2015). Assim, o efeito das micro-ondas é maior em suspensões diluídas quando comparadas com suspensões concentradas.

O uso desse tratamento não é indicado para extração de compostos voláteis, pois a formação de radicais livres e o aumento da temperatura podem formar ligações instáveis nas cadeias de carbono estruturais, afetando a qualidade desses compostos (LEE et al., 2017b). Além disso, o alto consumo de energia e a limitação de uso de apenas solventes polares durante os processos de extração assistida por micro-ondas, representam os gargalos para sua aplicação em biorrefinarias de microalgas (KAPOORE et al., 2018).

#### *Campo elétrico pulsado*

O campo elétrico pulsado é um método de rompimento celular que usa um campo elétrico externo para induzir um potencial elétrico crítico através da parede celular, gerando um estresse na célula (GÜNERKEN et al., 2015). Esse estresse causa uma abertura temporária dos poros da parede celular, e o conteúdo intracelular é liberado (KAPOORE et al., 2018). O tamanho e o número de poros estão diretamente relacionados à intensidade do campo elétrico e pulso, o que favorece a extração seletiva dos compostos intracelulares das microalgas (LEE et al., 2017b).

O consumo de energia para rompimento celular de microalgas utilizando o campo elétrico pulsado é relativamente baixo, quando comparado a outros métodos. Eing et al. (2013) obtiveram um consumo de energia de  $1,5 \text{ MJ kg}^{-1}$  de biomassa seca para a extração de lipídios de *Auxenochlorella protothecoides* com concentração de 10% ( $\text{m v}^{-1}$ ). Porém a eficiência de rompimento é dependente de várias condições de operação, como: tipo e dosagem de solvente; temperatura; condutividade elétrica do meio; e a morfologia e composição da parede celular da espécie de microalga (LEE et al., 2017b).

Destaca-se que esse método é recente para uso com microalgas, mas há vários fornecedores de equipamentos no mercado, pois é uma tecnologia utilizada na indústria de alimentos para esterilização (DE CARVALHO et al., 2020), o que facilita a aplicação em biorrefinarias de microalgas.

#### *Explosão a vapor / autoclavagem*

A explosão a vapor de alta pressão é um tratamento térmico e frequentemente empregado para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos para produção de bioenergia (LEE et al., 2017b). Também tem sido empregada para rompimento celular e extração de lipídios de microalgas, aplicando temperaturas de 160 a 260 °C, e pressão constante entre 1,03 e 3,45 MPa por vários minutos (ONUMAEGBU et al., 2018). O rompimento celular ocorre durante a despressurização da amostra. Lorente et al. (2015) obtiveram 18,2% de lipídios

extraídos de *N. gaditana* tratada com explosão a vapor a 150 °C, e combinando esse método ao uso de 10% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, os autores obtiveram 20,8% de lipídios extraídos a partir de *C. sorokiniana*, o que representa um aumento de 84% quando comparado com o controle (sem tratamento).

A autoclavagem também é um tratamento térmico que opera a uma temperatura de 121 °C e pressão de 1,02 atm, que leva ao rompimento celular das microalgas devido ao estresse térmico, liberando os compostos intracelulares (ONUMAEGBU et al., 2018). Lee et al. (2010) compararam cinco métodos de rompimento (autoclavagem, moinho de esferas, micro-ondas, ultrassom e choque osmótico) para extração de lipídios, e observaram que a autoclavagem e micro-ondas apresentaram teores idênticos de lipídios extraídos de *Chlorella vulgaris*. Embora esses dois métodos apresentem altas eficiência de rompimento celular para extração de lipídios, o alto custo para gerar calor inviabiliza o uso dessas tecnologias em biorrefinarias de microalgas, além de não ser adequado para extração de compostos voláteis e de proteínas (KAPOORE et al., 2018; LEE et al., 2017b).

### 3.4.2. Métodos Não-mecânicos

#### *Químico*

O pré-tratamento químico refere-se ao uso de diversos reagentes químicos para o pré-tratamento da biomassa de microalgas, com o objetivo de aumentar a desintegração ou permeabilidade da parede celular (ONUMAEGBU et al., 2018). Diversos tipos de compostos podem ser utilizados tais como: antibióticos, agentes quelantes, agentes caotrópicos, detergentes, solventes, hipocloritos, ácidos e bases, sendo que a seletividade e a eficiência de cada composto é dependente da composição da parede celular do microrganismo (AMORIM et al., 2020a; GÜNERKEN et al., 2015; LEE et al., 2017b).

Como as substâncias químicas rompem as células de maneira diferente, existem vários mecanismos de rompimento celular químico. Os antibióticos geralmente inibem a produção de componentes da membrana celular, enquanto os agentes quelantes ligam os cátions que fazem a ponte cruzada entre as moléculas adjacentes da membrana celular e os caótropicos tornam o meio circundante menos hidrofílico. Os detergentes formam micelas juntamente com as moléculas de membrana, enquanto os solventes dissolvem ou aumentam a porosidade da membrana e/ou parede celular. As bases saponificam os lipídios da membrana enquanto os ácidos levam ao aumento da porosidade da membrana e/ou parede celular (GÜNERKEN et al., 2015)

Embora os métodos químicos apresentem vantagens como o baixo consumo de energia e maior seletividade, o uso desse tratamento não é adequado para o rompimento celular visando a extração de proteínas e pigmentos, além de gerar resíduos químicos e contaminar os produtos extraídos.

### *Enzimático*

O pré-tratamento enzimático é um processo bioquímico utilizado para o rompimento da parede celular de microalgas. As enzimas se ligam a moléculas específicas na parede celular das células, danificando-a e permitindo que certos compostos sejam liberados, o que facilita a extração de compostos de interesse mais puros (GÜNERKEN et al., 2015; LEE et al., 2017b). Assim, o principal parâmetro que influencia o rendimento do processo de rompimento é o tipo de enzima utilizada (AMORIM et al., 2020a)

As enzimas mais utilizadas para rompimento celular das microalgas são: celulases, pectinases, xilanases, lisozimas, amilase, protease neutra, protease alcalina e papaína (AMORIM et al., 2020a; ONUMAEGBU et al., 2018). Apesar do grande potencial e baixo consumo de energia, o rompimento utilizando enzimas possui algumas desvantagens, como o longo tempo de processo, baixa produtividade comparado aos métodos mecânicos e o alto custo das enzimas (ONUMAEGBU et al., 2018).

Um resumo das vantagens e desvantagens dos métodos de rompimento mecânico e não mecânicos é apresentado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Vantagens e desvantagens dos principais métodos para rompimento celular de microalgas

<b>Métodos de rompimento</b>		<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Mecânico</b>	Moinho de esferas	Alta eficiência; Facilidade no aumento de escala; Uso de biomassa com concentrações maiores;	Alto consumo de energia; Aquecimento; Baixa seletividade;
	Homogeneização de alta pressão	Alta eficiência; Facilidade no aumento de escala;	Alto consumo de energia; Aquecimento; Baixa seletividade; Uso de baixas concentrações de biomassa;
	Cavitação hidrodinâmica	Alta eficiência; Baixo consumo de energia; Facilidade no aumento de escala;	Aquecimento; Baixa seletividade;
<b>Mecânico</b>	Ultrassom	Alta eficiência;	Alto consumo de energia; Aquecimento; Baixa seletividade; Dificuldade no aumento de escala;
	Micro-ondas	Processamento rápido; Alta eficiência;	Alto consumo de energia; Aquecimento; Desnaturação de proteínas e degradação de pigmentos;
	Campo elétrico pulsado	Baixo consumo de energia; Maior seletividade;	Depende da condutividade do meio;
<b>Térmico</b>	Explosão a vapor	Alta eficiência;	Alto custo geração de calor; Não indicado para compostos voláteis e proteína;
	Autoclavagem	Alta eficiência;	Alto custo geração de calor; Não indicado para compostos voláteis e proteína;
<b>Não-mecânico</b>	Químico	Maior seletividade; Baixo consumo de energia;	Geração de resíduos químicos; Contaminação dos produtos; Desnaturação de proteínas e degradação dos pigmentos;
	Enzimático	Maior seletividade; Facilidade no aumento de escala; Baixo consumo de energia;	Processo mais demorado; Custo elevado das enzimas;

### 3.4.3. Técnicas para avaliar o rompimento celular

Para avaliar o grau de dano celular causado pelo rompimento, é importante o uso de técnicas eficientes para o rápido monitoramento do pré-tratamento. Essas técnicas dividem-se em: direta e indireta. Spiden et al. (2013) verificaram que a contagem de células é a técnica mais confiável para avaliação do dano celular em *Tetraselmis sp.* e *Chlorella sp.* após o rompimento por Homogeneização de Alta Pressão. A contagem de células é uma técnica direta, e faz uma análise microscópica da proporção de células fragmentadas, porém é demorada e de difícil aplicação em operações de grande escala (TAN et al., 2018).

Várias técnicas indiretas têm sido utilizadas para avaliar o grau de rompimento celular em microalgas, tais como: viscosidade; condutividade elétrica; distribuição do tamanho das partículas (citometria de fluxo); eficiência na recuperação de lipídios; teores de proteínas e pigmentos no sobrenadante; densidade ótica da amostra nos comprimentos de onda: visível (turbidez), e UV (compostos nitrogenados) (BIGELOW et al., 2014; SPIDEN et al., 2013; TAN et al., 2018; WANG; YUAN, 2015). Embora a maioria dessas técnicas sejam simples, em alguns casos não há correlação com o grau de dano celular causado pelo rompimento.

A citometria de fluxo é uma técnica que apresenta bons resultados para quantificar a eficiência do rompimento. Essa técnica se baseia nos princípios de dispersão da luz e emissão de fluorescência que ocorre devido a passagem de partículas em movimento por um feixe de luz (TAN et al., 2018). Porém, o alto custo do equipamento inviabiliza o uso dessa técnica de forma rotineira em biorrefinarias.

Martínez-Sanz et al. (2020) verificaram que a viscosidade de uma suspensão de microalgas rompida depende da concentração de sólidos da amostra, e da estrutura e composição do envoltório celular. Assim, o uso dessa técnica é limitado a poucas linhagens de microalgas. Tan *et al.* (2018) verificaram que os teores de pigmentos e proteínas no sobrenadante são técnicas mais indicadas para avaliar o grau de rompimento celular em *Chlamydomonas*, após o rompimento por ultrassom. Assim, as técnicas indiretas, principalmente os teores de lipídios, proteínas e pigmentos (BIGELOW et al., 2014; TAN et al., 2018; WANG; YUAN, 2015), possibilitam a obtenção de resultados de forma rápida e segura para avaliar a eficiência do método de rompimento.

## 3.5. O FENÔMENO DA CAVITAÇÃO

### 3.5.1. Princípio e mecanismos

A cavitação refere-se a formação de microbolhas de vapor dentro de um meio líquido homogêneo, sob pressões abaixo da pressão de vapor do líquido (FRANC; MICHEL, 2005).

Quando a pressão do líquido retorna ao nível acima da pressão de vapor, há um colapso das microbolhas, produzindo ondas de choque devido ao aumento da pressão (100 a 5.000 bar) e de temperatura (500 a 15.000 K) (LEE; HAN, 2015).

A cavitação é um fenômeno indesejada para o funcionamento de máquinas hidráulicas e navais, pois causa uma série de consequências, tais como: alteração do desempenho do sistema; aparecimento de forças adicionais nas estruturas sólidas; produção de ruído e vibrações; e erosão da parede (FRANC; MICHEL, 2005). Porém, é frequentemente utilizado de forma benéfica em diferentes áreas de aplicação para: limpeza de superfícies, dispersão de partículas em um meio líquido, síntese química, deposição eletrolítica, rompimento celular de microrganismos, desinfecção microbiana, tratamento de água e efluentes, cristalização, síntese de biodiesel, produção de emulsões, extração de biocompostos, etc. (FRANC; MICHEL, 2005; GOGATE; KABADI, 2009; GOGATE; TAYAL; PANDIT, 2006).

A cavitação é dividida em quatro tipos: acústica; ótica; de partículas; e hidrodinâmica, de acordo com o método de geração das microbolhas cavitantes (GOGATE; KABADI, 2009). Abaixo é apresentado o princípio, mecanismo de geração das microbolhas, assim como os equipamentos utilizados para geração da cavitação em cada tipo de cavitação:

*Cavitação acústica:* ocorre devido as variações de pressões em um líquido estático, produzido por ondas acústicas com frequência acima da faixa audível, ou seja, ondas de ultrassom com frequências acima de 10 KHz (YASUI, 2018). A aplicação de ondas de ultrassom em um líquido gera microbolhas de vapor devido à pressão negativa momentânea, que se colapsam violentamente assim que a pressão estiver acima da pressão ambiente, gerando ondas de choque no líquido (Figura 3.3) (FRANC; MICHEL, 2005). A frequência de uma onda acústica é definida como o número de oscilação de pressão por unidade de tempo, e está relacionada com o comprimento da onda, já a amplitude representa a oscilação temporal da pressão exercida sob o líquido (YASUI, 2018).

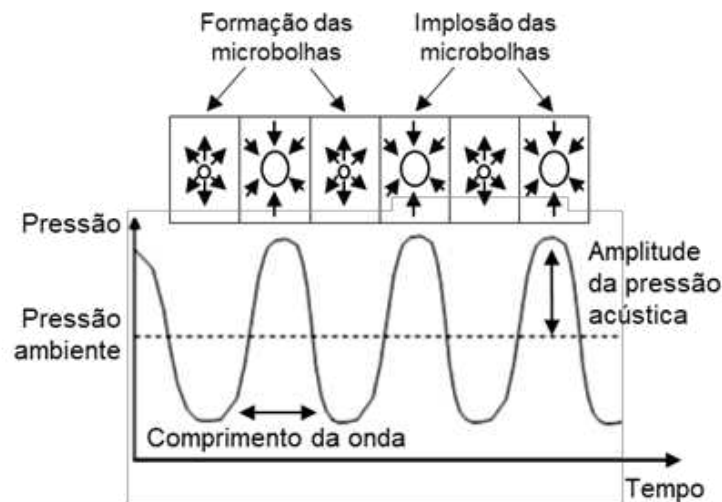


Figura 3.3: Mecanismo de cavitação por onda acústica (ultrassom). Adaptado de Yasui (2018)

Existem basicamente dois tipos de equipamentos para geração da cavitação acústica: a sonda ultrassônica ou sonicador, e o banho ultrassônico (YASUI, 2018). Na sonda ultrassônica a onda acústica é irradiada a partir de uma ponta (sonda) imersa no líquido, sendo muito utilizada em operações unitárias de homogeneização, dispersão, moagem úmida, emulsificação, extração, desintegração, dissolução e desaeração (GOGATE; KABADI, 2009). Já no banho ultrassônico, que é geralmente utilizado para limpezas, o transdutor é fixado na parede de um tanque contendo líquido (YASUI, 2018).

*Cavitação ótica:* é produzida por pulsos de fótons de luz, que quando focado em um líquido geram aquecimento de uma região delimitada, gerando bolhas de vapor superaquecido que expandem rapidamente, seguido do colapso e geração de ondas de choque (GOGATE; TAYAL; PANDIT, 2006; KURZ et al., 2006). O tamanho das bolhas de vapor depende da intensidade, comprimento e duração do pulso de luz, que geralmente são produzidos por lasers de pulso curto (PADILLA-MARTINEZ et al., 2014). Esse método tem como vantagem a aplicação da cavitação em um ponto específico de uma superfície (KURZ et al., 2006). A medicina faz uso desse princípio para procedimentos de fragmentação de cálculos no rim ou bexiga (PADILLA-MARTINEZ et al., 2014).

*Cavitação de partículas:* é produzida por um feixe de partículas elementares (por exemplo: neutros) emitido contra um líquido, que é responsável pela formação de microbolhas (GOGATE; TAYAL; PANDIT, 2006).

*Cavitação hidrodinâmica:* é gerada pela passagem do líquido através de uma constrição, como válvula de estrangulamento, placa de orifício, Venturi, etc., gerando uma zona de baixa pressão devido ao aumento da velocidade do fluido (GOGATE; KABADI, 2009). Se o

estrangulamento for suficiente para fazer com que a pressão na zona de constrição caia abaixo da pressão de vapor do fluido, haverá a formação de microbolhas cavitantes, e assim que o fluido atingir uma zona de maior pressão, as bolhas entram em colapso produzindo ondas de choque (Figura 3.4) (LEE; HAN, 2015).

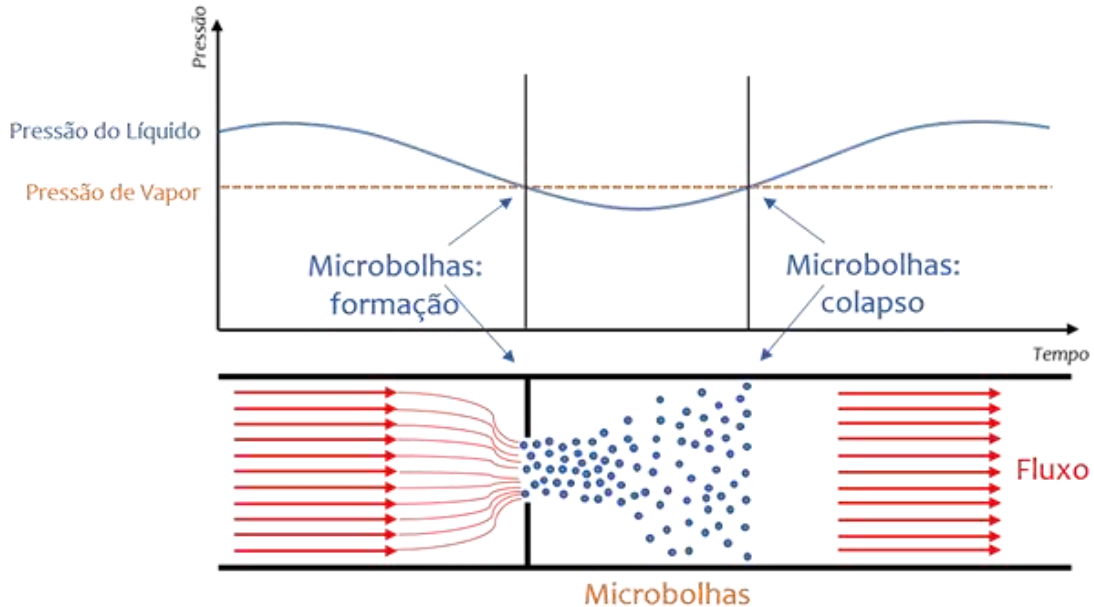


Figura 3.4: Mecanismo de formação das microbolhas na cavitação hidrodinâmica. Fonte: HydroCavit (2020)

Os homogeneizadores de alta pressão são comumente utilizados com base no princípio da cavitação hidrodinâmica. Esse equipamento consiste em uma bomba de deslocamento positivo de alta pressão e um dispositivo de estrangulamento, que é responsável por gerar a cavitação e tensão de cisalhamento (YAP et al., 2015). Porém, esse equipamento não permite controlar os parâmetros que interferem na formação das microbolhas cavitantes (GOGATE; KABADI, 2009).

A cavitação também pode ser gerada em dispositivos rotativos, composto por um impulsor, que ao atingir uma velocidade crítica, reduz a pressão próximo à parede do dispositivo, formando microbolhas cavitantes. À medida que o líquido é impulsionado para o tanque, há um aumento da pressão, levando ao colapso das microbolhas (FRANC; MICHEL, 2005). Esses dispositivos também não permitem o controle dos parâmetros na formação das microbolhas cavitantes, além disso, o consumo de energia desse sistema é muito alto (GOGATE; KABADI, 2009).

Outro sistema utilizado para geração da cavitação são os reatores confeccionados para que o líquido seja bombeado por uma constrição, utilizando dispositivos do tipo: Venturi ou placa com um único ou múltiplos orifícios (Figura 3.5) (GOGATE; KABADI, 2009). O uso

desses reatores permite o controle da pressão de entrada, vazão, temperatura do líquido, além da possibilidade de alterar a geometria do dispositivo, que tem efeito direto na intensidade da cavitação (LEE; OH; HAN, 2019).

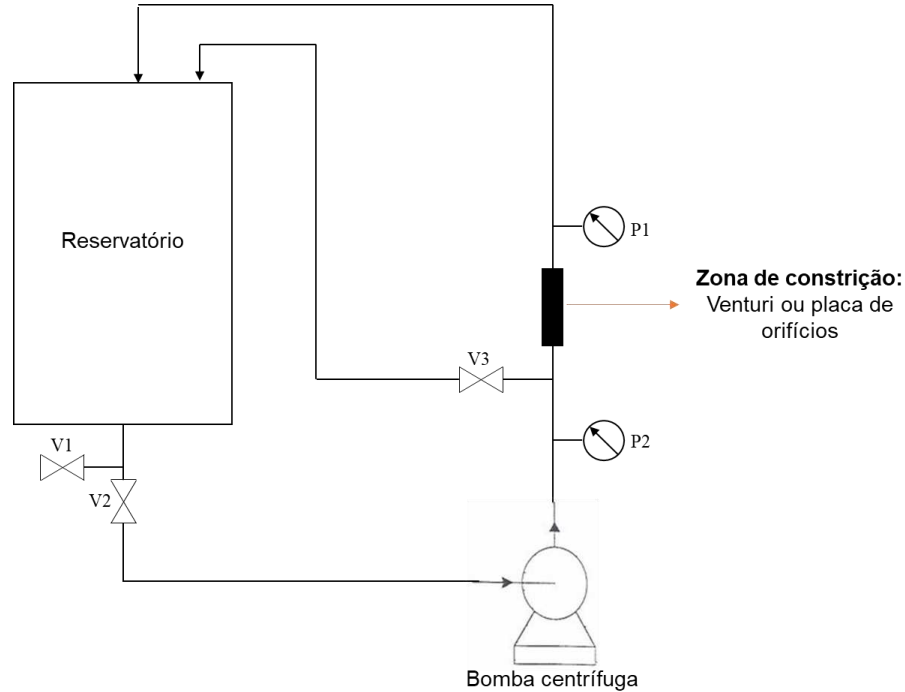


Figura 3.5: Sistema em batelada para geração da cavitação hidrodinâmica. Fonte: O autor

### 3.5.2. O uso da cavitação hidrodinâmica no rompimento celular

O rompimento do envoltório celular de microalgas utilizando a cavitação hidrodinâmica ocorre devido à ação de três mecanismos: (1) ondas de choque, geradas após o colapso das microbolhas; (2) radicais livres, principalmente  $\text{OH}^\cdot$ , que são gerados devido à dissociação de vapores aprisionados nas bolhas cavitantes; e (3) a alta temperatura (GOGATE; KABADI, 2009; LEE; OH; HAN, 2019). Esses mecanismos atuando de forma simultânea na parede celular, estimulam as reações químicas associadas a extração de compostos intracelulares das microalgas (WAGHMARE et al., 2019b).

Para se obter uma maior eficiência de rompimento celular, os parâmetros que interferem na formação das microbolhas cavitantes devem ser cuidadosamente controlados. Uma forma de caracterizar as condições de cavitação nos dispositivos, é o uso de um número adimensional chamado número de cavitação ( $\sigma$ ), que é calculado conforme a Equação 3.4, (FRANC; MICHEL, 2005).

$$\sigma = \frac{(P_2 - P_v)}{\rho V^2 / 2} \quad (3.4)$$

em que,  $P_2$  representa a pressão após o dispositivo (Pa),  $P_v$  a pressão de vapor do líquido para a temperatura operacional (Pa),  $\rho$  é a massa específica do líquido ( $\text{kg m}^{-3}$ ) e  $V$  a velocidade do

escoamento na garganta do dispositivo ( $m s^{-1}$ ). Normalmente as bolhas são geradas em condições de  $\sigma \leq 1$ , mas se a solução contém gases dissolvidos ou partículas suspensas, o início da formação das bolhas pode ocorrer em  $\sigma > 1$  (CARPENTER; GEORGE; SAHARAN, 2017). Porém (LEE; OH; HAN, 2019) verificaram que o número de cavitação é um indicador impreciso quando se trata de rompimento celular de microalgas.

A pressão de colapso das microbolhas pode ser estimada pela Equação empírica (Equação 3.5) (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015)

$$P_{Colapso} = 8 \times 10^8 \left[ R_0^{-1,2402} \times P_{Ent.}^{2,1949} \times \left( \frac{d_0}{dp} \right)^{-0,4732} \right] \quad (3.5)$$

em que,  $P_{colapso}$  é a pressão de colapso de uma única bolha cavitante (Pa);  $R_0$  é o raio inicial das bolhas ( $\mu m$ );  $P_{Ent}$  é a pressão de entrada (bar) e  $d_0/dp$  é a razão entre os diâmetros do orifício e do tubo.

A eficiência de rompimento celular utilizando a cavitação hidrodinâmica depende de uma série de fatores, tais como: número de cavitação ( $\sigma$ ); velocidade do fluxo no dispositivo ( $V$ ); massa específica do líquido ( $\rho$ ); presença de gases dissolvidos, pois os gases dissolvidos irão absorver o choque; viscosidade do líquido, pois baixa viscosidade é essencial para um colapso mais rápido das bolhas; pressão de vapor do líquido, sendo que líquidos voláteis exercerão uma pressão de vapor mais alta, reduzindo a pressão de colapso (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015).

Outro fator que afeta as condições de cavitação (início, crescimento e colapso das bolhas) é a geometria do dispositivo, tais como: a proporção do perímetro da garganta para a área da seção transversal e número de orifícios em dispositivos de placa de orifícios (CARPENTER; GEORGE; SAHARAN, 2017; LEE; OH; HAN, 2019), volume da seção divergente e convergente, além do tipo de orifício (fenda ou circular) em Venturi (ABBASI et al., 2020; DASTANE et al., 2019; KULDEEP; SAHARAN, 2016).

O uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular das microalgas é bastante promissor pela simplicidade do sistema, facilidade no aumento de escala e baixo custo de implantação. Outra vantagem é baixo consumo de energia quando comparado a outros métodos de rompimento mecânicos (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; LEE; HAN, 2015; LEE; OH; HAN, 2019; WAGHMARE et al., 2019b). Porém há poucos trabalhos publicados utilizando a cavitação hidrodinâmica como método de rompimento celular das microalgas. Além disso, os trabalhos publicados abordam apenas a extração de lipídios a partir de uma suspensão de microalgas com concentração de sólidos de no máximo 2% ( $m v^{-1}$ ) (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Uso da cavitação hidrodinâmica como método de rompimento celular em microalgas

Espécie	Dispositivo	Condições de operação	Biomassa	Eficiência de extração	Consumo de energia	Referência
<i>Nannochloropsis salina</i>	Placa com 13 orifícios e Ø 0,5 mm cada	Pressão de entrada: 2-4 Bar; Número de cavitação: 1,17; Taxa de aquecimento: 2°C/min; Número de ciclos: 112,7; Volume do reator: 0,9 L;	2% (m v <sup>-1</sup> ); 0,89% de ácido sulfúrico na amostra;	Lipídios 45,9%	2,5 MJ kg <sup>-1</sup> de BM <sub>seca</sub>	(LEE; HAN, 2015)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Placa com único orifício Ø 1,0 mm; Venturi com Ø 1,0 mm	Pressão de entrada: 5 Bar; Tempo: 105 minutos; Volume do reator: 4L;	0,45% (m v <sup>-1</sup> )	Contagem de células 96,4%	25,6 MJ kg <sup>-1</sup> de BM <sub>seca</sub>	(WAGHMARE et al., 2019b)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Placa com 33 orifícios e Ø 1 mm cada	Pressão de entrada: 10 Bar Número de cavitação: 0,125 Tempo: 4 minutos; Volume do reator: 40L	1,5 – 2,0% (m v <sup>-1</sup> )	Lipídios 50%	3,0 MJ kg <sup>-1</sup> de BM <sub>seca</sub>	(LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015)
<i>Chlorella</i> sp.	Placa com 20 orifícios e Ø 1 mm cada	Pressão de entrada: 4 Bar; Nº de cavitação: 1,01 a 3,37; Tempo: 20 minutos; Volume do reator: 1,8L;	2,0% (m v <sup>-1</sup> ); 0,5% de ácido sulfúrico na amostra;	Lipídios 46%	-	(LEE; OH; HAN, 2019)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Venturi com garganta área 80 mm <sup>2</sup>	Pressão de entrada 5 Bar Número de cavitação 0,1	BM seca com a adição de hexano e metanol (1: 2,32 v/v); Conc. 7,3% (m v <sup>-1</sup> );	Lipídios 44,9%	0,8 MJ kg <sup>-1</sup> de BM <sub>seca</sub>	(SETYAWAN et al., 2020)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Placa com 27 orifícios e Ø 1 mm cada	Pressão de entrada: 3 Bar; Número de cavitação: 2,43; Tempo: 20 minutos; Volume do reator: 1,6 L;	2% (m v <sup>-1</sup> ); Adição de peróxido de hidrogênio e cloreto férrico, pH ácido;	Lipídios 77,4% Pigmentos 97,2%	-	(LEE; HAN, 2021)

Além da etapa do rompimento celular, os reatores de cavitação hidrodinâmica podem ser utilizados com solventes para extração dos compostos de interesse. Lee e Han (2015) verificaram que a adição de hexano na proporção de 1:0,8 (biomassa úmida: hexano) aumentou em 28% a extração de lipídios, quando comparado com o rompimento nas mesmas condições sem a adição de solvente. Já Setyawan et al. (2020) obtiveram um consumo de energia de 0,8 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca para extração de lipídios *Nannochloropsis sp.* com a adição de hexano e metanol. Assim, os reatores de cavitação hidrodinâmica permitem a realização de duas operações unitárias de forma simultânea, gerando uma economia de energia, além de eliminar a necessidade de aquisição de reatores de extração.

Segundo Yap et al. (2015) a escolha de um método de rompimento deve atender aos seguintes critérios: ser altamente eficiente em termos energéticos; curto tempo de residência; e causar degradação mínima do produto. Dessa forma, o uso desse método em biorrefinarias é bastante promissor, principalmente para extração de proteínas de microalgas. Lee et al. (2015) verificaram que o tratamento com cavitação hidrodinâmica danificou apenas a camada externa de polissacarídeos, mantendo o corpo da célula intacto em *Tetraselmis suecica*. Em métodos de rompimento mais agressivos há a interação das proteínas solúveis com a matriz intracelular e outros componentes, que torna a proteína insolúvel, e como consequência leva à redução nos teores de proteína extraídas (POSTMA et al., 2015).

Destaca-se que a extração das proteínas antes da extração de lipídios é uma estratégia para agregar valor, já que o preço das proteínas é oito vezes maior que o preço de mercado do óleo de microalgas (BARSANTI; GUALTIERI, 2018b). Também há possíveis ganhos energéticos, já que a extração de lipídios a partir da biomassa desproteïnizada reduz a estabilidade da emulsão e facilita a recuperação de solventes (AMORIM et al., 2020b).

Para a geração das microbolhas cativantes, é necessário aplicar uma pressão de entrada entre 2 e 10 Bar (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; LEE; HAN, 2015). Essas pressões podem ser geradas por uma infinidade de bombas centrífugas disponíveis no mercado, o que facilita a instalação desse sistema em biorrefinarias a um custo baixo.

Ainda não há equipamentos comercializados com a finalidade do rompimento do envoltório celular das microalgas. Porém, há algumas patentes registradas com essa finalidade, embora represente apenas 3% das patentes registradas que utilizam o princípio da cavitação hidrodinâmica para diversos usos (Figura 3.6). O surgimento de novas patentes nos últimos anos, para o rompimento de microalgas utilizando a cavitação hidrodinâmica, demonstra que essa tecnologia tem evoluído, e combinado novas ideias com o conhecimento científico.

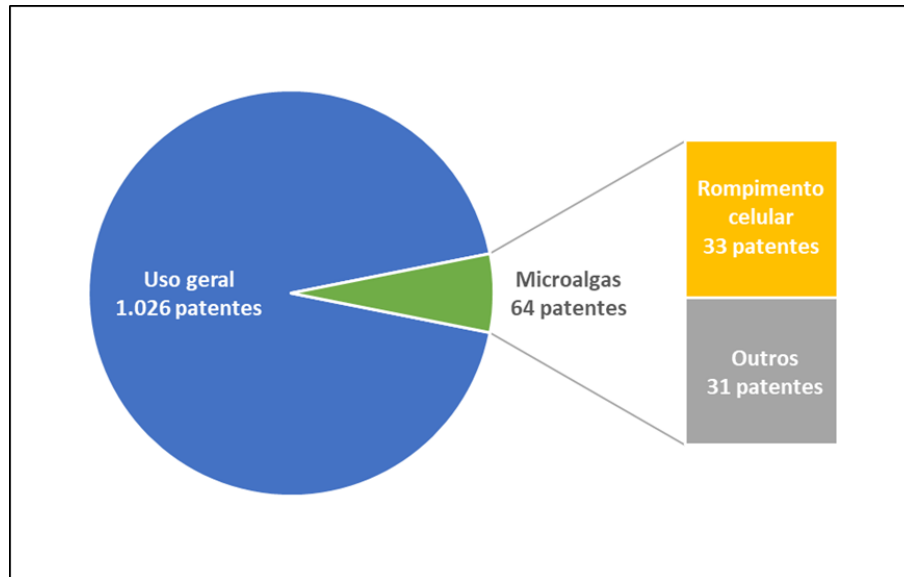


Figura 3.6: Patentes que utilizam o princípio da cavitação hidrodinâmica. Consulta ao banco de dados do WIPO (Organização Mundial de Propriedade Intelectual) em 27 de novembro de 2020

### 3.5.3. Desafios do uso de cavitação hidrodinâmica em biorrefinarias de microalgas

Embora apresente vantagens, o uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento da parede celular de microalgas apresenta alguns desafios. Mais estudos devem ser realizados para otimização do dispositivo de cavitação, no intuito de aumentar a eficiência de rompimento e reduzir o consumo de energia. O CFD (Dinâmica dos Fluidos Computacional) pode ser utilizada como ferramenta para simular o escoamento do fluido pelo dispositivo de cavitação. Porém, até o momento apenas Lee *et al.* (2019) fizeram simulações com dispositivos para rompimento celular de microalgas.

A possibilidade do uso de biomassa com maiores concentrações de sólidos ainda não foi investigada. A máxima concentração utilizada nos trabalhos publicados com microalgas é de 2% ( $\text{m v}^{-1}$ ) (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; LEE; HAN, 2015; LEE; OH; HAN, 2019). Além disso, a influência da viscosidade na eficiência do rompimento, deve ser estudada, já que as características reológicas da biomassa de microalgas dependem da concentração sólidos, e da morfologia e composição do envoltório celular da linhagem (MARTÍNEZ-SANZ *et al.*, 2020).

## 3.6. BIOMASSA RESIDUAL

A biomassa residual obtida após a extração dos lipídios representa de 60 a 85% (em peso seco) da biomassa inicial (PRÉAT *et al.*, 2020). Rocha *et al.* (2020) encontraram 38,03% de proteínas, 2,21% de lipídios e 21,93% de carboidratos após a extração de lipídios de *S. obliquus*. Vidyashankar *et al.* (2015) verificaram que a composição da biomassa

desengordurada de *S. dimorphus* foi 21,57% de proteínas, 1,5% de lipídios e 21,15% de carboidratos.

Os métodos utilizados atualmente para rompimento e extração dos compostos intracelulares a partir da biomassa úmida não apresentam uma eficiência de 100%, assim, parte dos compostos energéticos ficam presos aos fragmentos celulares (GÜNERKEN et al., 2015). Srivastava et al. (2020) verificaram que a biomassa desengordurada de *Chlorella sp.* e *Desmodesmus sp.* contém 36,66 e 29,26% de carbono, respectivamente. Esse resultado indica que 30 a 40% do conteúdo de carbono foi extraído, pois o teor total de carbono nas células de microalga é de aproximadamente 50% (CHEAH et al., 2015).

Parte do carbono presente na biomassa residual são os carboidratos estruturais da parede celular. Cheng et al. (2015) observaram em estudo com microalgas do gênero *Chlorella*, que a biomassa da parede celular representava 46,3% da biomassa total para *C. vulgaris*, 50,4% para *C. sorokiniana*, 50,3% para *C. minutissima* e 49,6% para *C. variabilis*, composta basicamente de mono e polissacarídeos dos grupos (ácido urônico, açúcares neutros e amino açúcar). Dessa forma, os teores de carbono presentes na biomassa residual possibilitam a recuperação de energia por meio da fermentação, para produção de etanol (NGAMSIRISOMSAKUL et al., 2019) e digestão anaeróbia, para produção de metano (GANESH SARATALE et al., 2018).

Na produção de etanol, a biomassa desengordurada é hidrolisada para conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentáveis. Há vários métodos que podem ser utilizados, tais como: ultrassom, enzimático, químico e hidrotérmico (NGAMSIRISOMSAKUL et al., 2019). Já a fermentação é feita por microrganismos, geralmente leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (KUMAR et al., 2016; NGAMSIRISOMSAKUL et al., 2019; SANCHEZ RIZZA et al., 2017). Kumar et al. (2016) obtiveram um rendimento de 13,2% ( $\text{m m}^{-1}$ ) de etanol, a partir de *C. vulgaris*. Enquanto Sanchez Rizza et al. (2017) obtiveram um rendimento de 24% ( $\text{m m}^{-1}$ ) de etanol, a partir de *Desmodesmus sp.* Hossain et al. (2019) obtiveram um balanço energético positivo, em estudo de avaliação do ciclo de vida da produção de etanol a partir de *C. vulgaris* em um cenário com produção de 220 toneladas ano<sup>-1</sup>. Embora os trabalhos apontem para ótimos rendimentos de etanol, são necessárias mais pesquisas quanto ao uso da biomassa residual para produção de etanol, assim como, uma melhor avaliação da energia necessária para o processo.

A digestão anaeróbia é uma outra estratégia para recuperar energia a partir da biomassa residual. O biogás produzido pode ser utilizado para produção de calor ou energia a ser utilizada na biorrefinaria (KENDIR; UGURLU, 2018). Ehimen et al. (2009) conseguiram recuperar 8,7 a 10,5 MJ kg<sup>-1</sup> de BM seca, referente a produção de metano a partir da biomassa desengordurada de *Chlorella*. Utilizando o glicerol para co-digestão com a biomassa residual, a recuperação de

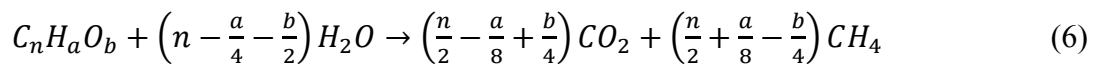
energia aumentou para 9,1 a 11,3 MJ kg<sup>-1</sup> de BM seca. Devido a grande importancia da digestão anaerobia para recuperação de recursos em uma biorrefinaria de microalgas, na sequencia será apresentada algumas considerações sobre essa tecnologia.

### 3.7. DIGESTÃO ANAERÓBIA DA BIOMASSA RESIDUAL

A digestão anaeróbia é uma tecnologia promissora para recuperação de energia, água, nutrientes e carbono da biomassa residual das microalgas. É um processo bem estabelecido e utilizado de forma extensiva para o tratamento de vários tipos de efluentes, além disso apresenta um reduzido consumo de energia, e facilidade de implantação e operação (KENDIR; UGURLU, 2018).

A digestão anaeróbia consiste na degradação de moléculas orgânicas complexas em ácidos orgânicos e biogás, e ocorre em 4 etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (CHEN et al., 2014). O biogás produzido consiste principalmente em CH<sub>4</sub> (55-70%) e CO<sub>2</sub> (30-45%) (GANESH SARATALE et al., 2018), e pode ser utilizado para geração de calor e eletricidade a serem consumidas na biorrefinaria, além da possibilidade de uso como biocombustível em substituição ao gás natural, após a purificação (> 90% de CH<sub>4</sub>) (BOSE et al., 2019).

O rendimento empírico de metano produzido a partir de uma biomassa pode ser calculado pela equação de Buswell (BUSWELL; MUELLER, 1952) (Equação 3.6).



A produção de metano a partir da biomassa das microalgas varia entre 0,05 a 0,8 L CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> de SV (BRIGAGÃO et al., 2019). Esses valores são menores quando comparados aos rendimentos teóricos, devido à recalitrância da parede celular e da amônia liberada em razão da baixa relação entre carbono e nitrogênio (C:N) nas células das microalgas (NEVES; SALES; PERELO, 2016).

A complexidade da parede celular dificulta a etapa de hidrólise, sendo necessário o rompimento para aumentar a digestibilidade e facilitar a ação dos microrganismos (KENDIR; UGURLU, 2018). Assim, vários métodos visando a ruptura das paredes celulares de microalgas inteiras foram investigados, incluindo o tratamento mecânico, térmico, ultrassônico, micro-ondas, químico e enzimático (CÓRDOVA et al., 2018; GRUBER-BRUNHUMER et al., 2016; MARTÍN JUÁREZ et al., 2018; SOLÉ-BUNDÓ et al., 2017).

Em uma biorrefinaria, o processo de extração de lipídios pode ser considerado como um pré-tratamento da biomassa para a digestão anaeróbia. O dano causado na parede celular

durante o rompimento e extração dos compostos intracelulares, já é suficiente para obter um rendimento de metano maior que a biomassa sem tratamento (NEVES; SALES; PERELO, 2016). Alzate et al. (2014) verificaram que a produtividade de metano foi maior com a biomassa de *Nannochloropsis* desengordurada, quando comparada com a biomassa sem extração de lipídios, utilizando o tratamento térmico. Já Hernández et al. (2014) obtiveram rendimentos de metano de 0,203 e 0,206 L CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> de SV para biomassa desengordurada de *Tetraselmis sp.* e *S. almeriensis*, respectivamente. Esse rendimento foi 20 a 25% maior quando comparado com a biomassa sem extração de lipídios.

No entanto, o rendimento de metano a partir da biomassa desengordurada é baixo, devido a remoção de parte dos lipídios, que é o composto responsável pela maior produção de metano, com um rendimento teórico de 1,014 L CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> de SV de lipídios (KENDIR; UGURLU, 2018). Outro fator que contribui com o baixo rendimento é a redução da razão C:N, que apresentam valores abaixo de 6:1 (SOLÉ-BUNDÓ et al., 2017). Sendo que a razão ideal de C:N para digestão anaeróbia é de 20:1 a 30:1 (RAHEEM et al., 2018). Assim, a co-digestão com resíduos agrícolas é uma estratégia para aumentar o teor de carbono, além de melhorar o rendimento de metano (SRIVASTAVA et al., 2020).

A extração de proteínas é uma estratégia para reduzir os teores de nitrogênio na biomassa residual, tornando-a com uma composição mais favorável para digestão anaeróbia (KENDIR; UGURLU, 2018). As proteínas representam uma parcela significativa da biomassa de microalgas, e é encontrada em diferentes partes da célula como citoplasma, organelas, plastídios, parede celular e núcleo (AMORIM et al., 2020a). A extração dessas proteínas antes ou após a extração de lipídios, é uma estratégia promissora para agregar valor, já que o preço desse produto é oito vezes maior que o preço de mercado do óleo de microalgas (BARSANTI; GUALTIERI, 2018b).

Klassen et al. (2017) verificaram maior produtividade de metano quando utilizou biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* com baixos teores de proteínas. Já Wu et al. (2020) observaram um aumento significativo na razão C:N após a extração de proteínas da biomassa de *Chlorella sp.*, além de obter um maior rendimento de metano quando comparado com o tratamento controle. Ramos-Suárez e Carreras (2014) também obtiveram rendimento de metano maior com a digestão anaeróbia da biomassa desproteïnizada de *Scenedesmus*. O rendimento (0,273 L CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> de SV) foi duas vezes maior que o rendimento de metano da biomassa bruta. Os melhores rendimentos de metano obtidos a partir da biomassa desengordurada e desproteïnizada, quando comparada com a biomassa bruta, reforça a ideia de que a digestão

anaeróbia da biomassa residual é uma alternativa viável para recuperar a energia, nutrientes, carbono e água.

### 3.7.1. Efeito inibitório dos solventes utilizados para extração de lipídios

Conforme discutido na seção anterior, a extração de lipídios aumenta a digestibilidade da biomassa, mas dependendo do solvente utilizado no processo de extração, a produção de metano pode ser inibida (NEVES; SALES; PERELO, 2016). A extração por solvente orgânico é o método mais utilizado para extrair lipídios a partir da biomassa úmida (KHOO et al., 2020). Dentre os inúmeros solventes propostos, destaca-se o uso do: clorofórmio, metanol, etanol, isopropanol, butanol, hexano, 2-MeTHF, CPME, MtBE, acetato de etila e tolueno (ANGLES et al., 2017; DE JESUS et al., 2019; KHOO et al., 2020).

Após a extração dos lipídios, o extrato contendo solvente e óleo é separado da biomassa úmida residual. Assim, é possível que o resíduo contenha traços do solvente, que pode afetar a produção de metano. Uggetti et al. (2014) sugerem que os efeitos inibidores do solvente podem ser reduzidos por uma etapa de enxágue para remover o solvente tóxico da biomassa, porém essa etapa aumentaria o custo com tratamento da água residuária além do maior consumo de energia.

Durante a etapa da acidogênese, as bactérias fermentativas convertem açúcares, aminoácidos e ácidos graxos, em ácidos orgânicos (por exemplo, ácido acético, propiônico, fórmico, láctico, butírico ou succínico), álcoois e cetonas (por exemplo, etanol, metanol, glicerol e acetona), acetato, dióxido de carbono e hidrogênio, que serão fornecidos como substratos para as bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas (CHEN et al., 2014). Assim, os solventes dos grupos dos álcoois e cetonas, além do acetato de etila podem contribuir positivamente com o rendimento de metano, porém, depende da concentração do solvente no substrato (LETTINGA, 1995). Um exemplo disso é o metanol, que em baixas concentrações é convertido diretamente em metano pelas arqueias metanogênicas, já em altas concentrações há um aumento da atividade acetogênica, reduzindo a eficiência do reator (LETTINGA, 1995).

Os solventes halogenados são fortes inibidores da atividade metanogênica. Dentre eles destaca-se o clorofórmio, que é amplamente estudado e apresenta efeito inibitório em concentrações acima de  $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ , e o diclorometano que apresenta efeito inibitório em concentrações acima de  $3,9 \text{ mg L}^{-1}$  (CHEN et al., 2014). Markou et al. (2020) verificaram uma baixa produção de metano devido a inibição temporária da atividade metanogênica, causada por traços de clorofórmio na biomassa, durante a digestão anaeróbia de *C. vulgaris*. Yun et al. (2014) verificaram que o clorofórmio exerceu um maior efeito inibitório sobre a produção de

CH<sub>4</sub> em comparação com a produção de H<sub>2</sub>. O clorofórmio inibe a atividade metanogênica mesmo em baixas concentrações, e as bactérias acidogênicas e redutoras de sulfato também podem ser inibidas pelo solvente (YUN et al., 2014). Ehimen et al. (2009) também verificaram que não houve produção de metano devido à inibição da atividade metanogênica no reator, causada pela mistura de clorofórmio e metanol utilizada no processo de extração de lipídios.

Dentre os solventes orgânicos, o hexano se destaca para extração de lipídios em biorrefinarias, devido sua alta seletividade e baixa toxicidade, possibilitando o uso da biomassa residual como fonte de alimento (MARTIN, 2016). Porém, Yun et al. (2016) verificaram que concentrações de *n*-hexano acima de 4 g DQO L<sup>-1</sup> afetou o rendimento de metano na digestão anaeróbia de *C. vulgaris*. Também foi observado um aumento das bactérias redutoras de sulfato e sintróficas, enquanto houve uma redução drástica das arqueias metanogênicas, à medida que a concentração de *n*-hexano aumentou (YUN et al., 2016).

É necessário a realização de mais estudos para determinar as concentrações limites dos solventes, para não inibir a atividade metanogênica. Além disso, é necessário selecionar microrganismos tolerantes às substâncias inibitórias, e incorporar métodos mais eficientes para remover os solventes da biomassa residual, com baixo custo energético (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008).

### **3.7.2. Métodos utilizados para avaliar a produção de metano**

O potencial de uso da biomassa residual de microalgas na digestão anaeróbia pode ser avaliado por meio de bioensaios, como a Atividade Metanogênica Específica (AME) e o Potencial Bioquímico de Metano (BMP, sigla em inglês). Nesses testes o metano é determinado para avaliar a biodegradabilidade anaeróbia e o potencial energético da biomassa (HOWELL; BENNETT; MATERIC, 2019).

A AME pode ser definida como a capacidade máxima de produção de metano por microrganismos anaeróbios, realizada em condições controladas, para viabilizar a conversão de substratos orgânicos a biogás (AQUINO et al., 2007). Esse teste é importante para controle operacional dos reatores anaeróbios, pois permite estimar a carga orgânica máxima a ser aplicada. Além disso, também pode ser usado para avaliar o desempenho da biomassa residual na presença de compostos inibidores, e também observar mudanças nas atividades dos microrganismos (AQUINO et al., 2007; HUSSAIN; DUBEY, 2017; LOZANO et al., 2009).

Para garantir que o máximo de compostos orgânicos biodegradáveis sejam convertidos a metano, é adicionado em excesso, os nutrientes e substrato composto por acetato, glicose ou ácidos orgânicos intermediários (ácido acético, propiônico e butírico) (AQUINO et al., 2007;

HUSSAIN; DUBEY, 2017). A AME é calculada a partir taxa máxima de produção de metano, obtida no ponto de maior inclinação da curva de produção acumulada. Neste ponto o consumo de substrato deve ser de no mínimo 50% (AQUINO et al., 2007). O resultado da AME refere-se a taxa diária de produção de metano, expresso em equivalentes de DQO, por unidade de massa de sólidos suspensos voláteis ( $\text{gDQO}_{\text{CH}_4} \text{ gSSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) (HUSSAIN; DUBEY, 2017). É importante destacar que nesse método não há consenso quanto as condições operacionais de: concentração inicial, concentração do substrato, quantidade de inóculo, tempo do teste e a necessidade de agitação (AQUINO et al., 2007; HUSSAIN; DUBEY, 2017).

Já o BMP é um método utilizado rotineiramente para avaliar o rendimento máximo de a partir de um substrato específico, e realizado em escala laboratorial (HOLLIGER et al., 2016a). É um parâmetro importante para avaliação de diferentes composições de substratos e do efeito dos métodos de pré-tratamento (JUSTESEN et al., 2019). Os resultados do BMP são apresentados como o volume de gás metano produzido por massa de sólidos voláteis do substrato ( $\text{L CH}_4 \text{ kg}^{-1}$  de SV) (HOLLIGER et al., 2016a). Assim como o AME, não há padronização das condições para realização do teste, o que dificulta a comparação entre resultados.

Há diferentes métodos para a medição do biogás produzido nos testes AME e BMP. O método volumétrico se baseia no deslocamento volumétrico do gás para um recipiente externo, mantendo a pressão constante. Esse método permite a utilização de um sistema para remoção de  $\text{CO}_2$ , com o uso de uma solução alcalina, para quantificar apenas o volume do metano (AQUINO et al., 2007). Já o método manométrico realiza medições de acúmulo de pressão no headspace, com um volume fixo. Geralmente faz uso de instrumentos calibrados para obtenção dos resultados (JUSTESEN et al., 2019). Enquanto a composição do gás é obtida por cromatografia gasosa (HOLLIGER et al., 2016a). Outra alternativa, é o uso de métodos gravimétricos, que determina a perda de massa da amostra devido a liberação do biogás (JUSTESEN et al., 2019).

Na Tabela 3.6 apresenta-se um levantamento dos trabalhos mais recentes sobre digestão anaeróbia da microalga, e os métodos utilizados para avaliar a biodegradabilidade da biomassa, assim como as condições operacionais.

Tabela 3.6: Descrição e condições operacionais dos métodos utilizados em trabalhos com a digestão anaeróbia da biomassa de microalgas.

Método	Substrato	Inóculo	Reator	Condições operacionais	Medição do gás	Referência
BMP	Biomassa de <i>Chlorella sp.</i> e <i>Scenedesmus sp.</i>	Razão inóculo substrato: 2 com base nos SV Pré-incubado a 37°C por 13 dias	Frasco de vidro: 120 mL Volume útil 80mL Septo de borracha Purgado com N <sub>2</sub> puro	Mesofílica (37°C) Agitação manual antes de cada medição Tempo: 42 dias	Volume: Manômetro Composição: CG	(AVILA et al., 2021)
BMP	Biomassa de <i>Chlorella sp.</i> desproteïnizada	Razão inóculo substrato: 2 com base nos SV	Frasco de vidro: 600 mL Volume útil 450 mL Septo de borracha Purgado com N <sub>2</sub> puro	Mesofílica (37°C) agitação periódica 100 rpm (1 min ligado, 4 min desligado) Tempo: 25 dias	Determinação automática utilizando o sistema AMPTS® II	(WU et al., 2020)
BMP	Biomassa de microalga desengordurada	Razão inóculo substrato: 2 com base nos SV	Frasco de vidro: 250 mL Volume útil 100mL Septo de borracha	Mesofílica (35°C) Agitação 150 rpm Concentração 10mg de DQO/L Tempo: 40 dias	Composição: CG	(SPOSOB et al., 2020)
BMP	Biomassa de <i>Chlorella sp.</i> e palha de trigo	Razão inóculo substrato: 1 com base nos SV Pré-incubado a 35°C por 5-7 dias	Frasco de vidro: 160 mL Volume útil 100 mL Septo de borracha Purgado com N <sub>2</sub> puro	Mesofílica (37°C) Agitação 90 rpm Concentração 4g de SV/L Tempo: 100 dias	Volume: Manômetro Composição: CG	(SOLÉ-BUNDÓ et al., 2017)
BMP	Biomassa com várias espécies de microalgas	Razão inóculo substrato: 2 com base nos SV	Frasco de vidro: 300 mL Volume útil 100 mL Septo de borracha Purgado com gás hélio	Mesofílica (37°C) Mesa rotativa com mistura constante Tempo: 45 dias	Volume: Manômetro Composição: CG	(MARTÍN JUÁREZ et al., 2018)
BMP	Biomassa de <i>C. vulgaris</i>	Razão inóculo substrato: 2 com base nos SV	Frasco de polietileno: 500 mL Volume útil 100 mL	Mesofílica (35°C) Agitação manual uma vez por dia	Volume: seringa contendo solução 3M de NaOH	(MARKOU et al., 2020)

A maioria dos trabalhos com microalgas utiliza o BMP como método para determinar o potencial de produção de metano da biomassa. Esse método tem como vantagem a facilidade de adequação à estrutura e aos materiais geralmente disponíveis nos laboratórios, além de apresentar o resultado direto do potencial de recuperação da energia da biomassa (JUSTESEN et al., 2019).

Conforme proposto por Holliger et al. (2016), para que um resultado de teste de PMB seja aceito e possa ser reproduzido, algumas recomendações sobre o inóculo, substrato, configuração do teste e análise de dados devem ser seguidas. Abaixo é apresentado um resumo das recomendações com adequação para o uso com microalgas:

- *Inóculo*: deve ser retirado de um digestor anaeróbio ativo que está digerindo matéria orgânica complexa, preferencialmente em estado estacionário. Isso fornece uma comunidade microbiana altamente diversa. A produção endógena de metano deve ser inferior a 20%. O inóculo deve ser usado o mais rápido possível, e pode ser armazenado à temperatura ambiente por no máximo 5 dias. A relação de inóculo para substrato deve ser de 2 a 4, em relação aos sólidos voláteis.
- *Temperatura*: deve ser a mesma temperatura de operação do digestor do inóculo. As temperaturas de incubação típicas são 37 e 55°C, mesofílica e termofílica, respectivamente, com variações máximas de  $\pm 2$  °C. O resfriamento durante a medição do gás deve ser evitado.
- *Substrato*: o preparo deve ser mínimo para evitar alterações nas propriedades e digestibilidade do material. Devem utilizar a biomassa preferencialmente úmida e fresca, pois a secagem e o congelamento/descongelamento da biomassa de microalgas podem afetar os resultados do BMP.
- *Análises*: Os sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), pH, ácidos graxos voláteis, nitrogênio total e amoniacal, e alcalinidade, são parâmetros importantes para a análise do substrato e do inóculo.
- *Configuração do ensaio*: os ensaios devem ser realizados pelo menos em triplicata. Reatores com volumes menores ( $\cong 100$  mL) podem ser utilizados para amostras homogêneas. O volume do *headspace* (espaço superior para acúmulo do gás) deve ser de aproximadamente 50% do volume do frasco. Os frascos devem ser fechados com septos de borracha que permita serem perfurados várias vezes sem perda de gás. Antes de vedar, a amostra deve ser purgada com nitrogênio gasoso ou gás hélio.
- *Concentração*: a concentração total no reator deve ser entre 10 a 60 g L<sup>-1</sup> de SV.

- *Controle positivo*: o ensaio do controle positivo pode ser realizado com a adição de produtos comerciais como a celulose microcristalina e a tributirina. A concentração de SV deverá ser a mesma dos demais tratamentos. O controle positivo apresentará o BMP teórico para as condições dos ensaios.
- *Ensaio em branco*: o ensaio em branco deve ser realizado para verificar a produção endógena de metano do inóculo. Nesse ensaio é adicionado no reator apenas o inóculo e água deionizada, para ajuste da concentração de SV.
- *Agitação*: a agitação manual pelo menos uma vez por dia para evitar a formação de espuma é suficiente na maioria dos casos. Se optar por ensaios com agitação, a rotação deve ser baixa e pode ser intermitente ou não.
- *Medição do gás*: a produção de metano pode ser medida por diferentes técnicas (métodos volumétricos, manométricos e gravimétrica). A composição do gás deve ser medida regularmente por cromatografia gasosa ou por técnicas volumétricas que aprisiona o CO<sub>2</sub> em solução alcalina, e quantifica apenas o volume de CH<sub>4</sub>.
- *Duração do teste*: os testes só devem ser encerrados quando a produção diária de metano durante três dias consecutivos for < 1% do volume acumulado de metano.
- *Análise e apresentação dos dados*: os resultados devem ser normalizados para as condições Normais de Temperatura e Pressão e é expresso como o volume de gás metano seco produzido por massa de sólidos voláteis do substrato adicionado (NL CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> de SV). O BMP do substrato e do controle positivo são determinados subtraindo a produção de metano dos brancos da produção bruta de metano dos ensaios de substrato / controle positivo.
- *Nutrientes*: O inóculo já é fonte de nutrientes, assim não há a necessidade de adição de solução de nutrientes.

### 3.8. DESAFIOS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Como base nessa revisão, foi possível observar o crescente interesse nas microalgas para produção de biocombustíveis e alimentos, principalmente a partir de espécies do filo Chlorophyta. Porém, a produção de biocombustíveis de microalgas ainda não é viável devido aos custos de produção e consumo de energia. Os principais custos de produção de biocombustíveis, concentra-se no cultivo da biomassa, com o fornecimento de nutrientes, carbono e tratamento da água (BARSANTI; GUALTIERI, 2018b). Em relação ao consumo de

energia, é possível uma redução considerável com a otimização dos processos de rompimento celular e extração dos lipídios.

A cavitação hidrodinâmica é uma alternativa para o rompimento celular, devido ao baixo custo de implantação e baixo consumo de energia. Porém são necessárias mais pesquisas para avaliar a eficiência do método de rompimento para extração de lipídios e proteínas. A extração das proteínas é uma estratégia para agregar valor à cadeia de produção de biocombustíveis. Além disso, se extraída antes dos lipídios, reduz o consumo de energia, e melhora o rendimento de metano na digestão anaeróbia da biomassa.

A digestão anaeróbia da biomassa desengordurada e desproteïnizada possibilita a recuperação de energia, nutrientes, carbono e água. Esses recursos serão retornados para o cultivo, contribuindo com a redução dos custos operacionais. Já o biogás produzido, pode ser utilizado para geração de calor na recuperação dos solventes da etapa de extração.

O solvente utilizado para a extração dos lipídios, pode interferir na atividade metanogênica da digestão anaeróbia. Assim, são necessários mais estudos em relação aos efeitos positivos ou negativos dos solventes. É importante que os estudos sejam realizados em reatores com alimentação contínua, para avaliar a capacidade de adaptação da comunidade microbiana às variações nas concentrações de solventes.

O balanço de massa e energia é uma ferramenta importante para otimizar e avaliar os processos de uma biorrefinaria. Porém, os dados utilizados, que geralmente são obtidos em escala laboratorial, podem mascarar os resultados.

### **3.9. CONCLUSÃO**

Para superar os desafios da produção de biocombustíveis de microalgas em escala industrial, o processo *downstream* deve ser otimizado para reduzir o custo de produção, consumo de energia e aumentar a eficiência dos processos. Outra estratégia que deve ser adotada é a extração das proteínas, para agregar valor à cadeia de produção de biocombustíveis, além de contribuir com a redução no consumo de energia. Além disso, a digestão anaeróbia da biomassa residual, permite a recuperação de nutrientes, água e carbono, e geração de energia a ser utilizada na biorrefinaria.

### 3.10. REFERÊNCIAS

- ABBASI, E. et al. A novel method for optimization of slit Venturi dimensions through CFD simulation and RSM design. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 67, p. 105088, 1 out. 2020.
- ABDULGADER, M. et al. Process analysis and optimization of single stage flexible fibre biofilm reactor treating milk processing industrial wastewater using response surface methodology (RSM). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 149, p. 169–181, 1 set. 2019.
- ABU-SHAMLEH, A.; NAJJAR, Y. S. H. Optimization of mechanical harvesting of microalgae by centrifugation for biofuels production. **Biomass and Bioenergy**, v. 143, p. 105877, dez. 2020.
- AFIFY, A. E.-M. M. R. et al. Scenedesmus obliquus: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 399–408, dez. 2018.
- AKEPACH, P. et al. Bioaccessibility of carotenoids ( $\beta$ -carotene and lutein) from intact and disrupted microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii*). **LWT**, v. 160, p. 113292, abr. 2022.
- ALFONSI, K. et al. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. **Green Chem.**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 2008.
- ALHATTAB, M.; KERMANSHAHI-POUR, A.; BROOKS, M. S.-L. Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 61–88, 4 fev. 2019.
- ALVAREZ, A. L. et al. Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. **Algal Research**, v. 54, p. 102200, abr. 2021.
- ALZATE, M. E. et al. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 488–494, nov. 2012.
- ALZATE, M. E. et al. Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 405–410, 1 maio 2014.
- AMORIM, M. L. et al. **Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. Critical Reviews in Food Science and Nutrition** Taylor and Francis Inc., , 2020a. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=bfsn20>>. Acesso em: 9 nov. 2020
- AMORIM, M. L. et al. Extraction of proteins from the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 followed by lipid extraction of the wet deproteinized biomass using hexane and ethyl acetate. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123190, 1 jul. 2020b.
- AMORIM, M. L. et al. Pilot-scale biorefining of *Scenedesmus obliquus* for the production of lipids and proteins. **Separation and Purification Technology**, v. 270, p. 118775, set. 2021.

- ANDERSEN, R. **Algal culturing techniques**. China: Elsevier, 2005.
- ANDERSSON, V. et al. Integration of algae-based biofuel production with an oil refinery: Energy and carbon footprint assessment. **International Journal of Energy Research**, v. 44, n. 13, p. 10860–10877, 25 out. 2020.
- ANGLES, E. et al. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening. **Algal Research**, v. 21, p. 27–34, 1 jan. 2017.
- ANSARI, F. A. et al. Exploration of Microalgae Biorefinery by Optimizing Sequential Extraction of Major Metabolites from *Scenedesmus obliquus*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 12, p. 3407–3412, 29 mar. 2017.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23th. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
- AQUINO, S. F. et al. Methodologies for determining the specific methanogenic activity (SMA) in anaerobic sludges. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.
- ARABIAN, D. Optimization of cell wall disruption and lipid extraction methods by combining different solvents from wet *Chlorella vulgaris*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 99, n. 7, p. 569–583, 1 jul. 2022.
- ASTON, J. E. et al. Application of aqueous alkaline extraction to remove ash from algae harvested from an algal turf scrubber. **Algal Research**, v. 35, p. 370–377, 1 nov. 2018.
- AVELAR AMADO, P. et al. Assessment of allelopathic, cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Smilax brasiliensis* Sprengel leaves. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 192, p. 110310, 1 abr. 2020.
- AVILA, R. et al. Biodegradation of hydrophobic pesticides by microalgae: Transformation products and impact on algae biochemical methane potential. **Science of the Total Environment**, v. 754, p. 142114, 1 fev. 2021.
- BALASUNDARAM, B.; PANDIT, A. B. Significance of location of enzymes on their release during microbial cell disruption. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 607–614, 5 dez. 2001.
- BALASUNDARAM, B.; SKILL, S. C.; LLEWELLYN, C. A. A low energy process for the recovery of bioproducts from cyanobacteria using a ball mill. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 48–56, 15 dez. 2012.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable ? **Algal Research**, v. 31, n. February, p. 107–115, 2018a.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable?** **Algal Research** Elsevier B.V., , 1 abr. 2018b.
- BATES, R. L.; FONDY, P. L.; CORPSTEIN, R. R. Examination of Some Geometric Parameters of Impeller Power. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, v. 2, n. 4, p. 310–314, 1 out. 1963.

- BAUDELET, P. H. et al. **A new insight into cell walls of Chlorophyta.** *Algal Research* Elsevier B.V., , 1 jul. 2017.
- BECKER, B.; MELKONIAN, M.; KAMERLING, J. P. THE CELL WALL (THECA) OF TETRASELMIS STRIATA (CHLOROPHYTA): MACROMOLECULAR COMPOSITION AND STRUCTURAL ELEMENTS OF THE COMPLEX POLYSACCHARIDES. *Journal of Phycology*, v. 34, n. 5, p. 779–787, out. 1998.
- BENEMANN, J. R.; WOERTZ, I.; LUNDQUIST, T. Autotrophic Microalgae Biomass Production: From Niche Markets to Commodities. *Industrial Biotechnology*, v. 14, n. 1, p. 3–10, 1 fev. 2018.
- BIGELOW, T. A. et al. Lysis of Chlamydomonas reinhardtii by high-intensity focused ultrasound as a function of exposure time. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 21, n. 3, p. 1258–1264, 2014.
- BILLER, P.; ROSS, A. B. Pyrolysis GC-MS as a novel analysis technique to determine the biochemical composition of microalgae. *Algal Research*, v. 6, n. PA, p. 91–97, 1 out. 2014.
- BOHUTSKYI, P. et al. Production of lipid-containing algal-bacterial polyculture in wastewater and biomethanation of lipid extracted residues: Enhancing methane yield through hydrothermal pretreatment and relieving solvent toxicity through co-digestion. *Science of The Total Environment*, v. 653, p. 1377–1394, fev. 2019.
- BOSE, A. et al. **How to optimise photosynthetic biogas upgrading: a perspective on system design and microalgae selection.** *Biotechnology Advances* Elsevier Inc., , 1 dez. 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRADOW, J. M.; CONNICK, W. J. SEED-GERMINATION INHIBITION BY VOLATILE ALCOHOLS AND OTHER COMPOUNDS ASSOCIATED WITH Amaranthus palmeri RESIDUES 1. *Journal of Chemical Ecology*, v. 14, n. 7, 1988.
- BRASIL. **Regras para Análise de Sementes — Ministério da Agricultura e Pecuária.** , 2009. Disponível em: <[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946\\_regras\\_analise\\_\\_sementes.pdf/view](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf/view)>. Acesso em: 27 jan. 2023
- BRIGAGÃO, G. V. et al. Upstream and downstream processing of microalgal biogas: Emissions, energy and economic performances under carbon taxation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 112, p. 508–520, 1 set. 2019.
- BRITO, G. F. DA S. et al. Evaluation of advanced oxidative processes in biodiesel wastewater treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 375, p. 85–90, 15 abr. 2019.
- BUSWELL, A. M.; MUELLER, H. F. Mechanism of Methane Fermentation. *Industrial & Engineering Chemistry*, v. 44, n. 3, p. 550–552, mar. 1952.

- CAPORGNO, M. P.; MATHYS, A. Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, p. 58, 31 jul. 2018.
- CARPENTER, J.; GEORGE, S.; SAHARAN, V. K. Low pressure hydrodynamic cavitating device for producing highly stable oil in water emulsion: Effect of geometry and cavitation number. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 116, p. 97–104, 1 jun. 2017.
- CARRILLO-REYES, J. et al. Thermophilic biogas production from microalgae-bacteria aggregates: biogas yield, community variation and energy balance. **Chemosphere**, v. 275, p. 129898, 1 jul. 2021.
- CARVALHO, J. C. DE et al. Bioresource Technology Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels , food , and feed. **Bioresource Technology**, v. 300, n. December 2019, p. 122719, 2020.
- CESÁRIO, C. DO C. et al. Biochemical and morphological characterization of freshwater microalga *Tetrademus obliquus* (Chlorophyta: Chlorophyceae). **Protoplasma**, v. 259, n. 4, p. 937–948, 13 jul. 2022.
- CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Harvesting microalgae by flocculation–sedimentation. **Algal Research**, v. 13, p. 271–283, jan. 2016.
- CHEAH, W. Y. et al. Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, maio 2015.
- CHEN, J. L. et al. **Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review**. **Biotechnology Advances** Elsevier Inc., , 1 dez. 2014.
- CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. **Inhibition of anaerobic digestion process: A review**. **Bioresource Technology** Elsevier, , 1 jul. 2008.
- CHENG, P. et al. **High-value chemicals from *Botryococcus braunii* and their current applications – A review**. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2019.
- CHENG, Y.-S.; LABAVITCH, J. M.; VANDERGHEYNST, J. S. Elevated CO<sub>2</sub> concentration impacts cell wall polysaccharide composition of green microalgae of the genus *Chlorella*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2015.
- CHIA, S. R. et al. Analysis of Economic and Environmental Aspects of Microalgae Biorefinery for Biofuels Production: A Review. **Biotechnology Journal**, p. 1700618, 9 fev. 2018.
- CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. **Disruption of microbial cells for intracellular products**. **Enzyme and Microbial Technology** Elsevier, , 1 abr. 1986.
- CÓRDOVA, O. et al. **Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production**. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2018.
- COUPER, J. R. et al. **Chemical Process Equipment - Selection and Design**. Third edit ed. [s.l.] Elsevier Science, 2012.

- CRONMILLER, E. et al. Cell wall integrity signaling regulates cell wall-related gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12204, 21 dez. 2019.
- DASAN, Y. K. et al. Life cycle evaluation of microalgae biofuels production: Effect of cultivation system on energy, carbon emission and cost balance analysis. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 112–128, 20 out. 2019.
- DASTANE, G. G. et al. Single and multiphase CFD simulations for designing cavitating venturi. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 149, p. 1–12, 1 set. 2019.
- DAUD, N. M. et al. Production of biodiesel and its wastewater treatment technologies: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 94, n. C, p. 487–508, 1 mar. 2015.
- DE CARVALHO, J. C. et al. Culture media for mass production of microalgae. In: **Biofuels from Algae**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 33–50.
- DE CARVALHO, J. C. et al. Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels, food, and feed. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122719, mar. 2020.
- DE JESUS, S. S. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents. **Renewable Energy**, v. 143, p. 130–141, 1 dez. 2019.
- DECONINCK, N. et al. **Innovative harvesting processes for microalgae biomass production: A perspective from patent literature**. **Algal Research** Elsevier B.V., , 1 abr. 2018.
- DIONISI, D. et al. Calculation of the potential production of methane and chemicals using anaerobic digestion. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, n. 5, p. 788–801, set. 2018.
- DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 431–440, 1 dez. 2008.
- DU, Y.; SCHUUR, B.; BRILMAN, D. W. F. Maximizing Lipid Yield in *Neochloris oleoabundans* Algae Extraction by Stressing and Using Multiple Extraction Stages with N-Ethylbutylamine as Switchable Solvent. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 28, p. 8073–8080, 19 jul. 2017.
- DUPRAZ, V. et al. Demonstrating the need for chemical exposure characterisation in a microplate test system: toxicity screening of sixteen pesticides on two marine microalgae. **Chemosphere**, v. 221, p. 278–291, abr. 2019.
- EHIMEN, E. A. et al. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 6, p. 371–381, 1 dez. 2009.
- EING, C. et al. Pulsed electric field treatment of microalgae - Benefits for microalgae biomass processing. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 41, n. 10, p. 2901–2907, out. 2013.

- ELERŠEK, T. et al. Electroporation as a Solvent-Free Green Technique for Non-Destructive Extraction of Proteins and Lipids From *Chlorella vulgaris*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 443, 13 maio 2020.
- EPA. **Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.** , 2012. Disponível em: <<https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0154-0025>>
- ESCORSIM, A. M. et al. Extraction of *Acutodesmus obliquus* lipids using a mixture of ethanol and hexane as solvent. **Biomass and Bioenergy**, v. 108, p. 470–478, jan. 2018.
- FALCONÍ, J. H. H. et al. Strain screening and ozone pretreatment for algae farming in wastewaters from sugarcane ethanol biorefinery. **Journal of Cleaner Production**, v. 282, p. 124522, fev. 2021.
- FARDINPOOR, M. et al. Effects of Hydrodynamic Cavitation-Assisted NaOH Pretreatment on Biofuel Production from Cyanobacteria: Promising Approach. **BioEnergy Research** **2021 15:1**, v. 15, n. 1, p. 289–302, 1 maio 2021.
- FERREIRA, A. et al. *Scenedesmus obliquus* microalga-based biorefinery – from brewery effluent to bioactive compounds, biofuels and biofertilizers – aiming at a circular bioeconomy. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 5, p. 1169–1186, 2 set. 2019.
- FRANC, J.-P.; MICHEL, J.-M. **Fundamentals of Cavitation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005. v. 76
- GANESH, R. et al. Bioresource Technology A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. **Bioresource Technology**, v. 262, n. March, p. 319–332, 2018.
- GANESH SARATALE, R. et al. A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. **Bioresource Technology**, v. 262, p. 319–332, 1 ago. 2018.
- GARCIA, E. S. et al. Bioresource Technology Selective and energy efficient extraction of functional proteins from microalgae for food applications. v. 268, n. June, p. 197–203, 2018.
- GARLICKA, A. et al. Effects of Thickened Excess Sludge Pre-Treatment Using Hydrodynamic Cavitation for Anaerobic Digestion. **Energies** **2020, Vol. 13, Page 2483**, v. 13, n. 10, p. 2483, 14 maio 2020.
- GERBER, M. D. et al. Phytotoxicity of effluents from swine slaughterhouses using lettuce and cucumber seeds as bioindicators. **Science of The Total Environment**, v. 592, p. 86–90, ago. 2017.
- GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. **A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology**. **Biochemical Engineering Journal** Elsevier, , 15 abr. 2009.
- GOGATE, P. R.; TAYAL, R. K.; PANDIT, A. B. Cavitation: A technology on the horizon.

- CURRENT SCIENCE**, v. 91, n. 1, 2006.
- GOMIS, V. et al. Isobaric vapor–liquid and vapor–liquid–liquid equilibrium data for the water–ethanol–hexane system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 259, n. 1, p. 66–70, out. 2007.
- GONZÁLEZ-BALDERAS, R. M. et al. Identification and effect of ozone and ultrasound pretreatments on *Desmodesmus* sp. and *Tetradesmus obliquus* proteins. **Algal Research**, v. 60, p. 102514, 1 dez. 2021.
- GONZALEZ-FERNANDEZ, C. et al. Biochemical methane potential of microalgae biomass using different microbial inocula. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 184, 29 dez. 2018.
- GRUBER-BRUNHUMER, M. R. et al. Associated effects of storage and mechanical pretreatments of microalgae biomass on biomethane yields in anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 259–268, 1 out. 2016.
- GUIRY, M. .; GUIRY, G. M. AlgaeBase. **World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway**, 2020.
- GÜNERKEN, E. et al. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 2, p. 243–260, 1 mar. 2015.
- HA, G. S. et al. Energy-efficient pretreatments for the enhanced conversion of microalgal biomass to biofuels. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123333, 1 ago. 2020.
- HAGEN, C.; SIEGMUND, S.; BRAUNE, W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. **European Journal of Phycology**, v. 37, n. 2, p. 217–226, 2002.
- HANDAYANI, T. et al. Utilization of Dairy Industry Wastewater for Nutrition of Microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1655, n. 1, p. 012123, 1 out. 2020.
- HEMALATHA, M. et al. Microalgae-biorefinery with cascading resource recovery design associated to dairy wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 284, p. 424–429, 2019.
- HENRY, M. P. et al. Use of Anaerobic Hybrid Reactors for Treatment of Synthetic Pharmaceutical Wastewaters Containing Organic Solvents. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, v. 66, p. 251–264, 1996.
- HERNÁNDEZ, D. et al. Biofuels from microalgae: Lipid extraction and methane production from the residual biomass in a biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 370–378, 1 out. 2014.
- HESS, D. et al. Techno-economic analysis of ash removal in biomass harvested from algal turf scrubbers. **Biomass and Bioenergy**, v. 123, p. 149–158, 1 abr. 2019.
- HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11, p. 2515–2522, 1 dez. 2016a.

- HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11, p. 2515–2522, 14 dez. 2016b.
- HOSSAIN, N.; ZAINI, J.; INDRA MAHLIA, T. M. Life cycle assessment, energy balance and sensitivity analysis of bioethanol production from microalgae in a tropical country. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 109371, 1 nov. 2019.
- HOWELL, G.; BENNETT, C.; MATERÍĆ, D. A comparison of methods for early prediction of anaerobic biogas potential on biologically treated municipal solid waste. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 887–894, 15 fev. 2019.
- HU, Y. et al. Filamentous microalgae as an advantageous co-substrate for enhanced methane production and digestate dewaterability in anaerobic co-digestion of pig manure. **Waste Management**, v. 119, p. 399–407, jan. 2021.
- HUERTA, R. R. et al. Clove essential oil emulsion-filled cellulose nanofiber hydrogel produced by high-intensity ultrasound technology for tissue engineering applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 64, p. 104845, 1 jun. 2020.
- HUFFER, S. et al. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6400–6408, set. 2011.
- HUSSAIN, A.; DUBEY, S. K. Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. **Applied Water Science**, v. 7, n. 2, p. 535–542, 8 maio 2017.
- HYDROCAVIT. **HydroCavit | Hidrocavitação na produção de etanol, tratamento de efluentes e outras aplicações industriais.** Disponível em: <<https://hydrocavit.com/PT/hidrocavitacao.php>>. Acesso em: 25 nov. 2020.
- IMAM, S. H. et al. The Chlamydomonas cell wall: Characterization of the wall framework. **Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 4, p. 1599–1607, 1 out. 1985.
- INGRAM, L. O. N.; BUTTKE, T. M. Effects of Alcohols on Micro-Organisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 25, n. C, p. 253–300, 1 jan. 1985.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Cheese and processed cheese products: determination of fat content - gravimetric method - reference method. p. 7, 1987.
- JIANG, Y. et al. Metabolic responses to ethanol and butanol in Chlamydomonas reinhardtii. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 17 out. 2017.
- JUSTESEN, C. G. et al. Development and validation of a low-cost gas density method for measuring biochemical methane potential (BMP). **Water (Switzerland)**, v. 11, n. 12, p. 2431, 1 dez. 2019.
- KAPOORE, R. et al. Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery. **Biology**, v. 7, n. 1, p. 18, 15 fev. 2018.
- KATIYAR, R. et al. Utilization of de-oiled algal biomass for enhancing vehicular quality biodiesel production from Chlorella sp. in mixotrophic cultivation systems. **Renewable Energy**, v. 122, p. 80–88, jul. 2018.

- KENDIR, E.; UGURLU, A. **A comprehensive review on pretreatment of microalgae for biogas production. International Journal of Energy Research** John Wiley and Sons Ltd, , 10 out. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/er.4100>>. Acesso em: 2 dez. 2020
- KHOO, C. G. et al. Algae biorefinery: Review on a broad spectrum of downstream processes and products. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 121964, 1 nov. 2019.
- KHOO, K. S. et al. Recent advances in downstream processing of microalgae lipid recovery for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 304, p. 122996, maio 2020.
- KLASSEN, V. et al. Highly efficient methane generation from untreated microalgae biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.
- KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1834–1846, dez. 2015.
- KOUHIA, M. et al. Energy analysis of algae-to-biofuel production chains integrated with a combined heat and power plant. **International Journal of Sustainable Engineering**, v. 12, n. 4, p. 281–290, 4 jul. 2019.
- KULDEEP; SAHARAN, V. K. Computational study of different venturi and orifice type hydrodynamic cavitating devices. **Journal of Hydrodynamics**, v. 28, n. 2, p. 293–305, 1 abr. 2016.
- KUMAR, N. et al. A novel non-starch based cationic polymer as flocculant for harvesting microalgae. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 383–390, jan. 2019.
- KUMAR, V. B. et al. Evaluation of the Potential of *Chlorella vulgaris* for Bioethanol Production. **Energy and Fuels**, v. 30, n. 4, p. 3161–3166, 21 abr. 2016.
- KURZ, T. et al. Optic cavitation in an ultrasonic field. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 74, n. 6, 2006.
- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1881–1889, 16 out. 2015.
- LEE, I.; HAN, J.-I. Development of a pretreatment method based on Fenton-like reaction combined with hydrodynamic cavitation for lipid extraction from wet microalgae. **Renewable Energy**, v. 175, p. 415–421, set. 2021.
- LEE, I.; HAN, J. I. Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 246–251, 1 jun. 2015.
- LEE, I.; OH, Y.-K.; HAN, J.-I. Design optimization of hydrodynamic cavitation for effectual lipid extraction from wet microalgae. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 102942, 1 abr. 2019.
- LEE, J. Y. et al. **Comparison of several methods for effective lipid extraction from**

- microalgae**. *Bioresource Technology*. **Anais...**Elsevier Ltd, 1 jan. 2010.
- LEE, S. M. et al. Phytotoxic mechanisms of bur cucumber seed extracts on lettuce with special reference to analysis of chloroplast proteins, phytohormones, and nutritional elements. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 230–237, 1 dez. 2015.
- LEE, S. Y. et al. Single-step disruption and protein recovery from *Chlorella vulgaris* using ultrasonication and ionic liquid buffer aqueous solutions as extractive solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 124, p. 26–35, ago. 2017a.
- LEE, S. Y. et al. **Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review**. **Bioresource Technology**Elsevier Ltd, , 1 nov. 2017b.
- LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, n. 1, p. 3–28, mar. 1995.
- LI, K. et al. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121934, 1 nov. 2019.
- LJUBIC, A.; SAFAFAR, H.; JACOBSEN, C. Recovery of microalgal biomass and metabolites from homogenized, swirl flash-dried microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 4, p. 2355–2363, 11 ago. 2019.
- LORENTE, E.; FARRIOL, X.; SALVADÓ, J. Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae. **Fuel Processing Technology**, v. 131, p. 93–98, 1 mar. 2015.
- LORENZO-HERNANDO, A. et al. Recovery of proteins from biomass grown in pig manure microalgae-based treatment plants by alkaline hydrolysis and acidic precipitation. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 599–607, 1 fev. 2019.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.
- LOZANO, C. J. S. et al. Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 704–711, 1 fev. 2009.
- LU, W.; WANG, Z.; YUAN, Z. Bioresource Technology Characteristics of lipid extraction from *Chlorella sp.* cultivated in outdoor raceway ponds with mixture of ethyl acetate and ethanol for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 433–437, 2015.
- MA, X. et al. Effect of ethanol pre-fermentation on organic load rate and stability of semi-continuous anaerobic digestion of food waste. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122587, 1 mar. 2020.
- MAHMOOD, W. M. A. W.; THEODOROPOULOS, C.; GONZALEZ-MIQUEL, M. Enhanced microalgal lipid extraction using bio-based solvents for sustainable biofuel production. **Green Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 5723–5733, 27 nov. 2017.
- MARKOU, G. et al. Methane production through anaerobic digestion of residual microalgal

- biomass after the extraction of valuable compounds. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 31 mar. 2020.
- MARTIN, G. J. O. Energy requirements for wet solvent extraction of lipids from microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 40–47, 1 abr. 2016.
- MARTÍN JUÁREZ, J. et al. Effect of pretreatments on biogas production from microalgae biomass grown in pig manure treatment plants. **Bioresource Technology**, v. 257, p. 30–38, 1 jun. 2018.
- MARTÍNEZ-SANZ, M. et al. Composition and rheological properties of microalgae suspensions: Impact of ultrasound processing. **Algal Research**, v. 49, p. 101960, ago. 2020.
- MARTINI, F. et al. The potential use of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* as biostimulants on maize plants. **Algal Research**, v. 60, p. 102515, dez. 2021.
- MASUKO, T. et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69–72, 1 abr. 2005.
- MEDEIROS, J. E. S. et al. Phytochemical screening and the evaluation of allelopathic activity of extract and fractions of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (solanaceae) leaves. In: **Solanum: An Overview**. [s.l.] Nova Science Publishers, Inc., 2020. p. 181–198.
- MILANO, J. et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180–197, maio 2016.
- MOHSENI, A.; FAN, L.; RODDICK, F. A. Impact of microalgae species and solution salinity on algal treatment of wastewater reverse osmosis concentrate. **Chemosphere**, v. 285, p. 131487, 1 dez. 2021.
- MOLINO, A. et al. Microalgae Characterization for Consolidated and New Application in Human Food, Animal Feed and Nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 2436, 1 nov. 2018.
- MONTALESCOT, V. et al. Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 339–346, 1 nov. 2015.
- MOSTAFA, S. S. et al. Microalgae growth in effluents from olive oil industry for biomass production and decreasing phenolics content of wastewater. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 23, n. 1, p. 359–365, 1 mar. 2019.
- MULCHANDANI, K.; KAR, J. R.; SINGHAL, R. S. Extraction of Lipids from *Chlorella saccharophila* Using High-Pressure Homogenization Followed by Three Phase Partitioning. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 6, p. 1613–1626, 13 jul. 2015.
- MULEY, A. B. et al. Production of biologically active peptides by hydrolysis of whey protein isolates using hydrodynamic cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 71, p. 105385, 1 mar. 2021.

- NAGARAJAN, S.; RANADE, V. V. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Vortex-Based Devices for Cavitation: Influence on Biomethane Potential. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 35, p. 15975–15988, 4 set. 2019.
- NATARAJAN, R. et al. Lipid releasing characteristics of microalgae species through continuous ultrasonication. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 7–11, 1 abr. 2014.
- NEVES, V. T. D. C.; ANDRADE, E.; PERELO, L. W. Influence of lipid extraction methods as pre-treatment of microalgal biomass for biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 160–165, 2016.
- NEVES, V. T. D. C.; SALES, E. A.; PERELO, L. W. **Influence of lipid extraction methods as pre-treatment of microalgal biomass for biogas production. Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 1 jun. 2016.
- NGAMSIRISOMSAKUL, M. et al. Enhanced bio-ethanol production from *Chlorella* sp. biomass by hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 141, p. 482–492, 1 out. 2019.
- OKUMURA, J. KOYAMA, H. TAKAKU, H. S, Y. Influence of Organic Solvents on the Growth of Marine Microalgae. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, n. 2, p. 123–128, 6 set. 2001.
- ONUMAEGBU, C. et al. **Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 1 out. 2018.
- ONUMAEGBU, C. et al. Modelling and optimization of wet microalgae *Scenedesmus quadricauda* lipid extraction using microwave pre-treatment method and response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 132, p. 1323–1331, 1 mar. 2019.
- ORFIELD, N. D. et al. Growing algae for biodiesel on direct sunlight or sugars: A comparative life cycle assessment. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 3, n. 3, p. 386–395, 2 mar. 2015.
- PADILLA-MARTINEZ, J. P. et al. Optic cavitation with CW lasers: A review. **Physics of Fluids**, v. 26, n. 12, p. 122007, 23 dez. 2014.
- PAN, X. et al. Deep insights into the network of acetate metabolism in anaerobic digestion: focusing on syntrophic acetate oxidation and homoacetogenesis. **Water Research**, v. 190, p. 116774, 15 fev. 2021.
- PANCHA, I. et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, mar. 2014.
- PEREIRA, M. DOS S. et al. Treatment of synthetic milk industry wastewater using batch dissolved air flotation. **Journal of Cleaner Production**, v. 189, p. 729–737, 10 jul. 2018a.
- PEREIRA, S. et al. Treatment of synthetic milk industry wastewater using batch dissolved air flotation. **Journal of Cleaner Production**, 2018b.

- PHONG, W. N. et al. Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 135, p. 83–90, jul. 2018.
- POSTMA, P. R. et al. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 297–304, 1 maio 2015.
- PRAVEENKUMAR, R. et al. Morphological Change and Cell Disruption of *Haematococcus pluvialis* Cyst during High-Pressure Homogenization for Astaxanthin Recovery. **Applied Sciences**, v. 10, n. 2, p. 513, 10 jan. 2020.
- PRÉAT, N. et al. Identification of microalgae biorefinery scenarios and development of mass and energy balance flowsheets. **Algal Research**, v. 45, n. November 2019, p. 101737, 2020.
- RAHEEM, A. et al. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. **Journal of Cleaner Production**, v. 181, p. 42–59, 20 abr. 2018.
- RAHIMI, Z.; ZINATIZADEH, A. A.; ZINADINI, S. Milk processing wastewater treatment in an MBR: A comparative study on the use of two synthetic anti-fouling PES-UF membranes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 5, p. 103369, 1 out. 2019.
- RAJESH BANU, J. et al. **Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy- techno economic and life-cycle analysis**. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2020.
- RAMLUCKAN, K.; MOODLEY, K. G.; BUX, F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**, v. 116, p. 103–108, 2014.
- RAMOS-SUÁREZ, J. L.; CARRERAS, N. Use of microalgae residues for biogas production. **Chemical Engineering Journal**, v. 242, p. 86–95, 15 abr. 2014.
- RASHIDI, B.; TRINDADE, L. M. Detailed biochemical and morphologic characteristics of the green microalga *Neochloris oleoabundans* cell wall. **Algal Research**, v. 35, p. 152–159, 1 nov. 2018.
- RIPLEY, A. L. E. et al. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **JSTOR**, v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.
- ROCHA, D. N. et al. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121644, out. 2019.
- ROCHA, D. N. et al. Improving biofuel production by thermochemical conversion of defatted *Scenedesmus obliquus* biomass. **Journal of Cleaner Production**, v. 275, 2020.
- ROKICKA, M. et al. Effects of Ultrasonic and Microwave Pretreatment on Lipid Extraction of Microalgae and Methane Production from the Residual Extracted Biomass. **Bioenergy Research**, p. 1–9, 12 out. 2020.

- ROKICKA, M. et al. Effects of Ultrasonic and Microwave Pretreatment on Lipid Extraction of Microalgae and Methane Production from the Residual Extracted Biomass. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 3, p. 752–760, 12 set. 2021.
- ROSELET, F. et al. Effects of pH, Salinity, Biomass Concentration, and Algal Organic Matter on Flocculant Efficiency of Synthetic Versus Natural Polymers for Harvesting Microalgae Biomass. **BioEnergy Research**, v. 10, n. 2, p. 427–437, 7 jun. 2017.
- SAFI, C. et al. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of chlorella vulgaris proteins and pigments in the aqueous phase. **Algal Research**, v. 8, p. 61–68, 1 mar. 2015.
- SAFI, C. et al. Energy consumption and water-soluble protein release by cell wall disruption of Nannochloropsis gaditana. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 204–210, 1 set. 2017.
- SAINI, R. K. et al. Advances in Lipid Extraction Methods—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13643, 20 dez. 2021.
- SÁNCHEZ-BAYO, A. et al. Biodiesel and biogas production from Isochrysis galbana using dry and wet lipid extraction: A biorefinery approach. **Renewable Energy**, v. 146, p. 188–195, 1 fev. 2020.
- SANCHEZ RIZZA, L. et al. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140–147, 1 mar. 2017.
- SCARCELLI, P. G. et al. Evaluation of biomethanization during co-digestion of thermally pretreated microalgae and waste activated sludge, and estimation of its kinetic parameters. **Science of The Total Environment**, v. 706, p. 135745, 1 mar. 2020.
- SETYAWAN, M. et al. Optimum extraction of algae-oil from microalgae using hydrodynamic cavitation. **International Journal of Renewable Energy Research**, v. 8, n. 1, p. 451–458, 2018.
- SETYAWAN, M. et al. Effect of devices and driving pressures on energy requirements and mass transfer coefficient on microalgae lipid extraction assisted by hydrodynamic cavitation. **International Journal of Renewable Energy Development**, v. 9, n. 3, p. 467–473, 15 out. 2020.
- SETYAWAN, M.; MULYONO, P.; SURYA, Y. Effect of Devices and Driving Pressures on Energy Requirements and Mass Transfer Coefficient on Microalgae Lipid Extraction Assisted by Hydrodynamic Cavitation. v. 9, n. 3, p. 467–473, 2020.
- SHI, R.; HANDLER, R. M.; SHONNARD, D. R. Life cycle assessment of novel technologies for algae harvesting and oil extraction in the renewable diesel pathway. **Algal Research**, v. 37, p. 248–259, 1 jan. 2019.
- SIERRA, L. S.; DIXON, C. K.; WILKEN, L. R. Enzymatic cell disruption of the microalgae Chlamydomonas reinhardtii for lipid and protein extraction. **Algal Research**, v. 25, p. 149–159, 1 jul. 2017.
- SILVA, M. E. T. DA et al. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga Scenedesmus obliquus in Wistar rats. **Journal of**

- Functional Foods**, v. 65, p. 103711, fev. 2020.
- SILVA, M. E. T. DA et al. Scenedesmus obliquus protein concentrate: A sustainable alternative emulsifier for the food industry. **Algal Research**, v. 59, p. 102468, nov. 2021.
- SLADE, R.; BAUEN, A. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 29–38, 1 jun. 2013.
- SOLÉ-BUNDÓ, M. et al. Anaerobic co-digestion of microalgal biomass and wheat straw with and without thermo-alkaline pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 237, p. 89–98, 1 ago. 2017.
- SOLÉ-BUNDÓ, M.; GARFÍ, M.; FERRER, I. Pretreatment and co-digestion of microalgae, sludge and fat oil and grease (FOG) from microalgae-based wastewater treatment plants. **Bioresource Technology**, v. 298, p. 122563, 1 fev. 2020.
- SOTO-SIERRA, L.; STOYKOVA, P.; NIKOLOV, Z. L. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. **Algal Research**, v. 36, p. 175–192, dez. 2018.
- SPIDEN, E. M. et al. Quantitative evaluation of the ease of rupture of industrially promising microalgae by high pressure homogenization. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 165–171, jul. 2013.
- SPOSOB, M. et al. Assessment of the relationship between solubilization and biogas production on anaerobic digestion of pretreated lipid-extracted microalgae waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, p. 105702, 1 out. 2020.
- SRIVASTAVA, G. et al. Anaerobic co-digestion of defatted microalgae residue and rice straw as an emerging trend for waste utilization and sustainable biorefinery development. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 9 maio 2020.
- TALEB, A. et al. Screening of freshwater and seawater microalgae strains in fully controlled photobioreactors for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 480–490, 1 out. 2016.
- TAN, X. et al. Comparison of Four Quantitative Techniques for Monitoring Microalgae Disruption by Low-Frequency Ultrasound and Acoustic Energy Efficiency. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 5, p. 3295–3303, 6 mar. 2018.
- TASIĆ, M. B. et al. **Botryococcus braunii for biodiesel production**. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 1 out. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.009>>. Acesso em: 12 nov. 2020
- TATLI, M. et al. Polysaccharide associated protein (PSAP) from the green microalga *Botryococcus braunii* is a unique extracellular matrix hydroxyproline-rich glycoprotein. **Algal Research**, v. 29, p. 92–103, 1 jan. 2018.
- TEULING, E. et al. Comparison of Protein Extracts from Various Unicellular Green Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 36, p. 7989–8002, 13 set. 2017.
- TOGARCHETI, S. C. et al. Life cycle assessment of microalgae based biodiesel production to

- evaluate the impact of biomass productivity and energy source. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 122, p. 286–294, jul. 2017.
- TREDICI, M. R. et al. Energy balance of algal biomass production in a 1-ha “Green Wall Panel” plant: How to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. **Applied Energy**, v. 154, p. 1103–1111, 15 set. 2015.
- UGGETTI, E. et al. Integrating microalgae production with anaerobic digestion: a biorefinery approach. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 8, n. 4, p. 516–529, jul. 2014.
- VELJKOVIĆ, V. B. et al. Modeling of biodiesel production: Performance comparison of Box–Behnken, face central composite and full factorial design. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 7, p. 1690–1698, jul. 2019.
- VIDYASHANKAR, S. et al. Characterisation of defatted *Scenedesmus dimorphus* algal biomass as animal feed. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1871–1879, 30 out. 2015.
- VIEGAS, C.; GOUVEIA, L.; GONÇALVES, M. Evaluation of microalgae as bioremediation agent for poultry effluent and biostimulant for germination. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, p. 102048, nov. 2021.
- VIEIRA, B. B. et al. Optimized extraction of neutral carbohydrates, crude lipids and photosynthetic pigments from the wet biomass of the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. **Separation and Purification Technology**, v. 269, p. 118711, 15 ago. 2021.
- VILARROIG, J. et al. Design and optimization of a semi-industrial cavitation device for a pretreatment of an anaerobic digestion treatment of excess sludge and pig slurry. **Water Environment Research**, v. 92, n. 12, p. 2060–2071, 1 dez. 2020.
- VOIGT, J. et al. The cell-wall glycoproteins of the green alga *Scenedesmus obliquus*. The predominant cell-wall polypeptide of *Scenedesmus obliquus* is related to the cell-wall glycoprotein gp3 of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Science**, v. 215–216, p. 39–47, 1 fev. 2014.
- WAGHMARE, A. et al. Hydrodynamic cavitation for energy efficient and scalable process of microalgae cell disruption. **Algal Research**, v. 40, n. March, p. 101496, 2019a.
- WAGHMARE, A. et al. Hydrodynamic cavitation for energy efficient and scalable process of microalgae cell disruption. **Algal Research**, v. 40, p. 101496, 1 jun. 2019b.
- WANG, M.; YUAN, W. Microalgal cell disruption in a high-power ultrasonic flow system. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 171–177, 1 out. 2015.
- WANG, S. K. et al. Tofu whey wastewater is a promising basal medium for microalgae culture. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 79–84, 1 abr. 2018.
- WU, C. et al. Effect of ethanol pre-fermentation and inoculum-to-substrate ratio on methane yield from food waste and distillers’ grains. **Applied Energy**, v. 155, p. 846–853, 1 out. 2015.
- WU, H. et al. Sequent production of proteins and biogas from *Chlorella* sp. via CO<sub>2</sub> assisted

- hydrothermal treatment and anaerobic digestion. **Journal of Cleaner Production**, v. 277, p. 123563, 20 dez. 2020.
- WU, J. et al. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 71, p. 323–329, 2017.
- XIE, Y. et al. Disruption of thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. F51 in high pressure homogenization as a prelude to carotenoids extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 243–251, 15 maio 2016.
- XU, S. et al. Evaluation of bioethanol and biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* grown in biodiesel waste glycerol: A sequential integrated route for enhanced energy recovery. **Energy Conversion and Management**, v. 197, p. 111907, 1 out. 2019.
- YANTI, H. et al. Effect of ester compounds on biogas production: beneficial or detrimental? **Energy Science & Engineering**, v. 2, n. 1, p. 22–30, 1 mar. 2014.
- YAP, B. H. J. et al. Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 280–285, 1 maio 2015.
- YASUI, K. **Acoustic Cavitation and Bubble Dynamics**. Cham: Springer International Publishing, 2018.
- YU, M. et al. Ethanol prefermentation of food waste in sequencing batch methane fermentation for improved buffering capacity and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 187–193, 1 jan. 2018.
- YUN, Y.-M. et al. Inhibition of residual n-hexane in anaerobic digestion of lipid-extracted microalgal wastes and microbial community shift. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7138–7145, 13 abr. 2016.
- YUN, Y. M. et al. **Inhibitory effect of chloroform on fermentative hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgae**. International Journal of Hydrogen Energy. **Anais...Elsevier Ltd**, 11 nov. 2014.
- ZARRINMEHR, M. J. et al. The effect of solvents polarity and extraction conditions on the microalgal lipids yield, fatty acids profile, and biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126303, 1 jan. 2022.
- ZHAO, B. et al. Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 423–430, 1 jun. 2014.
- ZHAO, Y. et al. The inhibitory effects of *Ulva prolifera* extracts on early growth of *Spartina alterniflora* and the underlying mechanisms. **Journal of Environmental Management**, v. 319, p. 115639, 1 out. 2022.
- ZHENG, G. et al. An integrated microfluidic device in marine microalgae culture for toxicity screening application. **Marine Pollution Bulletin**, v. 72, n. 1, p. 231–243, 15 jul. 2013.

#### 4. CAPÍTULO II: Efeito combinado do pH e da cavitação hidrodinâmica na extração de lipídios, proteínas e pigmentos de *Scenedesmus obliquus*

##### RESUMO

O gênero da microalga *Scenedesmus* tem grande potencial para produção de biocombustíveis e alimentos, com composição majoritária de proteínas, lipídios, carboidratos e pigmentos. No entanto, a resistência da parede celular dificulta a extração dos compostos intracelulares de interesse para a indústria. Portanto, o uso de técnicas de rompimento celular como a cavitação hidrodinâmica (CH) é necessário para permitir a extração dos compostos. Este trabalho tem por objetivo otimizar os parâmetros operacionais da CH para rompimento de células de *Scenedesmus obliquus* BR003. O efeito do pH da suspensão também foi avaliado. Os parâmetros número de cavitação (NC), número de passagens (NP) e concentração de sólidos totais (ST) apresentaram efeitos significativos no rompimento celular. A condição otimizada foi obtida com NC 0,23, NP 35 e ST 49,9 g L<sup>-1</sup>, com rendimento máximo de 76,7%, 23,9% e 19,6% para extração de lipídios, proteínas e pigmentos, respectivamente, com o consumo específico de energia de 0,35 MJ kg<sup>-1</sup>. O consumo de energia foi 5,5, 5,3 e 4,1 vezes menor quando comparado com o rompimento por ultrassom (US), para extração de lipídios, proteínas e pigmentos, respectivamente. O rendimento de extração de proteínas e pigmentos aumentou em 60 e 40%, respectivamente, quando o pH da suspensão foi ajustado para 10, durante o rompimento por CH. Assim, o uso da cavitação hidrodinâmica associado ao ajuste de pH contribui para o aumento da eficiência de extração e melhoria da eficiência energética do processamento das microalgas para a produção de alimentos, biocombustíveis e biofertilizantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Tetradasmus obliquus*; otimização multiobjetivo; rompimento celular; ultrassom; consumo de energia.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

As microalgas têm se destacado pelo grande potencial de produção de biomassa e possibilidade de uso nos setores agrícolas, de alimentos e biomédicos (GONZÁLEZ-BALDERAS et al., 2021; MOLINO et al., 2018; SILVA et al., 2020), e também como fonte de matéria-prima para a produção de biocombustíveis, tais como o biodiesel, etanol e biogás (GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2018; MAHMOOD; THEODOROPOULOS; GONZALEZ-MIQUEL, 2017; XU et al., 2019). Dentre as principais vantagens, destaca-se o grande potencial de produção de biomassa, e a possibilidade de serem cultivadas utilizando águas salinas, salobras ou residuárias, impróprias para o cultivo de plantas vasculares. Além disso, possuem grande potencial para captura do CO<sub>2</sub> proveniente de emissões antrópicas (KLIGERMAN; BOUWER, 2015).

Dentre as microalgas verdes, o gênero *Scenedesmus* é um dos mais estudados para produção de biocombustíveis e alimentos. Esse gênero é composto por várias espécies que despertam grande interesse como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel, etanol, biogás, bio-óleo e carvão, além de alimentos, rações e nutracêuticos (KHOO et al., 2019). A linhagem *S. obliquus* apresenta uma alta taxa de crescimento, resistência à contaminação microbiana e predadores quando cultivada em tanques abertos (ROCHA et al., 2019). Além disso, a sua biomassa é composta majoritariamente por proteínas, lipídios, carboidratos e pigmentos, podendo ser consumida *in natura* por ser atóxica (AMORIM et al., 2021; SILVA et al., 2020).

As microalgas armazenam compostos de interesse para indústria dentro da célula, protegida por um envoltório celular, como lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos. Esse envoltório é composto por uma parede celular rígida que protege a célula de estresses bióticos e abióticos, além de fornecer plasticidade, permitindo que elas se expandam e assumam formas diferentes (RASHIDI; TRINDADE, 2018). A parede celular do gênero *Scenedesmus* é composta por celulose na camada interna e *algaenan*, uma macromolécula alifática insolúvel, localizada na bainha trilaminar (TLS), conferindo resistência a tratamentos com métodos de rompimento mecânicos, enzimáticos e químicos (ALHATTAB; KERMANSHAHI-POUR; BROOKS, 2019).

O rompimento da parede celular das microalgas representa um gargalo no processamento da biomassa. Nos últimos anos vários métodos de rompimento têm sido propostos para uso em biorrefinarias de microalgas, porém a eficiência energética e a viabilidade econômica restringem o uso em escala industrial (ONUMAEGBU et al., 2018). Dentre os métodos mecânicos, a cavitação hidrodinâmica é bastante promissora pela

simplicidade do sistema, facilidade no aumento de escala, baixo custo de implantação e baixo consumo de energia (FARDINPOOR et al., 2021; LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; LEE; HAN, 2015; LEE; OH; HAN, 2019; WAGHMARE et al., 2019)

A cavitação hidrodinâmica é gerada pelo escoamento fluido através de uma restrição, como válvula de estrangulamento, placa de orifício e Venturi, gerando uma zona de baixa pressão devido ao aumento da velocidade do fluido (GOGATE; KABADI, 2009). Se o estrangulamento for suficiente para fazer com que a pressão na zona de restrição seja menor que a pressão de vapor do fluido, haverá a formação de microbolhas cavitantes, e assim que o fluido atingir a seção de expansão, de maior pressão, as bolhas entram em colapso produzindo ondas de choque (LEE; HAN, 2015).

O rompimento do envoltório celular das microalgas utilizando a cavitação hidrodinâmica ocorre devido à ação de três mecanismos: (1) ondas de choque, geradas após o colapso das microbolhas, com pressões de 100 a 5.000 bar; (2) radicais livres, principalmente hidroxila (OH), que são gerados devido à dissociação de vapores aprisionados nas bolhas cavitantes; e (3) a alta temperatura (500 a 15.000 K) (GOGATE; KABADI, 2009; LEE; HAN, 2015; LEE; OH; HAN, 2019). Esses mecanismos atuando de forma simultânea é responsável pelo rompimento da parede celular, favorecendo a extração dos compostos intracelulares (WAGHMARE et al., 2019).

Estudos realizados com a cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de microalgas demonstram o quanto esse método é eficiente energeticamente. Waghmare et al. (2019), por exemplo obtiveram consumo de energia 6,3 vezes menor, quando comparado com o rompimento por ultrassom, para extração de lipídios de *Chlorella pyrenoidosa*. Enquanto Lee et al. (2015) verificaram um consumo de 3,0 MJ kg<sup>-1</sup> para extração de lipídios de *Tetraselmis suecica*. Porém, os poucos trabalhos publicados avaliaram apenas o impacto do rompimento por CH na extração de lipídios (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; LEE; HAN, 2021, 2015; LEE; OH; HAN, 2019; SETYAWAN et al., 2018; SETYAWAN; MULYONO; SURYA, 2020; WAGHMARE et al., 2019). Assim, é necessário avaliar os efeitos do rompimento celular por cavitação hidrodinâmica para extração de outros produtos, tais como proteínas e pigmentos.

Uma investigação mais ampla para avaliar os efeitos dos parâmetros operacionais do sistema de cavitação também se faz necessário. A metodologia de superfície de resposta pode ser utilizada para a otimização desses parâmetros, e obter o máximo de extração dos compostos de interesse. Veljković et al. (2019) verificaram que o delineamento composto central (DCC) é eficiente para modelagem estatística e otimização de processos, além de consumir menos

recursos, devido ao menor número de experimentos, quando comparado a outros métodos de análise multivariada.

No presente trabalho, os parâmetros operacionais da cavitação hidrodinâmica foram otimizados para maximizar a extração de lipídios, proteínas e pigmentos de *Scenedesmus obliquus* BR003 e minimizar o consumo de energia específico. O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para otimizar os fatores número de cavitação (NC), número de passagens (NP) e concentração de sólidos totais (ST). O efeito do pH da suspensão de microalgas no rompimento celular por CH também foi avaliado. O consumo específico de energia do rompimento por CH foi comparado com o rompimento por ultrassom (US).

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Produção e coleta da biomassa

A linhagem *Scenedesmus obliquus* BR003 foi obtida da coleção do Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. As microalgas foram cultivadas em tanque aberto tipo *raceway* com capacidade de 4000 L e meio de cultura formulado com água da rede de abastecimento e fertilizantes agrícolas nas seguintes concentrações: 171,12 mg L<sup>-1</sup> de ureia (Fertilizantes Heringer, Brasil), 44,36 mg L<sup>-1</sup> de monofosfato de amônio (Yara Brasil Fertilizantes, Brasil), 176,33 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (Fertilizantes Heringer, Brasil), 45,96 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio hepta-hidratado (Multitécnica, Brasil) e 14,65 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de ferro monohidratado (Pigminas, Brasil). O carbono foi fornecido na forma de CO<sub>2</sub>, por meio da injeção de gás de combustão, com aproximadamente 12% (v/v) de CO<sub>2</sub>. A intensidade média diária de radiação foi 752,1 μmoles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> sob luz solar direta, com temperatura entre 20 e 30 °C. O crescimento da cultura foi monitorado diariamente pela densidade óptica a 750 nm medida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO, Alemanha).

A biomassa foi coletada no 12º dia de cultivo durante a fase estacionária de crescimento e concentrada pelo processo de floculação (Poliamina Catiônica, SNF Floerger, França) e sedimentação, seguida de filtração por gravidade com membrana de poliéster de 100 μm. A biomassa coletada foi armazenada a -20°C em recipientes estéreis até a realização dos experimentos. Também foi separado e armazenado uma parte do sobrenadante para ajuste do teor de sólidos totais para os ensaios de rompimento celular.

#### 4.2.2. Composição da biomassa de *S. obliquus* BR003

A biomassa da microalga foi caracterizada quanto a sua composição bioquímica, e os resultados estão na Tabela 4.1. Os sólidos totais e os teores de cinzas foram determinados conforme metodologia proposta por APHA (2017). Os teores de lipídios totais foram determinados pelo método gravimétrico proposto por Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1987). As proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Bradford (1976). Os carboidratos neutros foram determinados pelo método fenol - ácido sulfúrico de Dubois, adaptado para microplacas por Masuko et al. (2005). Enquanto os pigmentos totais foram determinados conforme Pancha *et al.* (2014).

Tabela 4.1: Caracterização da biomassa de *Scenedesmus obliquus* BR003. Os valores apresentados são as médias seguida do desvio padrão

Parâmetros	Valores
Sólidos totais (g L <sup>-1</sup> )	110,00 ± 2,50
Cinzas (% base seca)	11,66 ± 0,82
Proteínas hidrossolúveis (% base seca)	44,71 ± 2,14
Carboidratos neutros totais (% base seca)	11,53 ± 1,08
Lipídios totais (% base seca)	17,62 ± 0,94
Pigmentos totais (mg g <sup>-1</sup> )	18,0 ± 0,24
pH	7,33

#### 4.2.3. Planejamento experimental

Este trabalho foi dividido em duas etapas: (1) otimização das condições operacionais da cavitação hidrodinâmica (CH) para o rompimento celular de *S. obliquus* e (2) avaliação do efeito do pH no rompimento celular com o uso da CH.

O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para otimizar as condições operacionais da cavitação hidrodinâmica e determinar as condições ideais para obter a máxima extração de lipídios, proteínas e pigmentos, e o menor consumo intensivo de energia. O DCCR consistiu em um esquema fatorial 2<sup>3</sup> com seis pontos axiais e três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios, conforme Tabela 4.2. Os fatores utilizados foram: número de cavitação (NC, adimensional), número de passagens (NP, adimensional) e sólidos totais na biomassa (ST, g L<sup>-1</sup>).

Tabela 4.2: Fatores e níveis utilizados para otimização das condições de rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003 pela cavitação hidrodinâmica

Fatores	Níveis				
	- $\alpha$	(-)	0	(+)	+ $\alpha$
Número de cavitação	0,23	0,60	1,15	1,70	2,08
Número de passagens	5	15	30	45	55
Concentração (g L <sup>-1</sup> )	9,5	30,0	60,0	90,0	110,5

O pH da suspensão de microalgas foi mantido em 7, e a concentração de sólidos totais foi ajustada com a adição do sobrenadante do cultivo. O número de cavitação foi obtido com o ajuste da velocidade do escoamento no dispositivo de cavitação, por meio do ajuste da velocidade de rotação da bomba centrífuga.

Para a análise estatística dos resultados e para obtenção dos modelos preditivos, otimização da resposta e construção dos gráficos foi utilizado o programa R. O ponto ótimo foi determinado por meio da otimização multiobjetivo, que é uma técnica de otimização simultânea que determina a combinação dos valores de cada fator que gera a melhor resposta.

Também foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) para avaliar a influência do pH na eficiência de extração de lipídios, proteínas e pigmentos, nas condições operacionais ótimas determinadas no experimento anterior. Os ensaios foram realizados com 4 níveis de pH (7, 8,5, 10 e 11,5) e três repetições para cada nível. O pH foi ajustado com adição de solução de NaOH 4 mol L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4. Rompimento celular por cavitação hidrodinâmica

##### *Configuração do sistema de rompimento*

O esquema da montagem experimental do sistema utilizado no rompimento celular de *S. obliquus* por cavitação hidrodinâmica é apresentado na Figura 4.1. A montagem é composta por um recipiente com volume útil de 6 litros, uma bomba centrífuga com potência nominal de 5,5 kW (ME-AL 2375, Schneider, EUA) conectada a um inversor de frequência (CFW 500, WEG, Brasil), que foi utilizada para bombear a biomassa úmida de microalgas pelo dispositivo de rompimento. Também foram utilizados um manômetro para medir a pressão do escoamento, válvulas para controle da vazão, e um trocador de calor (recipiente com gelo) para manter a temperatura da suspensão de microalgas abaixo de 35 °C.

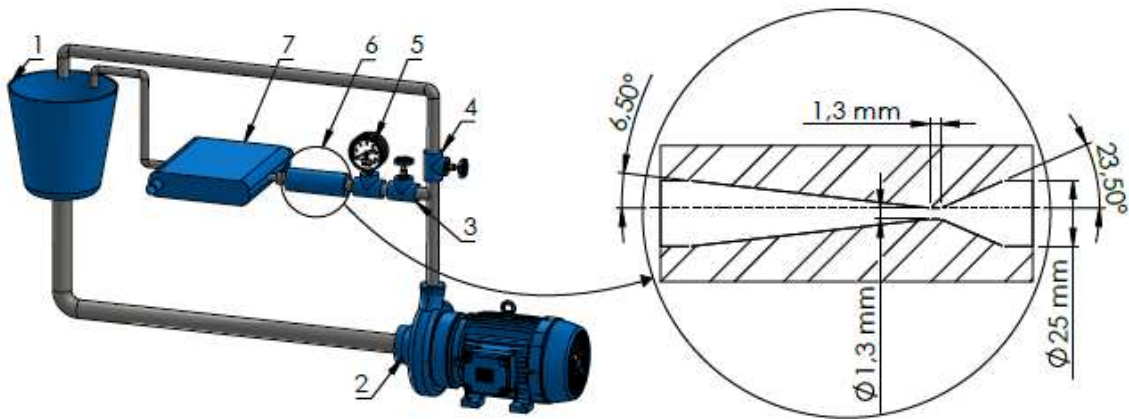


Figura 4.1: Sistema para rompimento celular por cavitação hidrodinâmica. (1) Recipiente, (2) Bomba centrífuga, (3) válvula para controle do fluxo no dispositivo de cavitação, (4) válvula para controle do fluxo na tubulação *bypass*, (5) manômetro, (6) dispositivo de cavitação (Venturi, em destaque) e (7) trocador de calor.

O dispositivo de rompimento utilizado foi um Venturi, confeccionado de resina Epoxi e polido para reduzir a rugosidade da parede interna. Os parâmetros geométricos do dispositivos foram definidos de acordo com Kuldeep e Saharan (2016), com ângulos de convergência de 23,5° e de divergência de 6,5°, diâmetro da constrição 1,3 mm e relação diâmetro: comprimento da constrição igual 1:1 (Figura 4.1). A relação do perímetro pela área da seção transversal do orifício ( $\alpha$ ) foi igual a 3,08.

#### *Parâmetros hidrodinâmicos*

O número de cavitação ( $\sigma$ , adimensional) foi calculado conforme a Equação 4.1 (FRANC; MICHEL, 2005). Este parâmetro foi utilizado para descrever o efeito da cavitação no sistema.

$$\sigma = \frac{(P_2 - P_v)}{\rho v^2 / 2} \quad (4.1)$$

em que,  $P_2$  é a pressão a jusante do Venturi (Pa),  $P_v$  é a pressão de vapor do líquido para a temperatura operacional (Pa),  $\rho$  é a massa específica da suspensão de microalgas ( $\text{kg m}^{-3}$ ), e  $v$  é a velocidade do escoamento na constrição do Venturi ( $\text{m s}^{-1}$ ).

O número de cavitação é influenciado por parâmetros hidrodinâmicos como a velocidade do escoamento, pressão de entrada, temperatura e massa específica do líquido. A temperatura da suspensão de microalgas foi mantida entre 25 e 35 °C com o auxílio de um trocador de calor, enquanto a massa específica variou entre 987,3 e 1.016,3  $\text{kg m}^{-3}$  para as concentrações entre 9,5 e 110,5  $\text{g L}^{-1}$ . A pressão absoluta a jusante do dispositivo foi de 0,9 bar, referente a pressão atmosférica no local do experimento. Na Tabela 4.3 são apresentados os

demais parâmetros hidrodinâmicos utilizados para obter o número de cavitação predefinido no DCCR.

Tabela 4.3: Parâmetros hidrodinâmicos utilizados na otimização das condições operacionais para rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003 por cavitação hidrodinâmica. Médias seguidas de desvio padrão

Número de cavitação	Pressão absoluta a montante ( $\times 10^5$ Pa)	Vazão ( $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ )	Velocidade ( $\text{m s}^{-1}$ )
0,23	6,33 $\pm$ 0,52	2,23 $\pm$ 0,04	28,00 $\pm$ 1,58
0,60	4,81 $\pm$ 0,46	1,36 $\pm$ 0,06	17,05 $\pm$ 0,95
1,15	3,85 $\pm$ 0,49	0,99 $\pm$ 0,04	12,47 $\pm$ 1,09
1,70	2,80 $\pm$ 0,22	0,82 $\pm$ 0,01	10,23 $\pm$ 0,92
2,08	1,92 $\pm$ 0,18	0,75 $\pm$ 0,02	9,42 $\pm$ 0,26

#### 4.2.5. Rompimento celular por ultrassom

A biomassa úmida rompida por ultrassom (US) foi utilizada como o tratamento controle positivo. O rompimento por US foi feito em processador ultrassônico (VCX 750, Sonics & Materials, EUA) com sonda de 13 mm e frequência 20 kHz. Um volume de 500 mL de suspensão de microalgas com concentração de sólidos totais de 43,4 g L<sup>-1</sup> foi submetido ao US por 5 min em banho de gelo para evitar aquecimento da amostra.

#### 4.2.6. Cálculo da energia requerida para rompimento

A taxa de consumo de energia para o rompimento celular por ultrassom ( $P_{US}$ , em W) foi calculada de acordo com o método calorimétrico, conforme a Equação 4.2 (HUERTA et al., 2020), enquanto a energia demandada para o rompimento por cavitação hidrodinâmica ( $P_{CH}$ , em W) foi calculado conforme a Equação 4.3 (MULEY et al., 2021).

$$P_{US} = m c_p (\Delta T / \Delta t) \quad (4.2)$$

$$P_{CH} = \Delta P Q \quad (4.3)$$

em que  $m$  é a massa da amostra (kg),  $c_p$  é o calor específico da amostra ( $\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$ ), o  $\Delta T$  é a variação de temperatura (K) durante o intervalo de tempo  $\Delta t$  (s),  $\Delta P$  é a variação de pressão no sistema de cavitação (Pa), e  $Q$  é a vazão ( $\text{m}^3/\text{s}$ ).

O consumo intensivo de energia para o rompimento ( $E_C$ , em kJ/kg), em relação a massa seca de biomassa, foi calculada conforme a Equação 4.4.

$$E_C = \frac{P t}{V C} \quad (4.4)$$

em que  $P$  é a taxa de consumo de energia para rompimento por CH ou US (W),  $t$  é o tempo de processamento (s),  $V$  é o volume da biomassa úmida rompida ( $\text{m}^3$ ) e  $C$  é a concentração da biomassa ( $\text{kg m}^{-3}$ ).

#### 4.2.7. Indicadores de rompimento celular

Para avaliar o efeito do rompimento celular em *S. obliquus*, os teores extraídos de lipídios totais, proteínas hidrossolúveis e pigmentos totais foram quantificados, após cada tratamento. No tratamento otimizado também foi obtido imagens das células em microscopia confocal.

##### *Rendimento de extração de lipídios*

Os teores de lipídios totais disponíveis para extração após o rompimento foram determinados conforme Vieira *et al.* (2021), em que 5 mL de etanol anidro, 15 mL de éter de etílico e 15 mL de éter de petróleo foram adicionados a 10 mL da amostra úmida de microalgas. Os tubos foram agitados por 1 hora a 300 rpm e 25 °C, e em seguida foram centrifugados a 3.600 g por 5 minutos. Na sequência, a fase orgânica foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL que foram mantidos em estufa a 105 °C até a completa evaporação dos solventes para quantificação gravimétrica dos lipídios. Foram realizadas três extrações nas mesmas condições descritas anteriormente. Todas as extrações foram realizadas em triplicata. O rendimento de extração de lipídios totais ( $\eta_L$ , %) foi determinado conforme a Equação 4.5:

$$\eta_L = 100 \frac{CA_L}{CT_L} \quad (4.5)$$

em que,  $CA_L$  é a concentração de lipídios totais na amostra ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e  $CT_L$  equivale a concentração de lipídios na biomassa ( $\text{mg g}^{-1}$ ), conforme apresentado na Tabela 4.1.

##### *Rendimento de extração de proteínas*

A concentração de proteínas solúveis das amostras rompidas foram determinadas conforme Lee *et al.* (2017). A suspensão de microalgas foi centrifugada a 3.600 g por 10 minutos e o sobrenadante separado para quantificação das proteínas. A metodologia de Bradford foi utilizada para quantificar o teor de proteína total (BRADFORD, 1976), utilizando-se espectrofotômetro (multiskan GO, Thermo scientific, Alemanha) a 595 nm, e uma curva padrão previamente estabelecida usando a albumina de soro bovino (BSA). O rendimento de extração de proteínas solúveis ( $\eta_P$ , %) foi determinado conforme a Equação 4.6:

$$\eta_P = 100 \frac{CA_P}{CT_P} \quad (4.6)$$

em que,  $CA_P$  é a concentração de proteínas solúveis na amostra ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e  $CT_P$  é a concentração de proteínas solúveis na biomassa ( $\text{mg g}^{-1}$ ), conforme Tabela 4.1.

#### *Rendimento de extração de pigmentos totais*

A quantificação dos pigmentos totais disponíveis para extração após o rompimento celular, foi realizado conforme Safi *et al.* (2015), em que 200  $\mu\text{L}$  de amostra rompida foi misturada com 1,3 mL de metanol. Os tubos contendo a mistura foram agitados, e em seguida foram centrifugados a 3.600 g por 10 min. O sobrenadante contendo os pigmentos foi separado e analisado no espectrofotômetro (multiskan GO, Thermo scientific, Alemanha), com leitura nos comprimentos de ondas 480, 652 e 665 nm. A concentração de pigmentos totais equivale à somatória das concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenoides. O rendimento de extração de pigmentos totais ( $\eta_{Pig}$ , %) foi determinado conforme a Equação 4.7:

$$\eta_{Pig} = 100 \frac{CA_{Pig}}{CT_{Pig}} \quad (4.7)$$

em que,  $CA_{Pig}$  é a concentração de pigmentos na amostra ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e  $CT_{Pig}$  equivale a concentração de pigmentos na biomassa ( $\text{mg g}^{-1}$ ), conforme apresentado na Tabela 4.1.

#### *Microscopia confocal*

As microalgas antes e após o rompimento por CH na condição otimizada foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e pH 7,2), e centrifugada a 3.600 g por 5 min. As células foram incubadas por 15 minutos no escuro, em uma mistura de iodeto de propídio (para visualização de DNA), Vermelho do Nilo (para visualização dos lipídios) e isotiocianato de fluoresceína (para visualização de proteínas). As amostras foram examinadas em microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510 Meta, Alemanha) com excitação a laser de argônio a 488 e 514 nm, autofluorescência com emissão de 650 nm (CESÁRIO *et al.*, 2022).

#### **4.2.8. Análises estatística**

Os dados de rendimento de extração dos compostos intracelulares, obtidos nos experimentos para avaliar o efeito combinado do pH com a CH, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste *post hoc* de Tukey a 5 % de probabilidade.

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1. Otimização das condições operacionais da cavitação hidrodinâmica

A otimização dos parâmetros operacionais da cavitação hidrodinâmica (CH) para aumentar a eficiência do rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003, foi feita por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O rendimento de extração foi calculado em relação à composição da biomassa (Tabela 4.1). Os valores obtidos foram de 44,76 a 75,79 % para lipídios, 9,02 a 24,94 % para proteínas solúveis e 8,91 a 20,58 % para pigmentos totais, enquanto o consumo intensivo de energia variou de 0,02 a 0,86 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca processada (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Rendimento de extração de lipídios, proteínas solúveis, pigmentos totais e consumo intensivo de energia, utilizando a cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003

Ensaio	Fatores			Rendimento de extração (%)			Consumo energia (MJ kg <sup>-1</sup> )
	NC	NP	ST (g/L)	Lipídios	Proteínas	Pigmentos	
1	0,60	15	30,0	67,43	22,07	14,70	0,19
2	1,70	15	30,0	51,97	19,16	12,06	0,09
3	0,60	15	90,0	49,84	11,91	12,07	0,07
4	1,70	15	90,0	48,15	9,41	11,41	0,03
5	0,60	45	30,0	71,41	23,21	16,97	0,56
6	1,70	45	30,0	57,97	21,26	15,76	0,28
7	0,60	45	90,0	65,50	12,13	15,90	0,20
8	1,70	45	90,0	57,21	11,14	13,37	0,10
9	1,15	5	60,0	44,88	9,02	8,91	<b>0,02</b>
10	1,15	55	60,0	73,82	12,18	15,86	0,27
11	1,15	30	9,5	59,70	<b>24,94</b>	17,44	0,86
12	1,15	30	110,5	47,60	10,30	10,50	0,08
13	0,23	30	60,0	<b>75,79</b>	24,78	<b>20,58</b>	0,27
14	2,08	30	60,0	44,76	9,71	10,85	0,05
15	1,15	30	60,0	52,25	10,27	13,59	0,14
16	1,15	30	60,0	53,71	11,47	13,31	0,15
17	1,15	30	60,0	52,08	10,95	13,44	0,15
US				80,65	27,62	27,78	2,06
SR				37,05	1,29	3,78	-

US - Rompimento por ultrassom; SR - Sem rompimento; NC - Número de cavitação; NP - Número de passagens; ST - Sólidos totais.

A biomassa rompida por ultrassom (US) apresentou rendimentos de extração maiores que o rompimento por CH, com valores de 80,65%, 27,62% e 27,78% para lipídios, proteínas e pigmentos, respectivamente. Embora os dois métodos utilizem do mesmo mecanismo de

rompimento (cavitação), é importante ressaltar que ultrassom é um método utilizado há décadas para rompimento celular de microrganismos, com vários trabalhos publicados na literatura e diversos equipamentos disponíveis no mercado, porém, com uma baixa eficiência energética (CARVALHO et al., 2020). Neste trabalho, o consumo intensivo de energia com o uso do US foi muito maior quando comparado com o uso da CH.

Os rendimentos de extração obtidos no tratamento controle, com uso da biomassa sem romper (SR), foram menores que os tratamentos com rompimento por CH (Tabela 4.4). Porém, mesmo sem rompimento foi possível extrair compostos intracelulares, pois a biomassa utilizada nos ensaios foi congelada, o que causou danos na parede celular devido à formação de cristais intracelulares durante o armazenamento em freezer (GRUBER-BRUNHUMER et al., 2016).

#### *Extração de lipídios*

O modelo matemático obtido para representar o rendimento de extração de lipídios foi avaliado pela falta de ajuste, análise de identidade e distribuição de resíduos, obtendo uma boa correlação entre os valores preditos e observados (Figura 4.2A), e um alto coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,91$ ). Os gráficos de superfície de resposta (Figura 4.2B, Figura 4.2C e Figura 4.2D) obtidos a partir dos modelos ajustados, apontam as condições para obter o máximo rendimento de extração de lipídios.

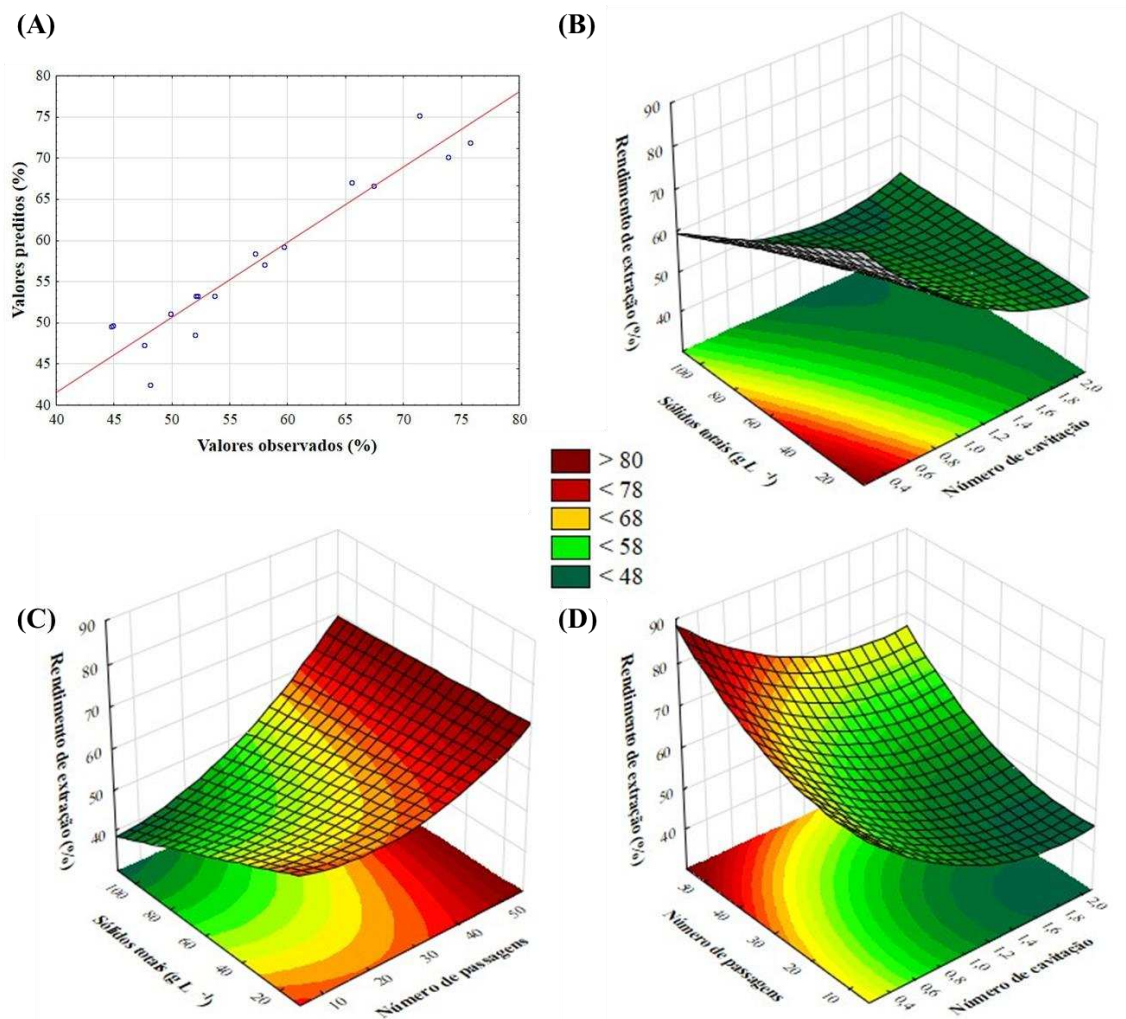


Figura 4.2: (A) análise de identidade entre os valores preditos e observados, e superfície de resposta dos fatores (B) ST e NC, (C) ST e NP e (D) NP e NC para o rendimento de extração de lipídios com uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003

O número de cavitação (NC) foi o fator mais significativo, com maiores rendimentos de extração de lipídios obtidos com a diminuição desta variável. De fato, o número de cavitação é utilizado comumente como parâmetro para determinar o rompimento celular de microalgas. Os menores NC são obtidos quando há o aumento da velocidade do escoamento na constricção do dispositivo de cavitação, ocasionando maiores colapsos das bolhas à jusante do orifício, resultando no rompimento da parede celular (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015). Neste trabalho o NC de 0,23 resultou em maiores rendimentos de extração de lipídios (> 75%) (Figura 4.2B e Figura 4.2D). Lee *et al.* (2015) e Setyawan *et al.* (2018) também verificaram maiores rendimentos de extração de lipídios quando o número de cavitação ficou abaixo de 1.

O número de passagens (NP) também apresentou efeito significativo para a extração de lipídios, obtendo maiores rendimentos com o aumento deste fator. Ao recircular a suspensão pelo Venturi as células de microalgas têm contato com as bolhas cavitantes. Assim, quanto maior o número de passagens, maior será o dano à parede celular, devido ao colapso das bolhas

e liberação de ondas de choque, além da elevação da temperatura (LEE; OH; HAN, 2019). Nas Figura 4.2C e Figura 4.2D observa-se que 55 passagens foi responsável por maiores rendimentos de extração de lipídios (> 70%).

Por fim, a concentração de sólidos totais (ST) apresentou efeito significativo apenas na parte linear do modelo. Os maiores rendimentos de extração de lipídios podem ser obtidos com a diminuição dos ST. Desta forma, quanto menor a concentração de células de microalgas em suspensão, maior o efeito da pressão de colapso e da temperatura por unidade de células recirculada pelo dispositivo de cavitação. Setyawan *et al.* (2018) e Waghmare *et al.* (2019) também verificaram uma diminuição na eficiência do rompimento celular por CH com o aumento na concentração de sólidos totais. Maior carga sólida é desejável devido a redução dos custos de implantação e operação do sistema de rompimento. Porém, uma maior concentração de ST pode levar a dificuldades no bombeamento da biomassa de microalgas.

#### *Extração de proteínas*

O modelo matemático obtido para representar o rendimento de extração de proteínas solúveis foi avaliado pela falta de ajuste, análise de identidade e distribuição de resíduos, obtendo uma boa correlação entre os valores preditos e observados (Figura 4.3A), e um alto coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,92$ ). Os gráficos de superfície de resposta (Figura 4.3B, Figura 4.3C e Figura 4.3D) obtidos a partir dos modelos ajustados, apontam as condições para obter o máximo rendimento de extração de proteínas.

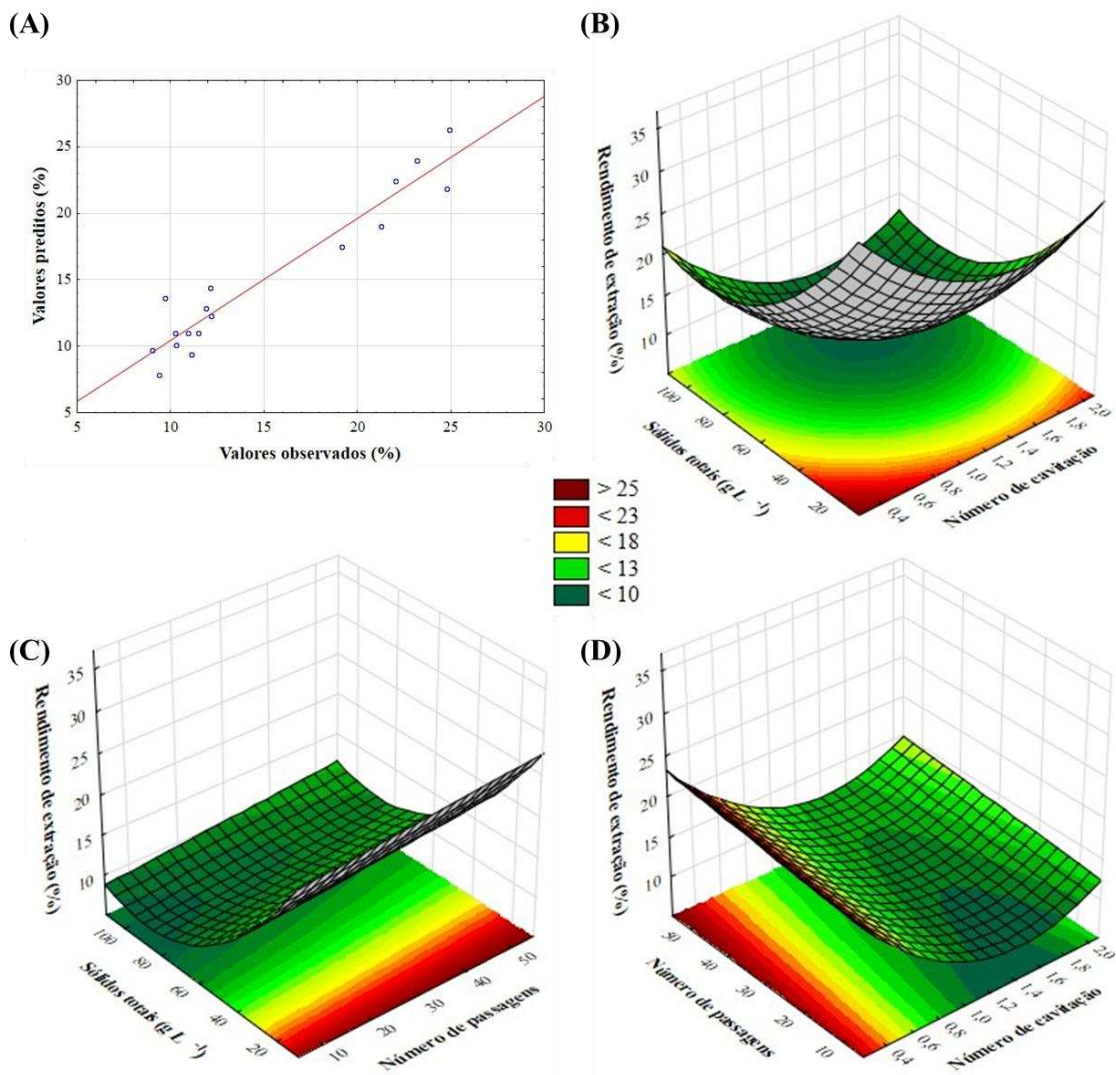


Figura 4.3: (A) gráfico dos valores preditos vs observados e gráficos de superfície de resposta dos fatores (B) ST e NC, (C) ST e NP e (D) NP e NC para o rendimento de extração de proteínas solúveis com uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003

Para a extração de proteínas, o ST foi o fator mais significativo, e os maiores rendimentos podem ser obtidos com a diminuição dessa variável. Na sequência, o NC também apresentou efeito significativo, com maiores rendimentos de extração de proteínas obtido com a diminuição desse fator. Por fim, o NP apresentou efeito significativo apenas na parte linear do modelo, obtendo maiores rendimentos de extração de proteínas com o aumento dessa variável. É importante destacar que este é o primeiro estudo que avalia o efeito da cavitação hidrodinâmica na extração de proteínas hidrossolúveis de microalgas. Conforme é possível observar nas Figura 4.3B, Figura 4.3C e Figura 4.3D, o maior rendimento de extração de proteínas foi de aproximadamente 25%. Este valor está de acordo com trabalhos anteriores que utilizaram outros métodos de rompimento para a extração de proteínas (GARCIA et al., 2018; PHONG et al., 2018; POSTMA et al., 2015).

Os baixos rendimentos de extração de proteínas solúveis das microalgas podem ser explicados devido à sua natureza e localização nas células, pois são encontradas em diferentes partes como parede celular, citoplasma, cloroplasto e outras organelas intracelulares (PHONG et al., 2018). Garcia *et al.* (2018) observaram que 72% das proteínas estão ligadas a estruturas celulares insolúveis, e só podem ser extraídas com o uso de surfactantes. Métodos de rompimento mecânicos mais intensos podem insolubilizar as proteínas solúveis, devido a interação destas com os fragmentos celulares (POSTMA et al., 2015). Ademais, a excessiva fragmentação celular incorre em maior contaminação dos concentrados proteicos com debris celulares. Assim, o uso da cavitação hidrodinâmica é uma alternativa promissora para extração de proteínas de microalgas, devido ao dano moderado à parede celular, resultando em rendimentos extração adequados, além da simplicidade do sistema e facilidade no aumento de escala.

#### *Extração de pigmentos*

O modelo matemático obtido para representar o rendimento de extração de pigmentos totais foi avaliado pela falta de ajuste, análise de identidade e distribuição de resíduos, obtendo uma boa correlação entre os valores preditos e observados (Figura 4.4A), e um bom coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,84$ ). Os gráficos de superfície de resposta (Figura 4.4B, Figura 4.4C e Figura 4.4D) obtidos a partir dos modelos ajustados, apontam as condições para obter o máximo rendimento de extração de pigmentos.

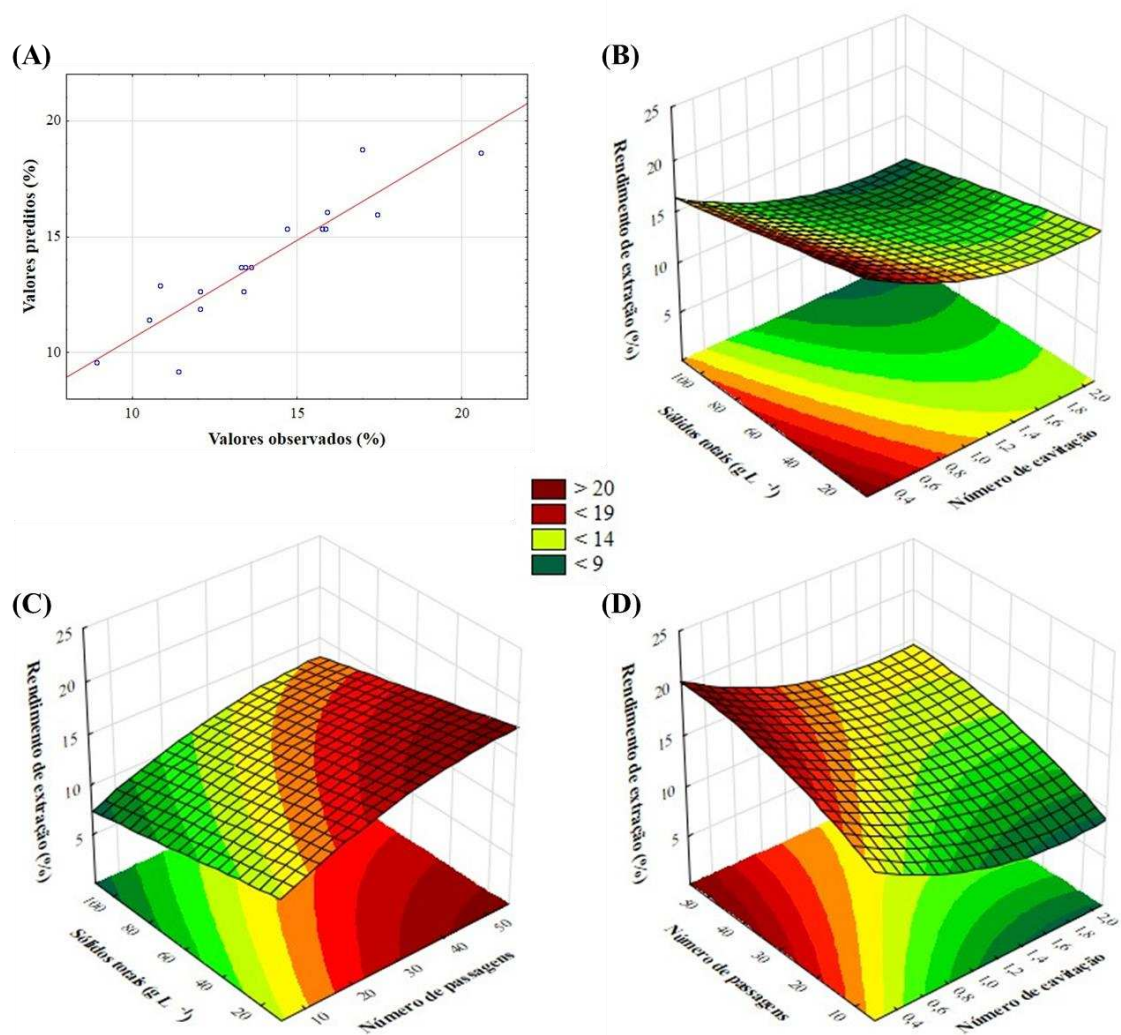


Figura 4.4: (A) gráfico dos valores preditos vs observados e gráficos de superfície de resposta dos fatores (B) ST e NC, (C) ST e NP e (D) NP e NC para o rendimento de extração de pigmentos totais com uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003

O NC foi o fator mais significativo para extração de pigmentos, com maiores rendimentos obtidos com a diminuição desse fator. Em seguida, o NP também apresentou efeito significativo, com maiores rendimentos de extração de pigmentos obtidos com o aumento desse fator. Por fim, o ST apresentou efeito significativo apenas na parte linear do modelo, obtendo maiores rendimentos de extração de pigmentos com a redução na concentração de células na suspensão.

De acordo com as Figura 4.4B, Figura 4.4C e Figura 4.4D, o maior rendimento de extração de pigmentos é aproximadamente 20%. Este baixo rendimento é devido a localização dos pigmentos nas células, que estão armazenados no cloroplasto como parte do mecanismo de captação de luz das células, e são liberados de forma lenta após o rompimento celular (GARCIA et al., 2018). Destaca-se que este é um dos poucos estudos que avaliaram o efeito da cavitação hidrodinâmica no rendimento de extração dos pigmentos. Anteriormente, Lee *et al.* (2015)

avaliaram a liberação de clorofila durante o rompimento por cavitação hidrodinâmica de *Tetraselmis suecica*, porém os pigmentos não eram produto alvo do estudo. Lee e Han (2021) avaliaram a remoção de pigmentos da biomassa de *Chlorella vulgaris* com uso da CH e adição de peróxido de hidrogênio e cloreto férrico como agente oxidante. Recentemente, Akepach *et al.* (2022) verificaram que a cavitação hidrodinâmica melhorou bioacessibilidade de  $\beta$ -caroteno e luteína durante a digestão *in vitro* de *Chlamydomonas reinhardtii*.

#### *Consumo intensivo de energia*

O modelo matemático obtido para representar o consumo intensivo de energia foi avaliado pela falta de ajuste, análise de identidade e distribuição de resíduos, obtendo uma boa correlação entre os valores preditos e observados (Figura 4.5A), e um bom coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,88$ ). Os gráficos de superfície de resposta (Figura 4.5B, Figura 4.5C e Figura 4.5D) obtidos a partir dos modelos ajustados, apontam as condições para obter o mínimo consumo de energia.

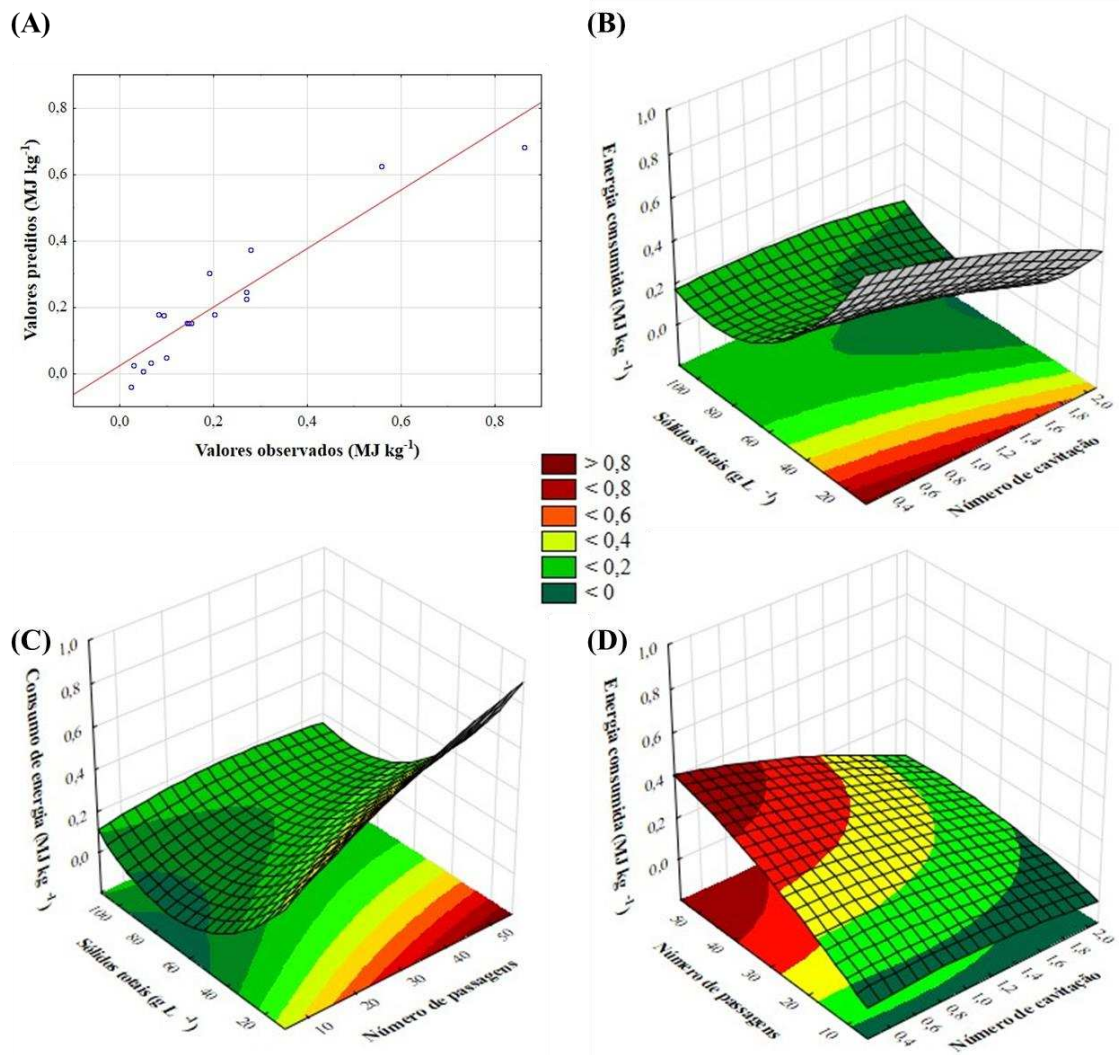


Figura 4.5: (A) gráfico dos valores preditos vs observados e gráficos de superfície de resposta do fatores (B) ST e NC, (C) ST e NP e (D) NP e NC para o consumo intensivo de energia com uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003

No consumo intensivo de energia, o teor de sólidos foi o fator mais significativo, com menor consumo de energia obtido em concentrações de ST maiores. De fato, como a energia consumida pelo sistema foi normalizada pelo teor de massa seca, quanto maior a concentração de sólidos, menor o consumo intensivo de energia. Nas Figura 4.5B e Figura 4.5C é possível observar que o consumo mínimo de energia ( $0,02 \text{ MJ kg}^{-1}$ ) é obtido com ST de aproximadamente  $80 \text{ g L}^{-1}$ , e após esse ponto há uma tendência de aumento no consumo de energia. Setyawan *et al.* (2018) também verificaram aumento no consumo de energia para o rompimento por CH, quando utilizou biomassa de *Nannochloropsis* sp. com concentração acima de  $105 \text{ g L}^{-1}$

O número de passagens também apresentou efeito significativo no consumo intensivo de energia, com menor consumo obtido com a diminuição do NP. Nas Figura 4.5C e Figura

4.5D é possível observar que o menor consumo de energia ( $0,02 \text{ MJ kg}^{-1}$ ) foi verificado com 5 passagens, que se refere ao valor mínimo avaliado neste trabalho.

Por fim, o número de cavitação também apresentou efeito significativo, com menor consumo de energia obtido com NC próximo a 2. Como discutido anteriormente, a maior eficiência de rompimento é obtida com números de cavitação menores, o que implica em uma maior velocidade do escoamento na constrição do Venturi, e consequentemente um maior consumo de energia para aumento da pressão a montante e deslocamento do fluido.

A avaliação do consumo de energia de forma isolada é importante para verificar o comportamento do sistema com as variações dos fatores estudados. Porém, uma avaliação do consumo de energia integrada aos rendimentos de extração de lipídios, proteínas e pigmentos deve ser feita para obter dados do consumo de energia específica para extração de cada composto

#### **4.3.2. Otimização multiobjetivo das condições operacionais da CH**

A partir dos modelos ajustados foi possível otimizar os parâmetros operacionais da cavitação hidrodinâmica, e obter a combinação dos fatores para um maior rendimento de extração de lipídios, proteínas e pigmentos, com um menor consumo de energia, para o rompimento celular de *S. obliquus*. A condição ótima, de acordo com a otimização multiobjetivo é a combinação dos fatores: número de cavitação igual a 0,23, número de passagens igual a 35,0 e concentração de sólidos totais igual a  $49,9 \text{ g L}^{-1}$ . Nessa condição é possível prever a obtenção de 76,7 %, 23,9 % e 19,6 % de rendimento de extração de lipídios, proteínas e pigmentos, respectivamente, com o consumo de energia de  $0,35 \text{ MJ kg}^{-1}$ .

Com os dados obtidos na otimização multiobjetivo foi possível normalizar o consumo de energia com rompimento por CH para cada composto extraído, e comparar com o rompimento por ultrassom (Figura 4.6).

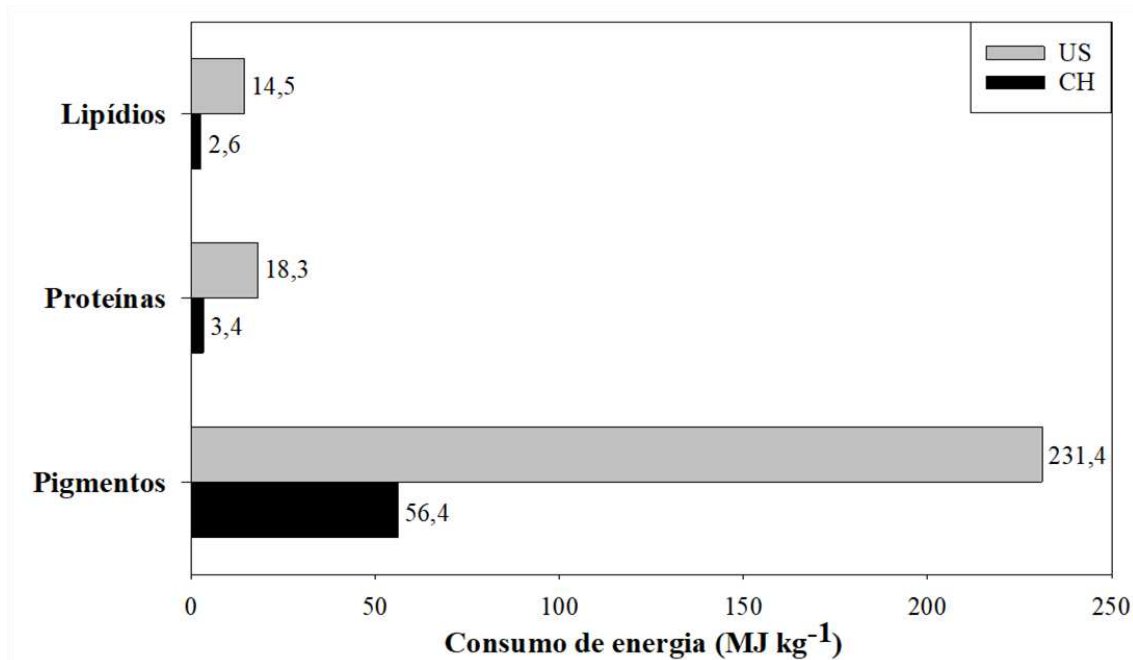


Figura 4.6: Consumo de energia para o rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003 na extração de lipídios, proteínas e pigmentos, utilizando ultrassom (US) e cavitação hidrodinâmica (CH)

O consumo de energia específica para rompimento e extração de lipídios com uso da CH foi 2,6 MJ kg<sup>-1</sup> (Figura 4.6). Esse consumo é 5,5 vezes menor que o consumo de energia com o uso da US. Esse é o menor consumo de energia para o rompimento celular de microalgas com o uso da cavitação hidrodinâmica, em relação aos valores reportados na literatura. Anteriormente, Waghmare *et al.* (2019) obtiveram um consumo de 25,6 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa, para rompimento celular por CH, sendo mais eficiente energeticamente quando comparado com o rompimento por US. Enquanto Setyawan *et al.* (2018) obtiveram um consumo específico de 16,7 MJ kg<sup>-1</sup> de lipídios extraídos de *Nannochloropsis* sp.

A extração de proteínas hidrossolúveis da biomassa de *S. obliquus* BR003 demandou 3,4 MJ kg<sup>-1</sup> com o rompimento por CH (Figura 4.6). Esse consumo foi 5,3 vezes menor quando comparado com o rompimento por US. No entanto, o consumo de energia para rompimento e extração dos pigmentos totais com uso da cavitação hidrodinâmica foi 56,4 MJ kg<sup>-1</sup>, e representa 4,1 vezes menor que o consumo de energia com o uso da US.

Embora a CH e US utilizem do mesmo mecanismo de rompimento (cavitação), o padrão de ruptura celular é diferente. Na cavitação hidrodinâmica a propagação das ondas de choque, devido ao colapso das bolhas cavitantes, ocorre por todo o fluido que passa pelo dispositivo de cavitação, enquanto no ultrassom as ondas se propagam apenas na proximidade do transdutor (LEE; HAN, 2015). Essa diferença no padrão de rompimento é determinante para a maior eficiência energética da cavitação hidrodinâmica, conforme observado neste trabalho. Além da maior eficiência energética, a cavitação hidrodinâmica é mais adequada para aumento de escala,

devido à facilidade de montagem do sistema para geração das bolhas cavitantes, que pode ser obtido simplesmente pela constrição ou introdução de irregularidades no escoamento da suspensão (FARDINPOOR et al., 2021).

#### **4.3.3. Microscopia confocal**

Para verificar o efeito do rompimento celular por cavitação hidrodinâmica, foi realizada imagens de microscopia confocal das células de *Scenedesmus obliquus* BR003 *in natura*, e rompida por CH nas condições operacionais otimizadas, conforme apresentado no item anterior. A microscopia confocal tem sido utilizada para avaliar o efeito do rompimento celular em microalgas por meio da fluorescência dos biomarcadores, para facilitar a visualização ou mesmo confirmar o extravasamento dos compostos intracelulares (CESÁRIO et al., 2022).

As células *in natura* não apresentaram reação positiva para DNA (Figura 4.7A) e proteínas (Figura 4.7D), mas observou-se autofluorescência da clorofila (Figura 4.7B). No tratamento com rompimento por CH houve reação positiva para DNA (Figura 4.7F) e proteínas (Figura 4.7I). A reação positiva para lipídios foi maior no tratamento com rompimento por CH (Figura 4.7H).

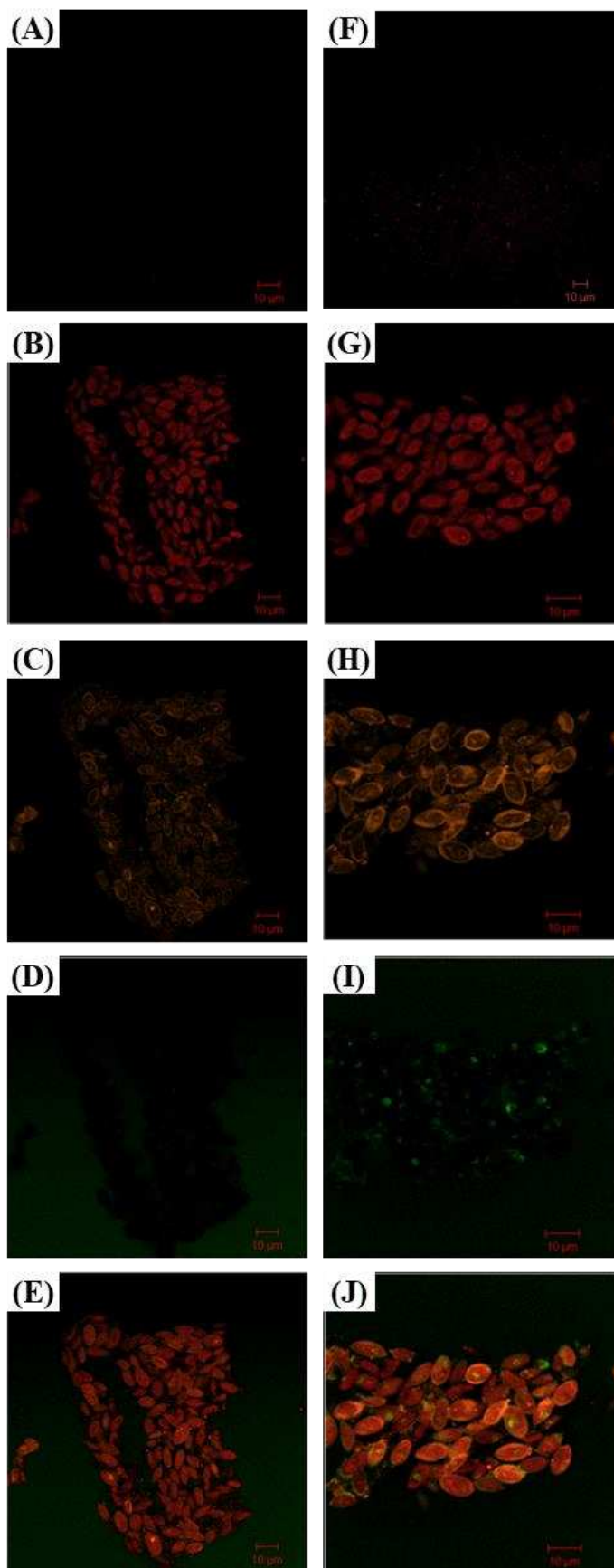


Figura 4.7: Microscopia confocal de *Scenedesmus obliquus* BR003. DNA (A e F), autofluorescência (B e G), lipídios (C e H), proteínas (D e I) e sobreposição (E e J) da microalga *in natura* e rompida por cavitação hidrodinâmica

É possível observar nas Figura 4.7A e Figura 4.7D que a parede celular das células *in natura* não permitiu a entrada dos biomarcadores iodeto de propídio (IP) e isotiocianato de fluoresceína (FITC), que marcam DNA e proteínas, respectivamente. Esses marcadores só atravessam membranas plasmáticas danificadas, e são utilizados como indicador da integridade da membrana celular (CESÁRIO et al., 2022). Após o rompimento por CH, esses marcadores permearam a membrana celular (Figura 4.7F e Figura 4.7I), como indicativo que o rompimento com cavitação hidrodinâmica danificou a parede celular. Também é possível observar que a fluorescência do Vermelho do Nilo é muito mais intensa no tratamento com rompimento celular (Figura 4.7H), indicando que os lipídios estão disponíveis para extração.

Embora a maioria das células rompidas por CH mantiveram o seu formato idêntico às células *in natura*, o aumento da fluorescência dos marcadores de DNA, lipídios e proteínas indicam que houve dano na parede celular suficiente para extração destes compostos. Lee *et al.* (2015) verificaram que fragmentação de toda a célula não aumentou a eficiência de extração de lipídios. Enquanto Natarajan *et al.* (2014) observaram que a membrana celular fragmentada forma bastonetes para retenção dos lipídios, contribuindo com a menor eficiência de extração deste composto. Safi *et al.* (2017) e Postma *et al.* (2015) observaram que máximo de extração de proteínas é alcançado em condições mais suaves de rompimento celular, sem a necessidade de fragmentação excessiva da célula.

#### **4.3.4. Efeito do pH no rompimento celular por CH**

O efeito da adição de NaOH na eficiência do rompimento celular de *S. obliquus* BR003 por CH foi avaliada nas condições operacionais otimizadas da cavitação hidrodinâmica. O pH da suspensão de microalgas foi ajustado antes do rompimento, com adição de NaOH, obtendo-se as concentrações de 0,02, 0,06 e 0,1 % (m v<sup>-1</sup>) para o pH 8,5, 10 e 11,5, respectivamente. Na Tabela 4.5 são apresentados os rendimentos de extração de lipídios, proteínas e pigmentos, assim como os compostos fenólicos, obtidos após o rompimento por CH e variação do pH da suspensão.

Tabela 4.5: Rendimento de extração dos compostos intracelulares de *Scenedesmus obliquus* BR003 após rompimento por cavitação hidrodinâmica e ajuste do pH da suspensão. Médias seguidas do desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%

Tratamento	Rendimento de extração (%)			Compostos Fenólicos (mg AGE g <sup>-1</sup> )
	Lipídios	Proteínas	Pigmentos	
pH7,0	77,62 ± 3,11 a	24,47 ± 0,34 c	19,72 ± 0,97 c	4,61 ± 0,21 b
pH8,5	78,06 ± 2,61 a	29,12 ± 0,28 b	22,82 ± 1,08 b	5,40 ± 0,09 a
pH10,0	82,09 ± 3,89 a	38,98 ± 0,34 a	27,61 ± 0,38 a	5,26 ± 0,11 a
pH11,5	66,99 ± 3,00 b	39,29 ± 0,36 a	23,29 ± 0,28 b	4,23 ± 0,15 b

O rendimento de extração de lipídios não apresentou diferença significativa até o pH 10 (p-valor > 0,05) (Tabela 4.5). No pH 11,5 observou uma redução no rendimento de extração desse composto. Embora o tratamento alcalino seja reconhecido pela eficiência no rompimento celular (FARDINPOOR et al., 2021; LORENZO-HERNANDO et al., 2019; WAGHMARE et al., 2019), a extração de lipídios é comprometida em pH mais alto. No pH 11,5 pode ter ocorrido a saponificação, transformando os lipídios em sais de ácido graxo e sódio (LORENZO-HERNANDO et al., 2019). Esses sais possuem uma extremidade polar e outra apolar, e podem permanecer na fração aquosa no momento da extração com uso de solventes orgânicos.

O aumento no pH foi responsável por maiores rendimentos de extração de proteínas. No pH 10 houve um incremento de 60% no rendimento de extração, quando comparado com o tratamento com pH 7 (Tabela 4.5). O aumento do pH para 11,5 não apresentou diferença significativa na extração de proteínas (p-valor > 0,05). A extração alcalina é uma técnica muito utilizada para extrair as proteínas hidrossolúveis das microalgas, devido a maior solubilidade desse composto em pH alto (AMORIM et al., 2020; ANSARI et al., 2017; PHONG et al., 2018; SILVA et al., 2020). Além da solubilização das proteínas, o pH alcalino contribui com desintegração da parede celular, e melhora a eficiência da cavitação hidrodinâmica devido ao aumento na concentração de radicais hidroxila no meio, que é um poderoso oxidante que também promove o rompimento celular (FARDINPOOR et al., 2021; WAGHMARE et al., 2019).

O rendimento de extração de pigmentos foi crescente até o pH 10, com incremento de 40% quando comparado com o tratamento com pH 7 (Tabela 4.5). No pH 11,5, o rendimento de extração reduziu, obtendo-se valor idêntico ao tratamento com pH 8,5. Essa redução ocorreu devido a elevação da temperatura na zona de cavitação e aumento da concentração de radicais livres, capazes de degradar os pigmentos (LJUBIC; SAFAFAR; JACOBSEN, 2019; WAGHMARE et al., 2019). O mesmo comportamento foi observado com os compostos

fenólicos extraídos, indicando que o rompimento por CH no pH 11,5 degradou parte dos compostos fenólicos presentes no meio.

Na Figura 4.8 observa-se que o pH da suspensão de microalgas diminuiu após o rompimento celular em todos os tratamentos. Isso ocorreu devido a liberação de compostos intracelulares e pelas reações químicas durante o processo de cavitação hidrodinâmica (FARDINPOOR et al., 2021).

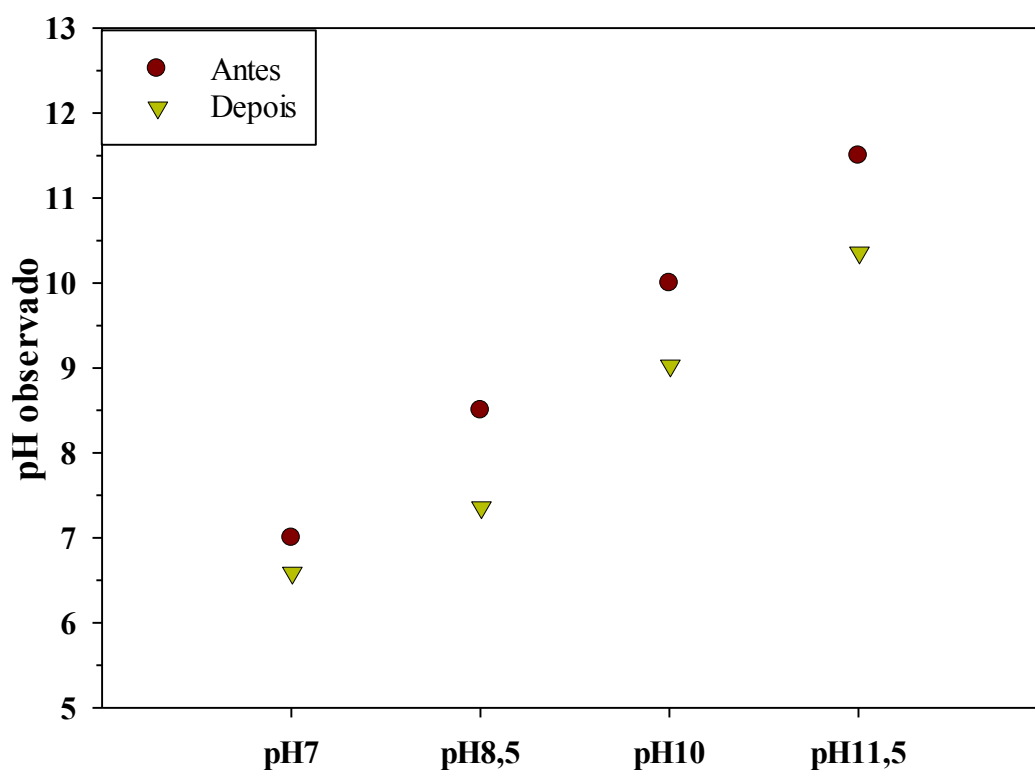


Figura 4.8: Redução no pH da suspensão após o rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003 por cavitação hidrodinâmica

Visando identificar possíveis alterações nos compostos intracelulares, a Tabela 4.6 apresenta o perfil de ácidos graxos de *S. obliquus* BR003 após o rompimento celular por CH e adição de NaOH. A biomassa liofilizada e sem rompimento (SR) foi utilizada como controle.

Tabela 4.6: Composição de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAMES) dos lipídios de *Scenedesmus obliquus* BR003 rompida por cavitação hidrodinâmica, e com pH diferentes

FAMES (%)	SR <sup>1</sup>	pH7	pH8,5	pH10	pH11,5
C12:0 (Laurico)	1,18	1,38	1,75	2,02	1,93
C14:1 (Miristoleico)	1,40	1,55	1,65	-	1,02
C16:0 (Palmítico)	14,40	15,30	14,54	16,91	18,17
C16:1 (Palmitoleico)	6,66	6,83	6,61	7,83	5,29
C17:1 (Heptadecanoico)	1,67	-	1,75	-	
C18:0 (Esterárico)	0,38	0,72	0,68	-	1,78
C18:1n9t (Elaidico)	1,94	2,68	2,078	2,27	3,11
C18:1n9c (Oleico)	6,36	6,64	5,86	6,93	10,67
C18:2n6t (Linoelaidico)	16,18	13,04	15,15	-	14,22
C18:2n6c (Linoleico)	11,19	13,69	11,34	13,45	13,88
C18:3n3 ( $\alpha$ -Linolenico)	36,81	28,05	36,46	27,48	27,96
C21:0 (Heicosanoico)	1,75	2,07	2,08	2,78	-
C20:2 (cis-11,14-Eicosadienoic)	-	1,90	-	1,90	1,97
AG Saturados	17,72	19,49	19,071	21,72	21,88
AG Monoinsaturados	18,06	16,76	17,96	17,04	20,09
AG Poli-insaturados	64,20	63,61	62,96	61,25	58,03

<sup>(1)</sup> SR representa a biomassa liofilizada sem romper.

Conforme apresentado na Tabela 4.6, os principais ácidos graxos encontrados nos lipídios extraídos foram: C16:0 (Palmítico), C16:1 (palmitoleico), C18:1 (Oléico), C18:2n6t (Linoelaidico), C18:2n6c (Linoléico) e C18:3 (Linolênico). Esses ácidos graxos representam mais de 90% do total de FAMES, e são responsáveis por garantir a qualidade e propriedades do biodiesel (WU et al., 2017). O rompimento por cavitação hidrodinâmica aumentou o percentual de ácidos graxos saturados e reduziu a quantidade de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturado. O mesmo comportamento foi observado ao aumentar a concentração de NaOH, para ajuste do pH nos tratamentos alcalinos. Como já discutido, a cavitação hidrodinâmica produz ondas de choque responsável pelo aumento da temperatura na zona de cavitação, além da dissociação de moléculas de água em radical hidroxila, que é um poderoso oxidante (FARDINPOOR et al., 2021; WAGHMARE et al., 2019). Essa condição é favorável para a oxidação dos ácidos graxos, em maior intensidade nos poli-insaturados, que majoritariamente são encontrados na membrana celular das microalgas, e expostos para a oxidação após o rompimento celular (LJUBIC; SAFAFAR; JACOBSEN, 2019)

A eficiência do rompimento celular de *S. obliquus* com uso da cavitação hidrodinâmica nas condições otimizadas, pode ser melhorada com o ajuste do pH da solução até 10. Nessa condição há um incremento no rendimento de extração de proteínas e pigmentos. Porém, se faz

necessário que estudos futuros avalie a qualidade destes compostos após o rompimento celular, visto que houve alteração no perfil de ácidos graxos após o processamento por CH assistida pelo aumento de pH. Os processos que ocorrem na zona de cavitação, como a elevação de temperatura e a formação de radicais livres são potencializadas em condições alcalinas, e podem oxidar compostos orgânicos, ou alterar a composição e qualidade dos produtos de interesse (WAGHMARE et al., 2019).

#### 4.4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi efetuada a otimização das condições operacionais para rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003 por cavitação hidrodinâmica. O número de cavitação e de passagens pelo sistema, assim como a concentração de sólidos totais, apresentaram efeito significativo no desempenho da extração de lipídios, proteínas e pigmentos, assim como para o consumo intensivo de energia. O consumo de energia com o uso da cavitação hidrodinâmica foi 5,5, 5,3 e 4,1 vezes menor quando comparado com o rompimento por ultrassom, para extração de lipídios, proteínas e pigmentos, respectivamente.

O uso combinado da cavitação hidrodinâmica e elevação de pH no processamento da suspensão de microalgas foi responsável pelo aumento de 60 % nos teores extraídos de proteínas e 40% de pigmentos, no pH 10. Porém, o rompimento em pH mais alto foi responsável pela degradação de compostos orgânicos e degradação de ácidos graxos poli-insaturados. Assim, de acordo com os resultados deste trabalho, o uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular das microalgas pode contribuir com o aumento da eficiência de extração e melhoria da eficiência energética do processamento das microalgas para a produção de alimentos, biocombustíveis e energia.

#### 4.5. REFERÊNCIAS

- AKEPACH, P. et al. Bioaccessibility of carotenoids ( $\beta$ -carotene and lutein) from intact and disrupted microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii*). **LWT**, v. 160, p. 113292, abr. 2022.
- ALHATTAB, M.; KERMANSHAHI-POUR, A.; BROOKS, M. S.-L. Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 61–88, 4 fev. 2019.
- AMORIM, M. L. et al. Extraction of proteins from the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 followed by lipid extraction of the wet deproteinized biomass using hexane and ethyl acetate. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123190, 1 jul. 2020.

- AMORIM, M. L. et al. Pilot-scale biorefining of *Scenedesmus obliquus* for the production of lipids and proteins. **Separation and Purification Technology**, v. 270, p. 118775, set. 2021.
- ANSARI, F. A. et al. Exploration of Microalgae Biorefinery by Optimizing Sequential Extraction of Major Metabolites from *Scenedesmus obliquus*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 12, p. 3407–3412, 29 mar. 2017.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23th. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- CARVALHO, J. C. DE et al. Bioresource Technology Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels , food , and feed. **Bioresource Technology**, v. 300, n. December 2019, p. 122719, 2020.
- CESÁRIO, C. DO C. et al. Biochemical and morphological characterization of freshwater microalga *Tetrademus obliquus* (*Chlorophyta: Chlorophyceae*). **Protoplasma**, v. 259, n. 4, p. 937–948, 13 jul. 2022.
- FARDINPOOR, M. et al. Effects of Hydrodynamic Cavitation-Assisted NaOH Pretreatment on Biofuel Production from Cyanobacteria: Promising Approach. **BioEnergy Research** **2021 15:1**, v. 15, n. 1, p. 289–302, 1 maio 2021.
- FRANC, J.-P.; MICHEL, J.-M. **Fundamentals of Cavitation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005. v. 76
- GARCIA, E. S. et al. Bioresource Technology Selective and energy efficient extraction of functional proteins from microalgae for food applications. v. 268, n. June, p. 197–203, 2018.
- GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal** Elsevier, , 15 abr. 2009.
- GONZÁLEZ-BALDERAS, R. M. et al. Identification and effect of ozone and ultrasound pretreatments on *Desmodesmus* sp. and *Tetrademus obliquus* proteins. **Algal Research**, v. 60, p. 102514, 1 dez. 2021.
- GONZALEZ-FERNANDEZ, C. et al. Biochemical methane potential of microalgae biomass using different microbial inocula. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 184, 29 dez. 2018.
- GRUBER-BRUNHUMER, M. R. et al. Associated effects of storage and mechanical pretreatments of microalgae biomass on biomethane yields in anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 259–268, 1 out. 2016.
- HUERTA, R. R. et al. Clove essential oil emulsion-filled cellulose nanofiber hydrogel produced by high-intensity ultrasound technology for tissue engineering applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 64, p. 104845, 1 jun. 2020.

- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Cheese and processed cheese products: determination of fat content - gravimetric method - reference method. p. 7, 1987.
- KHOO, C. G. et al. Algae biorefinery: Review on a broad spectrum of downstream processes and products. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2019.
- KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1834–1846, dez. 2015.
- KULDEEP; SAHARAN, V. K. Computational study of different venturi and orifice type hydrodynamic cavitating devices. **Journal of Hydrodynamics**, v. 28, n. 2, p. 293–305, 1 abr. 2016.
- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1881–1889, 16 out. 2015.
- LEE, I.; HAN, J.-I. Development of a pretreatment method based on Fenton-like reaction combined with hydrodynamic cavitation for lipid extraction from wet microalgae. **Renewable Energy**, v. 175, p. 415–421, set. 2021.
- LEE, I.; HAN, J. I. Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 246–251, 1 jun. 2015.
- LEE, I.; OH, Y.-K.; HAN, J.-I. Design optimization of hydrodynamic cavitation for effectual lipid extraction from wet microalgae. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 102942, 1 abr. 2019.
- LEE, S. Y. et al. Single-step disruption and protein recovery from *Chlorella vulgaris* using ultrasonication and ionic liquid buffer aqueous solutions as extractive solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 124, p. 26–35, ago. 2017.
- LJUBIC, A.; SAFAFAR, H.; JACOBSEN, C. Recovery of microalgal biomass and metabolites from homogenized, swirl flash-dried microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 4, p. 2355–2363, 11 ago. 2019.
- LORENZO-HERNANDO, A. et al. Recovery of proteins from biomass grown in pig manure microalgae-based treatment plants by alkaline hydrolysis and acidic precipitation. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 599–607, 1 fev. 2019.
- MAHMOOD, W. M. A. W.; THEODOROPOULOS, C.; GONZALEZ-MIQUEL, M. Enhanced microalgal lipid extraction using bio-based solvents for sustainable biofuel production. **Green Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 5723–5733, 27 nov. 2017.
- MASUKO, T. et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69–72, 1 abr. 2005.
- MOLINO, A. et al. Microalgae Characterization for Consolidated and New Application in Human Food, Animal Feed and Nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2018, Vol. 15, Page 2436, v. 15, n. 11,

- p. 2436, 1 nov. 2018.
- MULEY, A. B. et al. Production of biologically active peptides by hydrolysis of whey protein isolates using hydrodynamic cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 71, p. 105385, 1 mar. 2021.
- NATARAJAN, R. et al. Lipid releasing characteristics of microalgae species through continuous ultrasonication. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 7–11, 1 abr. 2014.
- ONUMAEGBU, C. et al. Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews Elsevier Ltd.**, 1 out. 2018.
- PANCHA, I. et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, mar. 2014.
- PHONG, W. N. et al. Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 135, p. 83–90, jul. 2018.
- POSTMA, P. R. et al. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 297–304, 1 maio 2015.
- RASHIDI, B.; TRINDADE, L. M. Detailed biochemical and morphologic characteristics of the green microalga *Nannochloris oleoabundans* cell wall. **Algal Research**, v. 35, p. 152–159, 1 nov. 2018.
- ROCHA, D. N. et al. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121644, out. 2019.
- SAFI, C. et al. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. **Algal Research**, v. 8, p. 61–68, 1 mar. 2015.
- SAFI, C. et al. Energy consumption and water-soluble protein release by cell wall disruption of *Nannochloropsis gaditana*. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 204–210, 1 set. 2017.
- SETYAWAN, M. et al. Optimum extraction of algae-oil from microalgae using hydrodynamic cavitation. **International Journal of Renewable Energy Research**, v. 8, n. 1, p. 451–458, 2018.
- SETYAWAN, M.; MULYONO, P.; SURYA, Y. Effect of Devices and Driving Pressures on Energy Requirements and Mass Transfer Coefficient on Microalgae Lipid Extraction Assisted by Hydrodynamic Cavitation. v. 9, n. 3, p. 467–473, 2020.
- SILVA, M. E. T. DA et al. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 103711, fev. 2020.
- VELJKOVIĆ, V. B. et al. Modeling of biodiesel production: Performance comparison of Box–Behnken, face central composite and full factorial design. **Chinese Journal of**

- Chemical Engineering**, v. 27, n. 7, p. 1690–1698, jul. 2019.
- VIEIRA, B. B. et al. Optimized extraction of neutral carbohydrates, crude lipids and photosynthetic pigments from the wet biomass of the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. **Separation and Purification Technology**, v. 269, p. 118711, 15 ago. 2021.
- WAGHMARE, A. et al. Hydrodynamic cavitation for energy efficient and scalable process of microalgae cell disruption. **Algal Research**, v. 40, n. March, p. 101496, 2019.
- WU, J. et al. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 71, p. 323–329, 2017.
- XU, S. et al. Evaluation of bioethanol and biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* grown in biodiesel waste glycerol: A sequential integrated route for enhanced energy recovery. **Energy Conversion and Management**, v. 197, p. 111907, 1 out. 2019.

## 5. CAPÍTULO III: Racionalização de energia do processamento da biomassa de *Scenedesmus obliquus* para produção de alimentos e energia

### RESUMO

A viabilidade de uso das microalgas como matéria prima para produção de alimentos e energia depende fortemente dos custos e eficiência energética dos processos utilizados na extração dos compostos de interesse. O desempenho do rompimento de células por cavitação hidrodinâmica (CH) foi avaliado para a extração de metabólitos. Essa operação unitária foi integrada aos processos de extração de lipídios e proteínas de *Scenedesmus obliquus* BR003, e avaliada quanto a eficiência energética e na recuperação de energia da biomassa residual por meio da digestão anaeróbia. Com o uso da CH o rendimento de extração de proteínas (PE) foi 36%, enquanto o rendimento de extração de lipídios (LE) foi 46,5%. Ao extrair os lipídios da biomassa desproteïnizada (PLE) o rendimento foi menor (32,1%), pois parte dos lipídios foram extraídos junto com o concentrado proteico. Os rendimentos obtidos com o uso da CH foram menores 27%, 20% e 8%, quando comparado com o rompimento por ultrassom (US), para LE, PE e PLE, respectivamente. A digestão anaeróbia permitiu um incremento de 67,5% e 68,7% da energia recuperada da biomassa LE e PLE com o uso da CH. A CH apresentou um consumo de energia 5,5 vezes menor que US, e as rotas de extração de lipídios seguida da digestão anaeróbia da biomassa residual foram as que apresentaram as melhores razão de energia líquida (REL). Assim, conforme os resultados obtidos neste trabalho, a CH é um método promissor para rompimento celular e redução do consumo de energia. Além disso, embora as rotas de extração de proteínas não tenham apresentado boa eficiência energética, a extração desse composto é uma estratégia promissora para agregar valor à cadeia de produção de microalgas, já que o preço desse produto é oito vezes maior que o preço de mercado do óleo de microalgas.

**PALAVRAS-CHAVE:** cavitação hidrodinâmica; digestão anaeróbia; proteínas; lipídios; razão de energia líquida; *Tetradismus obliquus*.

## 5.1. INTRODUÇÃO

As microalgas têm se destacado pelo grande potencial de produção de biomassa (ROCHA et al., 2019), possibilidade de uso nos setores agrícolas, de alimentos e biomédicos (GONZÁLEZ-BALDERAS et al., 2021; MOLINO et al., 2018; SILVA et al., 2020), e também como fonte de matéria-prima para a produção de biocombustíveis, tais como o biodiesel, etanol e biogás (GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2018; MAHMOOD; THEODOROPOULOS; GONZALEZ-MIQUEL, 2017; XU et al., 2019). Dentre suas vantagens destacam-se a eficiência fotossintética, de 10 a 50 vezes maior que as plantas vasculares, a elevada capacidade de produção de biomassa por unidade de área, além da natureza não competitiva com o setor de alimentos (KLIGERMAN; BOUWER, 2015).

Dentre as microalgas verdes, o gênero *Scenedesmus* é um dos mais estudados para produção de biocombustíveis e alimentos. Esse gênero é composto por várias espécies que despertam grande interesse na produção de biodiesel, etanol, biogás, bio-óleo e carvão, além de alimentos, rações e nutracêuticos (KHOO et al., 2019). A linhagem *S. obliquus* apresenta uma alta taxa de crescimento, resistência à contaminação microbiana e predadores quando cultivada em tanques abertos (ROCHA et al., 2019). Além disso, a sua biomassa é composta majoritariamente por proteínas, lipídios e carboidratos, podendo ser consumida in natura por ser atóxica (AMORIM et al., 2021; SILVA et al., 2020)

Para extração dos compostos intracelulares das microalgas é necessário a escolha de métodos de extração que sejam viáveis economicamente e energeticamente. O método de extração de proteínas mais utilizado é a extração alcalina e precipitação ácida, ajustando-se o pH para o ponto isoelétrico das proteínas da microalga (SILVA et al., 2020). Já a extração de lipídios das células ocorre majoritariamente com uso de solventes orgânicos, em sistemas líquido-líquido (DU; SCHUUR; BRILMAN, 2017).

A eficiência de extração das proteínas e lipídios é fortemente dependente do nível de rompimento celular para que os solventes consigam solubilizar e extrair os compostos de interesse (DE CARVALHO et al., 2019). O rompimento por ultrassom é reconhecido como um dos métodos mais eficientes, pois a cavitação acústica promove a geração de grande força de cisalhamento que é responsável pelo dano na parede e membrana celular, porém a sua aplicabilidade depende da eficiência energética e viabilidade econômica (SPOSOB et al., 2020). A cavitação hidrodinâmica é um método que utiliza o mesmo princípio do ultrassom, que é a geração e o colapso de bolhas no meio líquido pela cavitação, responsável por desencadear efeitos físicos e químicos que levam ao rompimento da parede celular (MULEY et al., 2021).

A cavitação hidrodinâmica tem emergido como método promissor pela simplicidade do sistema, facilidade no aumento de escala, baixo custo de implantação e baixo consumo de energia quando comparado a outros métodos de rompimento mecânicos (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; WAGHMARE et al., 2019). Waghmare et al. (2019) obtiveram 96,4% de eficiência de extração de lipídios em *Chlorella pyrenoidosa*, com consumo de energia 6,3 vezes menor quando comparado com o rompimento por ultrassom. Lee et al. (2015) verificaram um consumo de 3,0 MJ kg<sup>-1</sup> de biomassa seca para extração de lipídios de *Tetraselmis suecica*. Porém, não há estudos que avaliaram a eficiência energética da cavitação hidrodinâmica integrada as operações unitárias de extração de lipídios e proteínas em microalgas com subsequente digestão anaeróbia desses efluentes.

A eficiência energética das operações unitárias de extração dos compostos de interesse das microalgas é um fator-chave para determinar a viabilidade econômica e energética do uso das microalgas como matéria prima para produção de alimentos e energia (PRÉAT et al., 2020). A extração de proteínas e lipídios de microalgas apresentam uma baixa eficiência energética quando comparada com culturas tradicionais, como por exemplo a soja (TREDICI et al., 2015). Assim, para se tornar viável o uso das microalgas como fonte de alimentos e energia, é necessário identificar rotas com maior eficiência energética para extração dos compostos de interesse.

Após a extração dos lipídios e proteínas há a geração de um resíduo que representa de 60 a 85% (em base seca) da biomassa inicial (PRÉAT et al., 2020), além da água proveniente do cultivo. Essa biomassa residual é formada por compostos orgânicos rico em carbono e nitrogênio, presos aos fragmentos da parede celular (GÜNERKEN et al., 2015). Rocha et al. (2020) verificaram que a biomassa desengordurada de *S. obliquus* continha uma energia de 16,7 MJ kg<sup>-1</sup>, e continha 38% de proteínas, 2,2% de lipídios e 22% de carboidratos. Assim, a digestão anaeróbia da biomassa residual é uma estratégia para recuperar energia por meio da produção de metano, e contribui para a eficiência energética dos processos de extração de lipídios e proteínas (GANESH et al., 2018). Vários trabalhos têm verificado o potencial de uso dessa biomassa para produção de metano e recuperação de energia (MARKOU et al., 2020; ROKICKA et al., 2020), porém, não há trabalhos publicados com *S. obliquus* que avaliaram o efeito do rompimento por cavitação hidrodinâmica na produção de metano.

A melhoria na eficiência energética do processamento da biomassa após a coleta depende dos rendimentos de extração dos compostos de interesse, além da eficiência de cada operação unitária utilizada. No presente trabalho avaliou-se o efeito do rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003 por cavitação hidrodinâmica nos rendimentos de extração de

lipídios e proteínas, assim como na produção de metano por meio da digestão anaeróbia da biomassa residual. As biomassas rompidas por ultrassom e in natura foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. As eficiências energéticas das rotas propostas foram avaliadas, visando uma produção sustentável e integrada de energia e alimentos a partir das microalgas.

## **5.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1. Produção da biomassa**

A linhagem *S. obliquus* BR003 foi obtida da coleção do Laboratório de Biocombustíveis, do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. As microalgas foram cultivadas em tanque aberto tipo *raceway* com capacidade de 4000 L e meio de cultura formulado com água da rede de abastecimento e fertilizantes agrícolas, conforme (ROCHA et al., 2019). O carbono foi fornecido por meio da injeção de gás de combustão, com aproximadamente 12% (v v<sup>-1</sup>) de CO<sub>2</sub>. A intensidade média diária de radiação foi 752,1  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sob luz solar direta, com temperatura entre 20 e 30 °C. O crescimento da cultura foi monitorado diariamente pela densidade óptica a 750 nm medida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO, Alemanha).

A biomassa foi coletada ao atingir a fase estacionária de crescimento, e concentrada pelo processo de floculação com poliamina catiônica (SNF Floerger, França). Em seguida, a biomassa foi disposta em mesa de filtração com tecido com porosidade média de 100  $\mu\text{m}$ . A biomassa coletada foi armazenada a -20°C em recipientes estéreis até a realização dos experimentos.

### **5.2.2. Rompimento celular**

A biomassa úmida foi rompida utilizando dois métodos: ultrassom (US) e cavitação hidrodinâmica (CH). O teor de sólidos da biomassa foi padronizado em 4,3% (m v<sup>-1</sup>), que consiste nos teores típicos obtidos na etapa de floculação e espessamento. O rompimento por US foi realizado utilizando-se um processador ultrassônico (VCX 750, Sonics & Materials, EUA) com sonda de 13 mm e frequência 20 kHz. Um volume de 500 mL de suspensão de microalgas foi sonicada por 5 min em banho de gelo para evitar o aquecimento da amostra.

O rompimento por CH foi realizado em um reator composto por reservatório com volume útil de 6 L, uma bomba centrífuga de 5,5 kWh (ME-AL 2375, Schneider, EUA) e um dispositivo de cavitação (Venturi) com diâmetro da garganta de 1,3 mm, ângulo de convergência de 23,5° e divergência de 6,5°, e a relação diâmetro: comprimento da garganta

igual a 1:1 (KULDEEP; SAHARAN, 2016). O número de cavitação utilizado foi de 0,23, definido em testes preliminares e obtido com o ajuste da velocidade do escoamento e da pressão a montante do dispositivo de cavitação. A biomassa foi rompida após 35 ciclos no reator. A temperatura da suspensão de microalgas foi mantida abaixo de 35 °C com o auxílio de um trocador de calor.

### **5.2.3. Extração de proteínas e lipídios**

A biomassa rompida por US, CH e sem romper (SR) foram utilizadas para extração de proteínas (PE), extração dos lipídios (LE) e extração de proteínas seguida da extração de lipídios (PLE). A biomassa sem extração dos compostos (C) foi utilizada como controle.

A extração das proteínas foi realizada conforme método reportado por Silva et al. (2021), em que o pH da suspensão de microalgas foi ajustado para 10, seguido de agitação em reator (MA 502/D, Marconi, Brasil) com volume útil de 0,5 L e agitador com potência de 100 W. A agitação foi de 1.500 rpm por 1 hora e a temperatura de 25°C. Após a agitação, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante com as proteínas foi coletado. Para um melhor rendimento de extração de proteína, a biomassa residual (pellet) foi ressuspendida em água deionizada, e o pH ajustado novamente para 10. Os sobrenadantes com as proteínas solúveis tiveram o pH ajustado para 2,5 (ponto isoelétrico) para precipitação das proteínas, seguido de centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos. A massa do concentrado proteico extraído foi determinada por gravimetria após secagem por liofilização (L101, Liobras, Brasil). O sobrenadante, aqui denominado de água residuária da extração de proteína (ARP), foi separado para análise da sua composição. Foram realizadas três extrações subsequentes nas mesmas condições descritas anteriormente. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

Os lipídios foram extraídos utilizando o solvente acetato de etila (pureza 99,5%, Êxodo científica) na proporção 1:1 (solvente: biomassa úmida), em reator (MA 502/D, Marconi, Brasil) com volume útil de 0,5 L e agitador com potência de 100 W. A agitação foi de 250 rpm por 10 minutos e temperatura de 25°C. Após a agitação, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante com o extrato apolar, contendo solvente e lipídios, foi separado para posterior evaporação do solvente em evaporador rotativo (Rotavapor R-100, Buchi, Suíça). Foram realizadas cinco extrações subsequentes nas mesmas condições descritas anteriormente. Todas as extrações foram realizadas em triplicata. Os lipídios foram quantificados por gravimetria e o teor foi expresso em porcentagem em relação a massa seca da microalga.

#### 5.2.4. Teste de Potencial Bioquímico de Metano

O teste de potencial bioquímico de produção de metano (BMP, na sigla em inglês) foi realizado conforme as recomendações de Holliger et al. (2016), em frascos de 120 mL, e preenchido com 60 mL de uma mistura de inóculo anaeróbico e microalgas na proporção de 2:1 ( $SV_{\text{inóculo}}: SV_{\text{substrato}}$ ). A concentração de sólidos totais foi padronizada em  $10 \text{ g L}^{-1}$  para todos os ensaios, conforme recomendado por Alzate et al. (2012). A alcalinidade (medida como equivalente de  $\text{CaCO}_3$ ) do inóculo foi ajustada para  $3,1 \text{ g L}^{-1}$  com a adição de  $5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ , para garantir a capacidade tamponante durante o ensaio, conforme proposto por Holliger et al. (2016). Os frascos foram fechados com septos de borracha butílica e selados com lacres de alumínio. Em seguida, as amostras foram purgadas com nitrogênio e dispostas em incubadora a  $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  com agitação orbital a 60 rpm (430-RFPDE, Nova Ética, Brasil). O volume do biogás produzido foi monitorado por medições periódicas da pressão da parte superior do frasco contendo a fase gasosa (headspace) com manômetro digital (MVR-87, Instrutherm, Brasil). O teor de metano no biogás foi determinado por cromatografia (CG-FID 7820A, Agilent Technologies EUA), padronizado para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP), e expresso em volume de  $\text{CH}_4$  por unidade de massa de sólidos voláteis.

O tratamento controle negativo, com apenas inóculo, foi utilizado para quantificar a produção endógena de metano, que foi subtraído da produção de metano dos tratamentos com microalgas. A celulose microcristalina em pó foi utilizada como substrato para o tratamento controle positivo. O experimento foi encerrado assim que a produção diária de metano ficou abaixo de 1% do volume acumulado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A eficiência de conversão de energia da digestão anaeróbia ( $\eta_{DA}$ , em %) foi determinada como a razão entre a produção observada ( $PCH_4$ ) e teórica de metano ( $PCH_{4,t}$ ) (Equação 5.1). A produção teórica foi determinada com base na quantidade de DQO dos substratos e no rendimento de  $350 \text{ mL CH}_4/\text{g DQO}$  em condições padrão de temperatura e pressão (HU et al., 2021).

$$\eta_{DA} = 100 \frac{PCH_4}{PCH_{4,t}} \quad (5.1)$$

A solubilidade ( $S$ , em %) foi determinada como a razão entre a DQO solúvel ( $DQO_S$ ) e DQO total ( $DQO_T$ ) dos substratos utilizados nos testes de BMP (Equação 5.2). A solubilidade representa o percentual de matéria orgânica particulada que foi transformada em matéria orgânica solúvel.

$$S = 100 \frac{DQO_S}{DQO_T} \quad (5.2)$$

Os modelos de primeira ordem (Equação 5.3) e Gompertz modificado (Equação 5.4) foram utilizados para descrever a cinética de produção de metano. Esses modelos foram escolhidos por serem os mais utilizados na literatura para modelagem de dados experimentais de produção de metano (MOHSENI; FAN; RODDICK, 2021).

$$Y(t) = Y_m [1 - \exp(-kt)] \quad (5.3)$$

$$Y_{(t)} = Y_m \exp \left[ - \exp \frac{(K e^{(\lambda - t_i)})}{Y_m} + 1 \right] \quad (5.4)$$

em que,  $Y(t)$  (mL CH<sub>4</sub> gSV<sup>-1</sup>) é o rendimento de metano no tempo  $t$  (d),  $Y_m$  (mL CH<sub>4</sub> gSV<sup>-1</sup>) é o rendimento máximo de metano,  $k$  (d<sup>-1</sup>) é a constante de primeira ordem,  $K$  (mL CH<sub>4</sub> gSV d<sup>-1</sup>) é a taxa específica de produção de metano,  $\lambda$  (d) é a extensão da fase de lag, e  $e$  é o número de Euler (2,71828). Os valores de  $Y_m$ ,  $k$ ,  $K$  e  $\lambda$  foram encontrados minimizando a soma de quadrados dos resíduos, pelo o método de gradiente reduzido generalizado não linear (MOHSENI; FAN; RODDICK, 2021). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a raiz do erro quadrático médio (RMSE, do inglês) normalizado em relação aos valores observados, foram calculados para avaliar o ajuste dos modelos (SCARCELLI et al., 2020).

### 5.2.5. Balanço de energia

O balanço de energia foi realizado utilizando os dados obtidos nas operações unitárias de rompimento celular, extração de lipídios e proteínas e digestão anaeróbia. Neste trabalho não foram consideradas as entradas de energia para o processo de digestão anaeróbia da biomassa residual. Os dados obtidos foram normalizados considerando a entrada de 1 kg de biomassa (em base seca).

#### *Entradas de energia (EE)*

A energia necessária para o rompimento celular por ultrassom ( $EE_{US}$ , em W) foi calculada de acordo com o método calorimétrico, conforme as Equação 5.5 (HUERTA et al., 2020), enquanto a entrada de energia para o rompimento por cavitação hidrodinâmica ( $EE_{CH}$ , em W) foi calculado conforme a Equação 5.6 (MULEY et al., 2021).

$$EE_{US} = m c_p (\Delta T / \Delta t) \quad (5.5)$$

$$EE_{CH} = \Delta P Q \quad (5.6)$$

em que  $m$  é a massa (g),  $c_p$  é o calor específico (J kg<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), o  $\Delta T$  é a variação de temperatura (K) durante o intervalo de tempo  $\Delta t$  (s).  $\Delta P$  é a queda de pressão no sistema de cavitação (Pa) e  $Q$  é a vazão (m<sup>3</sup>/s).

A energia necessária para agitação da suspensão de microalgas na extração de lipídios e proteínas ( $EE_{AG}$ , em W) foi calculada de acordo com a Equação 5.7 (COUPER et al., 2012).

$$EE_{AG} = Po N^3 D^5 \rho \quad (5.7)$$

em que o número de potência ( $Po$ ) é uma grandeza adimensional específico para cada tipo de agitador, e foi obtido em função do número de Reynolds ( $Re$ , Equação 5.8) conforme Bates et al. (1963).

$$Re = N D^2 \rho / \mu \quad (5.8)$$

em que,  $N$  é a velocidade do agitador (rotações por segundo),  $D$  é o diâmetro do agitador (m),  $\rho$  é a massa específica do fluido ( $\text{kg/m}^3$ ) e  $\mu$  é a viscosidade do fluido (Pa.s).

A energia necessária para centrifugação das amostras após a extração dos lipídios e proteínas ( $EE_C$ , em W) foi calculada conforme as Equações 5.9 a 5.12 (ABU-SHAMLEH; NAJJAR, 2020).

$$EE_C = \rho_p Q \omega^2 r_2^2 \quad (5.9)$$

$$Q = 2V_g \Sigma \quad (5.10)$$

$$V_g = (\rho_p - \rho_f) d^2 g / 18 \mu \quad (5.11)$$

$$\Sigma = 2 \pi n \omega^2 (r_2^3 - r_1^3) / 3g \tan \theta \quad (5.12)$$

em que  $Q$  é a vazão da centrifuga ( $\text{m}^3/\text{s}$ ),  $V_g$  é a velocidade terminal ( $\text{m/s}$ ),  $\rho_p$  e  $\rho_f$  são as massas específicas da partícula e do fluido (solvente e/ou água) ( $\text{kg/m}^3$ ) a  $25^\circ\text{C}$ ,  $d$  é o diâmetro da partícula da microalga (m),  $g$  é a aceleração da gravidade ( $9,8 \text{ m/s}^2$ ),  $\mu$  é a viscosidade (Pa.s). Já  $\Sigma$  é fator sigma da centrifuga ( $\text{m}^2$ ), refere-se às características físicas do equipamento. Neste trabalho consideramos uma centrifuga de discos com parâmetros utilizados por Abu-Shamleh e Najjar (2020). Sendo  $n$  é número de discos da centrifuga (125),  $\omega$  é a velocidade angular ( $\text{rad/s}$ ),  $r_1$  e  $r_2$  são os raios da superfície interna e externa do disco ( $r_1 = 0,0275\text{m}$  e  $r_2 = 0,1125\text{m}$ ) e  $\theta$  é o ângulo de inclinação do disco ( $42,5^\circ$ ).

A energia necessária para recuperar o solvente ( $EE_S$ , em W), após a separação das fases, foi determinada conforme a Equação 5.13.

$$EE_S = Q \rho_s (Lv + c_p \Delta T) \quad (5.13)$$

em que,  $Q$  é a vazão do solvente a ser evaporado ( $\text{m}^3/\text{s}$ ),  $\rho_s$  é a massas específicas do solvente ( $\text{kg/m}^3$ ),  $Lv$  é o calor latente de vaporização do acetato de etila ( $365,82 \text{ kJ/kg}$ ),  $c_p$  calor específico do acetato de etila ( $1.904 \text{ J kg}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ) e  $\Delta T$  é a diferença entre a temperatura de ebulição e temperatura inicial do solvente.

### *Saída de energia (ES)*

A produção de energia foi calculada a partir dos resultados experimentais de extração de lipídios e produção de metano. A energia extraída na forma de lipídios ( $ES_{Lip}$ ) foi determinada como o produto da massa de óleo pelo poder calorífico superior (PCS) de 38,55 MJ kg<sup>-1</sup>, obtido experimentalmente. A energia produzida na forma de metano ( $ES_{CH_4}$ ) foi determinada como o produto do volume de gás metano pelo poder calorífico inferior (PCI) de 35,8 MJ m<sup>-3</sup> CH<sub>4</sub> (SOLÉ-BUNDÓ; GARFÍ; FERRER, 2020).

### *Razão de energia líquida (REL)*

A REL foi utilizada para avaliar a eficiência energética das rotas propostas neste trabalho. A determinação dos valores foi feita conforme a Equação 5.14 (CARRILLO-REYES et al., 2021).

$$REL = \sum ES / \sum EE \quad (5.14)$$

### **5.2.6. Procedimentos analíticos**

O teor de água, sólidos totais (ST), voláteis (SV) e fixos (cinzas), assim como a demanda química de oxigênio (DQO) e nitrogênio total Kjeldahl (NTK) foram determinados conforme metodologia proposta por APHA (2017). A DQO solúvel foi determinada após a centrifugação das amostras a 7.500 rpm por 10 minutos. O carbono orgânico total (COT) foi quantificado em analisador de carbono (SSM-5000A, Shimadzu, Japão). Já os teores de lipídios totais foram determinados pelo método gravimétrico proposto por Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1987). As proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951) e as proteínas totais obtidas como produto da multiplicação dos teores de NTK pelo fator 5,89 (AFIFY et al., 2018). Os carboidratos neutros foram determinados pelo método fenol - ácido sulfúrico de Dubois, adaptado para microplacas por Masuko et al. (2005). Os pigmentos foram determinados conforme Panha et al. (2014). A alcalinidade do inóculo anaeróbio foi determinada conforme metodologia proposta por Ripley et al. (1986). O poder calorífico superior da biomassa de microalgas e do óleo extraído foram determinados em bomba calorimétrica (IKA, C 200, Alemanha).

### **5.2.7. Análises estatísticas**

Os experimentos para extração de lipídios e proteínas, assim como a digestão anaeróbia da biomassa residual, foram realizados com três repetições para cada tratamento. Os dados

obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

### 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1. Produção e composição da biomassa de *S. obliquus* BR003

As microalgas atingiram a fase estacionária de crescimento no 12º dia de cultivo, com uma concentração de células de 0,42 g L<sup>-1</sup>. A biomassa foi coletada e concentrada por floculação seguida de filtração, obtendo-se ao final a concentração de sólidos totais de 50 g L<sup>-1</sup>. A composição bioquímica da biomassa utilizada nos experimentos é mostrada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Caracterização da biomassa de *Scenedesmus obliquus* BR003. Médias seguidas do desvio padrão

Parâmetros	Valores
Cinzas (% base seca)	11,66 ± 0,82
Proteínas totais (Fator = 5,89) (% base seca)	54,95 ± 0,79
Proteínas hidrossolúveis (% base seca)	40,84 ± 1,40
Carboidratos neutros (% base seca)	11,53 ± 1,08
Lipídios totais (% base seca)	17,62 ± 0,94
Pigmentos totais (mg g <sup>-1</sup> )	18,0 ± 0,24
Carbono orgânico total (% base seca)	40,77 ± 0,46
Nitrogênio total (% base seca)	9,33 ± 0,13
DQO <sub>total</sub> (kgO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> )	2,23 ± 0,08
pH	7,33

O cultivo em tanque aberto permitiu a produção de biomassa com 54,9% de proteínas totais. Já as proteínas solúveis representam 74,3% do total de proteínas da biomassa, e tal resultado está de acordo com o verificado em estudo anterior que avaliou a solubilidade das proteínas de *Tetrademus obliquus* (GONZÁLEZ-BALDERAS et al., 2021), que é a mesma espécie utilizada neste trabalho. Assim, o uso da fração proteica pode agregar valor à cadeia de produção de microalgas, devido aos altos teores e qualidade das proteínas encontradas em *S. obliquus* (AMORIM et al., 2020; GONZÁLEZ-BALDERAS et al., 2021), com grande potencial de aplicação nas áreas agrícolas, alimentar e biomédica (GONZÁLEZ-BALDERAS et al., 2021; MOLINO et al., 2018; SILVA et al., 2020).

Os compostos ricos em carbono, especificamente lipídios e carboidratos, representam aproximadamente 30% da composição da biomassa. Esses compostos são utilizados como reserva de energia (amido e lipídios) e na formação da complexa parede celular de *S. obliquus*

(VIEIRA et al., 2021). Vários trabalhos tem destacado a possibilidade do uso destes compostos para produção de energia, tais como biodiesel (ROCHA et al., 2019), etanol (XU et al., 2019) e biogás (GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2018). Em relação as cinzas e pigmentos, os teores encontrados neste trabalho (11,66% e 3,06%) são semelhantes a estudos anteriores com *S. obliquus* cultivada em tanque aberto (BILLER; ROSS, 2014; SILVA et al., 2020).

### 5.3.2. Extração de proteínas

A extração alcalina e precipitação ácida das proteínas de *S. obliquus* BR003 em temperatura ambiente permitiu obter o total de 38,6%, 30,8% e 8,0% de concentrado proteico, para os tratamentos da biomassa com US, CH e SR, respectivamente (Tabela 5.1A). O número de estágios teve um efeito positivo na extração do concentrado proteico. No primeiro estágio foi possível extrair 55,8%, 63,5% e 37,5% para US, CH e SR, respectivamente. No segundo estágio o acumulado de concentrado proteico extraído aumentou para 82,5%, 85,3% e 71,3% para os tratamentos US, CH e SR, respectivamente.

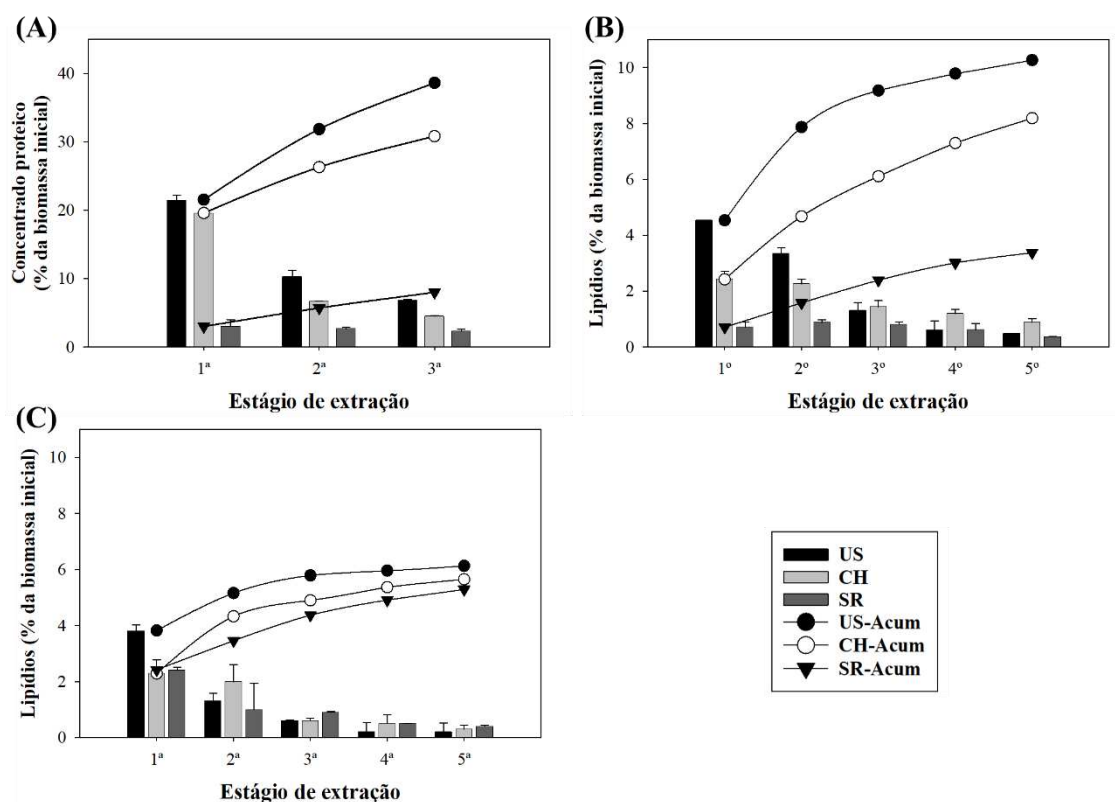


Figura 5.1: Extração de (A) concentrado proteico, (B) lipídios e (C) lipídios após a extração das proteínas, de *Scenedesmus obliquus* BR003 rompida por Ultrassom (US), Cavitação Hidrodinâmica (CH), e Sem Romper (SR). As proteínas foram extraídas em 3 estágios e os lipídios em 5 estágios. Os valores são as médias de 3 repetições. As barras de erro representam o desvio padrão

Conforme exposto na Tabela 5.2, os concentrados apresentaram teores de proteínas estatisticamente diferentes ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ), de 70,2%, 64,1% e 44,9% para os tratamentos US,

CH e SR, respectivamente. Com relação aos teores de lipídios e carboidratos, não houve diferença entre os tratamentos US e CH ( $p$ -valor  $\geq 0,05$ ), porém, o tratamento SR apresentou teor de carboidrato neutro 20% maior, e teor de lipídios 54% menor, quando comparado com os tratamentos US e CH. Já os teores de cinzas encontrados nos concentrados proteicos foram 3,9%, 8,2% e 17,5% ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) para os tratamentos US, CH e SR, respectivamente. É importante salientar que de acordo com a definição padrão para produtos comerciais, os materiais com pureza proteica entre 60% e 89% são considerados “concentrados proteicos” (SOTO-SIERRA; STOYKOVA; NIKOLOV, 2018). Assim, o extrato obtido a partir da biomassa sem romper, o qual apresentou um teor abaixo de 60%, não é considerado como concentrado proteico.

Tabela 5.2: Percentual de proteínas extraídas e composição do concentrado proteico obtido de *Scenedesmus obliquus* BR003 rompida por ultrassom (US), cavitação hidrodinâmica (CH) e sem romper (SR), em três estágios de extração. Médias seguidas do desvio padrão

Tratamento	Rendimento de extração (% m m <sup>-1</sup> )	Concentrado proteico (% m m <sup>-1</sup> ) em base seca					
		Proteínas totais	Carboidratos		Lipídios	Cinzas	
			Neutros <sup>1</sup>	por diferença <sup>2</sup>			
US	1º estágio	27,87	71,07 ± 1,02	11,25 ± 0,52	16,45	8,98 ± 0,80	3,50 ± 0,33
	2º estágio	13,27	70,6 ± 0,31	8,2 ± 0,2	10,71	14,84 ± 0,59	3,85 ± 0,16
	3º estágio	8,23	66,77 ± 0,57	7,2 ± 0,38	9,34	18,45 ± 0,35	5,44 ± 0,22
	<b>Total<sup>3</sup></b>	<b>49,36</b>	<b>70,19 ± 0,8</b>	<b>9,72 ± 0,41</b>	<b>13,67</b>	<b>12,21 ± 0,66</b>	<b>3,94 ± 0,26</b>
CH	1º estágio	23,36	65,52 ± 0,89	9,42 ± 0,12	15,75	9,98 ± 0,13	8,74 ± 0,27
	2º estágio	7,74	63,26 ± 0,62	8,45 ± 0,81	11,12	18,44 ± 0,23	7,18 ± 0,60
	3º estágio	4,89	59,24 ± 0,19	8,43 ± 1,05	13,22	20,29 ± 0,79	7,25 ± 0,42
	<b>Total<sup>3</sup></b>	<b>35,98</b>	<b>64,1 ± 0,78</b>	<b>9,06 ± 0,41</b>	<b>14,37</b>	<b>13,34 ± 0,25</b>	<b>8,18 ± 0,36</b>
SR	1º estágio	2,78	50,87 ± 1,58	16,53 ± 0,81	23,23	3,86 ± 0,62	22,04 ± 1,12
	2º estágio	2,15	43,59 ± 1,9	8,70 ± 0,52	32,32	6,84 ± 0,35	17,26 ± 0,79
	3º estágio	1,61	38,49 ± 0,31	7,12 ± 0,1	41,98	7,85 ± 0,54	11,69 ± 0,42
	<b>Total<sup>3</sup></b>	<b>6,53</b>	<b>44,85 ± 1,42</b>	<b>11,18 ± 0,48</b>	<b>31,69</b>	<b>6,01 ± 0,51</b>	<b>17,45 ± 0,80</b>

<sup>1</sup> Quantificados pelo método de Dubois.

<sup>2</sup> Estimado pela diferença: %Carboidratos = 100 – (%Lipídios + %Cinzas + %Proteínas).

<sup>3</sup> Os valores representam a média ponderada do teor do composto e massa do concentrado proteico obtido em cada estágio de extração.

O processo de extração e concentração das proteínas para uso como fonte de alimentos aumenta o conteúdo de aminoácidos e a digestibilidade desse material (SOTO-SIERRA; STOYKOVA; NIKOLOV, 2018). Vários trabalhos têm reportado a qualidade e composição dos concentrados proteicos obtidos a partir de *Scenedesmus*, principalmente os teores das proteínas e carboidratos (AMORIM et al., 2021; GONZÁLEZ-BALDERAS et al., 2021;

SILVA et al., 2021; TEULING et al., 2017). Porém, há pouca discussão em relação aos teores de lipídios e cinzas presentes nos concentrados obtidos por extração alcalina e precipitação ácida das proteínas.

Neste trabalho, observou-se um aumento nos teores de lipídios em relação ao número do estágio de extração. Isso sugere que a extração alcalina realizada de forma sucessiva hidrolisou parte desses lipídios, que ficaram dispersos na água (AMORIM et al., 2020). Além disso, pode ter ocorrido a saponificação, transformando os lipídios em sais de ácido graxo e sódio, que foram precipitados junto com o concentrado proteico ao acidificar o meio (LORENZO-HERNANDO et al., 2019). Em relação às cinzas, o tratamento SR apresentou um maior teor, porém, a concentração volumétrica foi a menor quando comparado com os demais tratamentos, sendo 0,71, 0,98 e 0,41 g L<sup>-1</sup> de cinzas na suspensão proteica, para os tratamentos US, CH e SR, respectivamente. Como os valores dessas concentrações têm uma correlação direta com os teores de lipídios, as cinzas podem ter origem nos sais de sódio. Outra hipótese é que parte das cinzas presentes na biomassa pode ter solubilizado na solução alcalina junto com as proteínas, já que o uso da lavagem alcalina é uma técnica recente utilizada para remoção das cinzas presentes na biomassa de microalgas (ASTON et al., 2018; HESS et al., 2019).

O rendimento de extração de proteínas após os três estágios foram 49,4%, 36,0% e 6,5% para os tratamentos US, CH e SR, respectivamente (Tabela 5.2). No primeiro estágio houve um rendimento de 27,9% e 23,4% para os tratamentos US e CH, e estão de acordo com os rendimentos de extração de proteínas de *Scenedesmus* reportado na literatura, utilizando apenas um estágio de extração (AMORIM et al., 2020; ANSARI et al., 2017; LORENZO-HERNANDO et al., 2019; TEULING et al., 2017). Com a extração em três estágios obteve-se um incremento de 43% e 35% no rendimento para os tratamentos US e CH, respectivamente. A extração em vários estágios é uma estratégia para aumentar o rendimento de proteínas e teores de lipídios no concentrado proteico, contribuindo com a qualidade nutricional bem como as propriedades sensoriais desse produto (LORENZO-HERNANDO et al., 2019).

O rompimento celular é essencial para extração das proteínas de *S. obliquus*. Neste estudo observou-se que o tratamento por ultrassom permitiu obter um concentrado com maior teor proteico, além de um melhor rendimento de extração de proteínas, quando comparado com o tratamento por CH. Embora os dois métodos utilizem do mesmo mecanismo de rompimento (cavitação), é importante ressaltar que o ultrassom é um método padrão utilizado em laboratórios para rompimento e extração dos compostos intracelulares das microalgas (CARVALHO et al., 2020). Nas condições operacionais utilizadas neste trabalho, os resultados obtidos com a CH foram promissores para extração e solubilização das proteínas. Muley et al.

(2021) também obtiveram uma boa eficiência na hidrólise e solubilização das proteínas de isolados proteicos do leite, utilizando a cavitação hidrodinâmica.

### 5.3.3. Extração de lipídios

A extração de lipídios (LE) da biomassa úmida utilizando o solvente acetato de etila permitiu extrair 10,3%, 8,2% e 3,4% de lipídios, para os tratamentos US, CH e SR, respectivamente (Figura 5.1B). Esses lipídios representam um rendimento de extração de 58,3%, 46,5% e 19,2% em relação ao teor de lipídios totais da biomassa, para os tratamentos US, CH e SR, respectivamente. A extração de lipídios da biomassa desproteïnizada (PLE) permitiu obter 6,1%, 5,7% e 5,3% de lipídios em relação a biomassa inicial, para os tratamentos US, CH e SR, respectivamente (Figura 5.1C). Os lipídios extraídos representam um rendimento de extração de 34,8%, 32,1% e 30,0% em relação ao teor de lipídios total da biomassa, para US, CH e SR, respectivamente.

O rendimento de extração de lipídios da biomassa desproteïnizada foram menores quando comparado com os rendimentos obtidos nos tratamentos LE, pois parte dos lipídios foram extraídos com o concentrado proteico na etapa de extração de proteínas (seção 5.3.2). Ansari et al. (2017) também verificaram que a extração de lipídios após a extração de proteínas foi 12% menor, quando comparado com a extração a partir da biomassa bruta. Ao somar os lipídios presentes no concentrado proteico e os lipídios obtidos nos tratamentos PLE, o rendimento total de extração foi de 61,3%, 55,6% e 32,9% para os tratamentos US, CH e SR, respectivamente. Esses rendimentos são maiores que os obtidos nos tratamentos LE, principalmente utilizando a biomassa sem romper, o que sugere que a extração de proteínas em três estágios deixou a parede celular de *S. obliquus* mais permeável, possibilitando um melhor acesso do solvente para a extração dos lipídios.

O acetato de etila é considerado um solvente verde, e uma alternativa aos derivados de petróleo como o hexano, utilizados na extração do óleo das microalgas (MAHMOOD; THEODOROPOULOS; GONZALEZ-MIQUEL, 2017). Além disso, o acetato de etila tem uma ótima seletividade para extração dos lipídios neutros, que é uma classe de lipídios que pode ser efetivamente convertida em biodiesel (WU et al., 2017). Os rendimentos de extração de lipídios obtidos neste trabalho com o uso do ultrassom para rompimento foram maiores que os reportados na literatura com o uso do acetato de etila em *Chlorella vulgaris* (LU; WANG; YUAN, 2015; WU et al., 2017), *Nannochloropsis sp.* (MAHMOOD; THEODOROPOULOS; GONZALEZ-MIQUEL, 2017), *S. obliquus* (AMORIM et al., 2020) e *Isochrysis galbana*

(SÁNCHEZ-BAYO et al., 2020). Esses maiores rendimentos foram obtidos devido ao uso de múltiplos estágios de extração.

Conforme as Figura 5.1B e Figura 5.1C, no primeiro estágio só foi possível extrair de 21% a 62,4% dos lipídios extraídos em 5 estágios. Vieira et al. (2021) também observaram que apenas 53% do total de lipídios extraídos de *S. obliquus* foram obtidos no primeiro estágio de extração. O tratamento LE permitiu obter-se teores acumulados de 89,4%, 74,6% e 70,8% de lipídios com três estágios de extração para US, CH e SR, respectivamente. O tratamento PLE, os teores acumulados foram maiores quando comparados o LE, com valores de 94,4%, 86,7% e 82,6% para US, CH e SR, respectivamente. As extrações em múltiplos estágios é uma estratégia para aumentar os rendimentos de extrações de lipídios, pois, além do aumento da razão solvente: biomassa, essa estratégia causa um maior dano na estrutura celular, favorecendo a liberação dos lipídios de forma gradativa (DU; SCHUUR; BRILMAN, 2017).

A parede celular de *S. obliquus* é composta de glicoproteínas e celulose na camada interna e de um biopolímero chamado Algaenan na bainha trilaminar (BAUDELET et al., 2017). Assim, para a extração dos compostos intracelulares é necessário romper esse rígido envoltório. Porém, no tratamento com a biomassa sem rompimento houve extração de lipídios (rendimento < 20%), devido ao dano celular causado pela formação de cristais intracelular durante o armazenamento da biomassa em freezer (ELERŠEK et al., 2020; GRUBER-BRUNHUMER et al., 2016). Já o tratamento CH apresentou rendimentos entre 80 e 90% dos valores obtidos em relação ao tratamento controle (US). Assim, o rompimento por cavitação hidrodinâmica é um método promissor para extração de lipídios, devido aos ótimos rendimentos de extração, facilidade no aumento de escala, baixo custo de implantação e baixo consumo de energia quando comparado ao rompimento por ultrassom (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2015; WAGHMARE et al., 2019).

#### **5.3.4. Resíduos dos processos PLE e LE**

Nas operações unitárias de extração de proteínas e lipídios da biomassa úmida de *S. obliquus* BR003 foram gerados dois resíduos: a água residuária obtida após a precipitação das proteínas (ARP) e a biomassa residual úmida, obtida após a extração dos lipídios e proteínas.

##### *Água residuária da extração das proteínas (ARP)*

Para extração das proteínas de *S. obliquus* em três estágios, a partir de 1 kg de biomassa (em base seca), é gerado aproximadamente 46 L de efluente. Na Tabela 5.3 é apresentada a composição do efluente ARP obtido nos tratamentos US, CH e SR.

Tabela 5.3: Composição da água residuária da extração de proteínas (ARP) de *Scenedesmus obliquus* BR003, rompida por ultrassom (US), cavitação hidrodinâmica (CH) e sem romper (SR). Médias seguida do desvio padrão

Tratamentos	DQO	ST	Cinzas	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
	(g L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(% m m <sup>-1</sup> em base seca)			
1° Estágio	3,52 ± 0,02	65,10 ± 3,08	25,46 ± 0,09	19,3 ± 0,64	29,13 ± 0,56	3,09 ± 0,57
US 2° Estágio	2,28 ± 0,05	26,91 ± 1,94	29,78 ± 1,45	17,55 ± 1,23	15,2 ± 0,27	2,03 ± 0,23
3° Estágio	0,90 ± 0,00	16,03 ± 0,43	30,1 ± 1,27	11,53 ± 0,26	6,54 ± 0,48	2,01 ± 0,32
1° Estágio	3,54 ± 0,08	67,04 ± 2,54	25,15 ± 0,46	19,14 ± 0,73	29,07 ± 0,6	1,43 ± 0,45
CH 2° Estágio	2,04 ± 0,00	25,41 ± 5,17	29,13 ± 0,44	17,64 ± 3,24	12,53 ± 0,78	0,88 ± 0,79
3° Estágio	1,04 ± 0,07	18,63 ± 0,58	31,38 ± 0,03	17,45 ± 1,63	5,26 ± 0,46	0,82 ± 0,54
1° Estágio	3,47 ± 0,07	53,33 ± 4,71	22,43 ± 0,26	21,36 ± 0,35	33,65 ± 0,19	1,42 ± 0,0
SR 2° Estágio	2,18 ± 0,01	18,18 ± 1,12	26,74 ± 0,02	24,62 ± 2,82	18,27 ± 1,28	0,82 ± 0,0
3° Estágio	1,18 ± 0,08	14,95 ± 0,72	31,19 ± 0,13	24,53 ± 2,71	9,57 ± 0,77	0,00 ± 0,0

As ARPs apresentaram pH 2,5 e turbidez de 78,7 UNT. A concentração de sólidos totais (ST) em todos os tratamentos (14,95 a 67,04 mg L<sup>-1</sup>, Tabela 5.3) é baixa quando comparada a outros efluentes, tais como o da indústria de leite 3.973 a 6.380 mg L<sup>-1</sup> (ABDULGADER et al., 2019; PEREIRA et al., 2018) e da indústria de biodiesel 670 a 8.850 mg L<sup>-1</sup> (DAUD et al., 2015). Enquanto a demanda química de oxigênio (DQO, de 0,9 a 3,5 g L<sup>-1</sup>, Tabela 5.3) apresentou valores próximos aos encontrados nos efluentes da indústria de leite 1,91 a 14,25 g L<sup>-1</sup> (ABDULGADER et al., 2019; PEREIRA et al., 2018; RAHIMI; ZINATIZADEH; ZINADINI, 2019) e valores menores que o da indústria de biodiesel 19,0 a 37,0 g L<sup>-1</sup> (BRITO et al., 2019; DAUD et al., 2015).

O processo de extração de proteínas de *S. obliquus* é responsável pela geração de uma grande quantidade de ARP com alto teor de compostos orgânicos (carboidratos, proteínas e lipídios), baixo pH e presença de nutrientes. Devido às características desse efluente, a produção de proteínas a partir das microalgas é uma atividade com grande potencial poluidor, e a ARP deverá ser tratada apropriadamente antes da disposição nos corpos hídricos, caso contrário ocorrerá a fenômeno eutrofização e, conseqüentemente, a deterioração dos ecossistemas aquáticos (RAHIMI; ZINATIZADEH; ZINADINI, 2019). Para escolha de um sistema apropriado de tratamento, se faz necessário um estudo aprofundado da composição desse efluente.

Como alternativa, a água residuária gerada no processo de extração de proteínas poderá ser utilizada como meio de cultura para cultivo das microalgas. Na literatura há vários trabalhos que verificaram o potencial das microalgas para tratamento de águas residuárias com

características similares a ARP (HANDAYANI et al., 2020; MOSTAFA et al., 2019; WANG et al., 2018). O uso das microalgas para tratamento de efluentes traz vários benefícios ambientais, como remoção de nutrientes, redução da DQO, fixação de carbono, além da produção de biomassa que poderá ser utilizada como matéria prima para biocombustíveis, alimentos e biofertilizantes (LI et al., 2019).

### *Biomassa residual*

Após a extração de lipídios em cinco estágios e de proteínas em três estágios, houve a geração de um resíduo líquido que representa 52,7 a 92,2% ( $m\ m^{-1}$ , em base seca) da biomassa inicial (Figura 5.2).

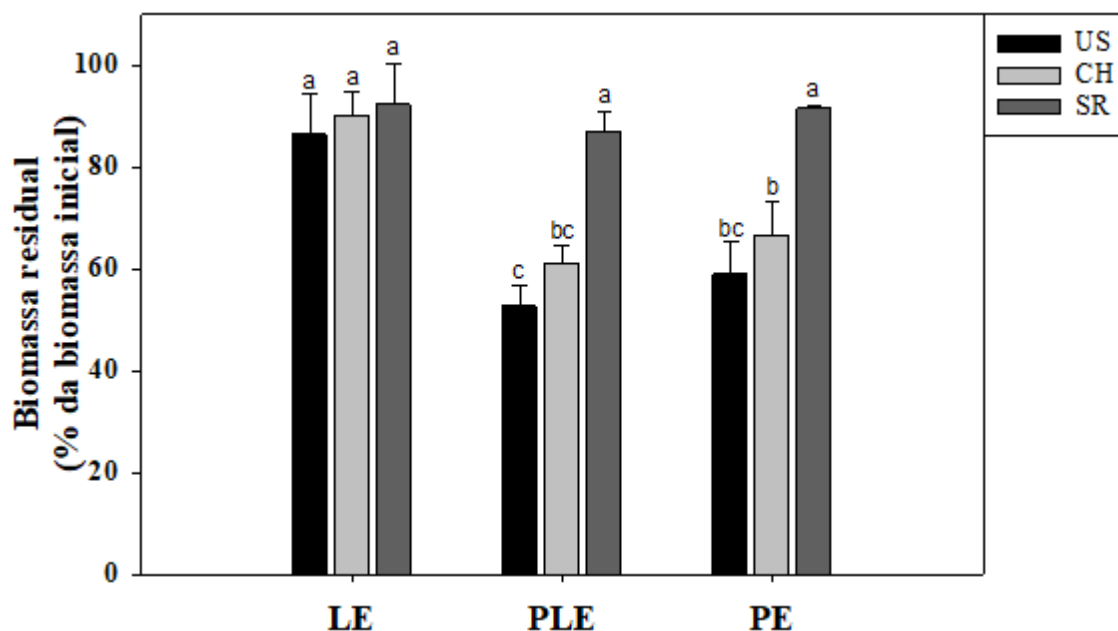


Figura 5.2: Biomassa residual obtida após a extração de lipídios (LE), proteínas e lipídios (PLE) e proteínas (PE) nos tratamentos com rompimento por ultrassom (US), cavitação hidrodinâmica (CH) e sem romper (SR). Os valores são as médias de 3 repetições, e as barras de erro representam o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%

No tratamento LE houve a menor perda de massa, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos, obtendo-se 86,5%, 90,2% e 92,3% de biomassa residual para US, CH e SR, respectivamente. O tratamento PLE apresentou a maior perda de massa com o uso do rompimento por US, mas não houve diferença significativa quando comparado com o rompimento por CH, obtendo-se 52,7% e 60,9% de biomassa residual, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado no tratamento PE, em que as biomassas residuais obtidas nos tratamentos US e CH apresentaram valores que não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5%, obtendo-se 58,9% e 66,7% de biomassa residual, respectivamente. A biomassa

residual obtida tem uma correlação negativa com os teores de proteínas e lipídios extraídos da biomassa (seções 5.3.2 e 5.3.3). Ou seja, quanto maior a quantidade de compostos extraídos, menos biomassa residual é produzida.

A  $DQO_{total}$  das amostras variou entre 1.016 e 1.805 g kg<sup>-1</sup> (Tabela 5.4), sendo os maiores valores observados no tratamento sem rompimento. Já o tratamento US e CH apresentaram valores de  $DQO_{total}$  idênticos. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos reportados na literatura (MARKOU et al., 2020; RAMOS-SUÁREZ; CARRERAS, 2014). Assim, quanto maior a extração dos compostos intracelulares, menor a  $DQO_{total}$  da biomassa residual, já que a DQO representa a quantidade de matéria orgânica presente no resíduo.

O tratamento LE apresentou uma maior  $DQO_{solúvel}$ , seguido dos tratamentos PLE e PE, para o rompimento por US e CH. O processo de rompimento celular libera compostos orgânicos intracelulares para a fração aquosa, porém nos tratamentos LE o solvente utilizado na extração de lipídios é seletivo e só consegue extrair compostos apolares, o que justifica a maior  $DQO_{solúvel}$  na biomassa residual obtida nesses tratamentos. Enquanto nos tratamentos que há extração de proteínas, parte da matéria orgânica é hidrolisada e solubilizada, sendo extraída junto com o concentrado proteico (RAMOS-SUÁREZ; CARRERAS, 2014).

Os teores de proteínas totais das biomassas residuais apresentaram valores entre 53,4% e 57,9% (Tabela 5.4). Apenas os tratamentos PE apresentaram teores de proteínas menores que o teor de proteína da biomassa bruta (Tabela 5.1). Os demais tratamentos apresentaram valores maiores, devido a perda de massa durante os processos de extração, e o consequente aumento na concentração de proteínas totais na biomassa. Os teores de proteínas solúveis foram maiores nos tratamentos PLE e PE, quando comparado com a biomassa bruta. Isso sugere que as proteínas foram progressivamente solubilizadas após cada estágio de extração alcalina (ANSARI et al., 2017).

Tabela 5.4: Caracterização da biomassa residual obtida após a extração dos lipídios e proteínas de *Scenedesmus obliquus* BR003. Médias seguidas do desvio padrão

Parâmetros	US-LE	US-PLE	US-PE	CH-LE	CH-PLE	CH-PE	SR-LE	SR-PLE	SR-PE
ST (g L <sup>-1</sup> )	40,33 ± 2,55	25,10 ± 0,46	30,29 ± 0,41	34,90 ± 2,14	26,24 ± 0,66	31,88 ± 2,05	35,13 ± 2,34	22,10 ± 1,90	27,64 ± 2,06
SV (% ST)	90,31 ± 3,01	90,76 ± 6,09	89,98 ± 5,48	90,75 ± 5,89	90,57 ± 1,59	91,39 ± 5,10	89,63 ± 2,63	92,03 ± 5,38	92,0 ± 10,44
DQO <sub>total</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	1156 ± 194	1135 ± 137	1283 ± 152	1016 ± 208	1210 ± 146	1385 ± 234	1745 ± 226	1804 ± 179	1805 ± 109
DQO <sub>solúvel</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	307,1 ± 3,0	115,7 ± 6,9	108,1 ± 9,4	288,5 ± 3,2	142,1 ± 3,5	86,9 ± 7,3	169,4 ± 0,1	108,8 ± 4,5	121,8 ± 3,1
pH	5,27	5,69	6,34	5,15	5,40	7,04	5,27	5,79	6,70
Lipídios (%)	7,57 ± 0,82	7,77 ± 0,59	16,45 ± 1,40	9,04 ± 1,51	9,70 ± 0,43	17,68 ± 0,65	14,30 ± 1,52	10,82 ± 0,89	17,76 ± 1,14
Carboidratos (%)	8,02 ± 2,75	7,82 ± 0,23	8,10 ± 1,82	8,50 ± 1,01	7,28 ± 1,97	8,09 ± 1,66	8,33 ± 1,90	8,54 ± 0,56	7,61 ± 0,68
Proteínas totais (%)	57,94 ± 0,19	57,64 ± 0,64	53,41 ± 0,24	55,28 ± 0,01	55,94 ± 0,48	54,34 ± 0,15	55,28 ± 0,21	57,81 ± 0,14	54,15 ± 1,32
Proteínas solúveis (%)	35,17 ± 1,26	42,75 ± 2,01	47,39 ± 1,29	35,49 ± 1,22	45,12 ± 4,15	44,51 ± 3,43	37,18 ± 6,06	50,33 ± 6,03	47,50 ± 7,85
Pigmentos totais (%)	1,12 ± 0,07	1,92 ± 0,08	2,71 ± 0,12	1,18 ± 0,04	2,14 ± 0,06	2,65 ± 0,04	1,80 ± 0,05	2,40 ± 0,11	2,92 ± 0,08
Cinzas (%)	9,69 ± 0,32	9,24 ± 0,62	10,02 ± 0,61	9,25 ± 0,60	9,43 ± 0,17	8,61 ± 0,48	10,37 ± 0,30	7,97 ± 0,47	7,98 ± 0,91
TN (%)	9,84 ± 0,03	9,79 ± 0,11	9,07 ± 0,04	9,39 ± 0,0	9,50 ± 0,08	9,22 ± 0,02	9,39 ± 0,04	9,81 ± 0,02	9,19 ± 0,22
C (%)	39,57 ± 0,18	40,73 ± 0,22	43,11 ± 0,27	37,34 ± 0,12	40,02 ± 0,31	43,62 ± 0,16	37,54 ± 0,34	43,52 ± 0,19	43,17 ± 0,08
C/N	4,02	4,16	4,75	3,98	4,21	4,73	4,00	4,43	4,70

A biomassa residual apresentou elevados teores de compostos ricos em carbono. Os teores de carboidratos foram 7,3% a 8,5%, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. Enquanto os teores de lipídios variaram entre 7,6% e 17,8%, com maiores teores encontrados nos tratamentos PE. Comportamento idêntico foi observado em relação ao carbono total das amostras, que variou de 37,3% a 43,6%, com maiores teores encontrados no tratamento PE. De acordo com os resultados apresentados, é possível afirmar que parte dos compostos ricos em energia ficam na biomassa residual, adsorvidos aos fragmentos celulares (GÜNERKEN et al., 2015). Parte do carbono presente na biomassa residual são carboidratos estruturais da parede celular. Cheng et al. (2015) observaram que a parede celular representa 46,3% a 50,4% da biomassa total em linhagens do gênero *Chlorella*. Dessa forma, os teores de carbono presentes na biomassa residual apresentam valores compatíveis para a recuperação de energia por meio de digestão anaeróbia e consequente geração metano (GANESH et al., 2018).

#### **5.3.5. Digestão anaeróbia da biomassa residual**

A produção de metano estimada pelo modelo cinético de primeira ordem foi 0,7% a 10% menor que os valores observados, enquanto a produção de metano estimada pelo modelo de Gompertz modificado variou de -3,7% a 4,1% em relação aos dados observados. O coeficiente  $R^2$  foi maior no modelo Gompertz modificado (0,9956 a 0,9998), quando comparado com o modelo de primeira ordem (0,967 a 0,995). A raiz do erro quadrático médio (RMSE) do modelo de Gompertz modificado variou de 1,5 a 6,0%, enquanto o modelo de primeira ordem houve de 5,7 a 13,1%. Portanto, o modelo Gompertz modificado ajustou melhor aos dados, e foi utilizado para modelar as curvas de produção de metano (Figura 5.3), além de obter a taxa específica de produção de metano e a extensão da fase *lag* para cada tratamento.

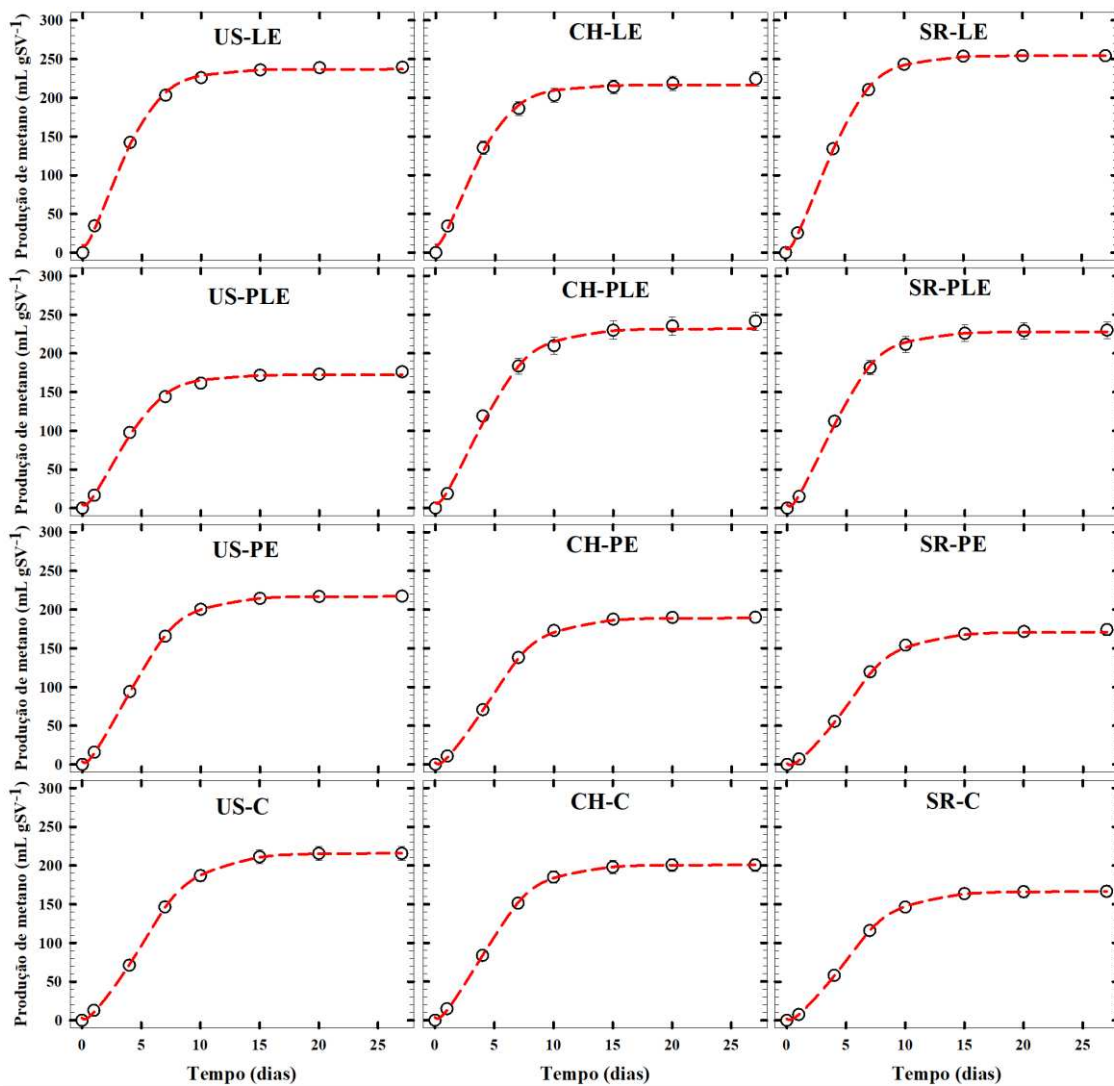


Figura 5.3: Produção de metano a partir da biomassa *in natura* e residual de *Scenedesmus obliquus* BR003. Os símbolos representam os valores observados e as linhas tracejadas representam os valores estimados pelo modelo cinético de Gompertz modificado

A digestão anaeróbia da biomassa residual permitiu a produção de 172 a 254 mL CH<sub>4</sub> gSV<sup>-1</sup>, o que representa uma eficiência de conversão de energia entre 19,6 e 57,1% (Tabela 5.5). Esses valores estão de acordo com trabalhos da literatura para produção de metano a partir da biomassa bruta e residual (MARKOU et al., 2020; ROKICKA et al., 2021). A produção de metano do controle positivo (celulose microcristalina) foi 373,4±12,0 mL CH<sub>4</sub> gSV<sup>-1</sup> (dados não apresentados), o que representa 90% da produção teórica desse substrato. Assim, os ensaios realizados com a biomassa das microalgas foram validados, pois segundo Holliger et al. (2016) o teste de BMP é validado quando a produção do controle positivo é de 85 a 100% da produção teórica da celulose, e o desvio padrão relativo menor que 5% em todos os tratamentos, o que também ocorreu neste trabalho.

Tabela 5.5: Dados observados e parâmetros cinéticos da produção de metano. Os valores observados são as médias de 3 repetições. As letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Duncan ao nível de significância de 5%

Ensaio	Solubilidade (%)	Produção de CH <sub>4</sub> (mL gSV <sup>-1</sup> )	$\eta$ DA(%)	Parâmetros cinéticos		
				$Y_m$	$K$	$\lambda$
US-LE	26,58	239,54 ± 4,23 b	53,54 ± 2,23 a	237,01	39,41	0,37
US-PLE	10,19	176,23 ± 5,92 e	40,34 ± 2,87 cd	172,38	28,37	0,64
US-PE	8,43	217,46 ± 6,80 c	44,60 ± 4,27 bc	217,21	31,02	0,99
US-C	12,84	215,15 ± 8,83 c	24,27 ± 2,11 f	216,26	27,05	1,33
HC-LE	28,40	224,30 ± 9,16 c	57,10 ± 4,45 a	216,64	36,19	0,27
HC-PLE	11,73	241,78 ± 11,82 ab	50,78 ± 8,30 ab	231,77	32,96	0,65
HC-PE	5,85	190,01 ± 7,26 d	32,88 ± 4,28 e	189,21	26,16	1,32
HC-C	11,88	199,62 ± 8,35 d	24,14 ± 2,10 f	200,80	28,19	1,03
UB-LE	9,71	254,16 ± 6,65 a	37,11 ± 1,94 de	254,44	40,61	0,70
UB-PLE	9,04	230,00 ± 10,78 bc	33,30 ± 4,90 de	227,87	35,03	0,89
UB-PE	6,75	172,23 ± 7,60 e	25,11 ± 2,89 f	171,00	23,26	1,65
UB-C	6,65	166,60 ± 7,57 e	19,61 ± 3,48 f	166,65	21,93	1,37

$Y_m$ : rendimento máximo de metano (mL CH<sub>4</sub> gSV<sup>-1</sup>).

$K$ : taxa específica de produção de metano (mL CH<sub>4</sub> gSV d<sup>-1</sup>).

$\lambda$ : fase de lag (d).

Na Tabela 5.5 é possível observar que os tratamentos controle (sem extração de compostos) apresentaram produção de metano de 215,2, 199,6 e 173,1 mLCH<sub>4</sub> gSV<sup>-1</sup> ( $p$ -valor < 0,05) para os tratamentos US, CH e SR, respectivamente. O rompimento celular foi responsável pelo aumento na solubilidade do substrato em aproximadamente 50%, além do aumento da taxa de específica de produção de metano ( $K$ ) e redução da extensão da fase lag ( $\lambda$ ). É importante reforçar que a biomassa utilizada nos ensaios foi congelada, o que contribuiu com o aumento na solubilidade dos compostos e produção de metano (GRUBER-BRUNHUMER et al., 2016). O tratamento US apresentou os maiores valores de produção de metano e solubilidade do substrato. Enquanto a solubilidade e produção de metano no tratamento CH foi 7% menor quando comparado com o tratamento US, porém, o rompimento por CH apresentou uma maior taxa específica de produção de metano, e uma menor fase lag. De acordo com os resultados, o uso da cavitação hidrodinâmica é promissor, e este é o primeiro trabalho que avalia o efeito desse método de rompimento na digestão anaeróbia de uma espécie de microalga clorófito. A cavitação hidrodinâmica tem sido utilizada como pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, águas residuárias, lodos e biomassa de cianobactéria, devido à facilidade de aumento de escala, baixo consumo de energia e bons resultados em relação à desintegração da

biomassa e produção de biogás (FARDINPOOR et al., 2021; GARLICKA et al., 2020; NAGARAJAN; RANADE, 2019; VILARROIG et al., 2020).

A extração de lipídios permitiu um aumento na produção de metano a partir da biomassa residual em 12%, 11% e 53% quando comparado com o controle, para os tratamentos US, CH e SR. Esses resultados divergem de dados reportados na literatura, que observaram uma correlação negativa entre os teores de lipídios extraídos e a produção de metano a partir da biomassa residual, provavelmente devido ao efeito inibitório do solvente utilizado (MARKOU et al., 2020; ROKICKA et al., 2020; ZHAO et al., 2014). Embora uma parte do carbono tenha sido extraída na forma de lipídios, o processo de extração utilizando o acetato de etila aumentou a solubilidade dos compostos orgânicos da biomassa residual, e reduziu o tempo da fase *lag*, que é um indicativo de que o resíduo do solvente não causou inibição. Além disso, o acetato de etila é um solvente apolar com uma grande capacidade de extração de lipídios neutros, e menor afinidade com moléculas de polaridade maior (WU et al., 2017). Assim, o uso do acetato de etila é uma estratégia para evitar a extração de compostos solúveis da biomassa (compostos polares), e conseqüentemente, aumentar a recuperação de energia por meio da digestão anaeróbia da biomassa residual.

Os tratamentos PE apresentaram produção de metano de 217,5, 190,0 e 172,2 mLCH<sub>4</sub> gSV<sup>-1</sup> (*p*-valor < 0,05) para os tratamentos US, CH e SR. Esses valores são estatisticamente iguais ao tratamento controle, pois a composição da biomassa residual após a extração de proteínas foi similar à composição da biomassa do tratamento controle (Tabela 5.1 e Tabela 5.4). Embora proteínas, lipídios e carboidratos tenham sido extraídos da biomassa PE (Tabela 5.2), o processo de extração de proteínas reduziu significativamente a quantidade da biomassa residual, e contribuiu com o aumento da participação relativa dos compostos rico em nitrogênio e carbono (MARKOU et al., 2020). Além disso, a solubilidade da biomassa residual após a extração de proteínas foi menor em todos os tratamentos, pois a extração alcalina solubilizou e extraiu, além das proteínas, vários outros compostos orgânicos.

### **5.3.6. Balanço de Energia**

O cenário considerado neste estudo para análise do balanço de energia foi o processamento a jusante da biomassa úmida de *S. obliquus* BR003, etapa doravante conhecida como *downstream*. Esse processamento compreende nas etapas de rompimento celular, agitação para a extração de lipídios e proteínas, separação das fases por centrifugação, recuperação do solvente e digestão anaeróbia da biomassa residual. Os dados apresentados na

Figura 5.4 e Tabela 5.6 considerou 5 estágios de extração de lipídios e 3 estágios de extração de proteínas.

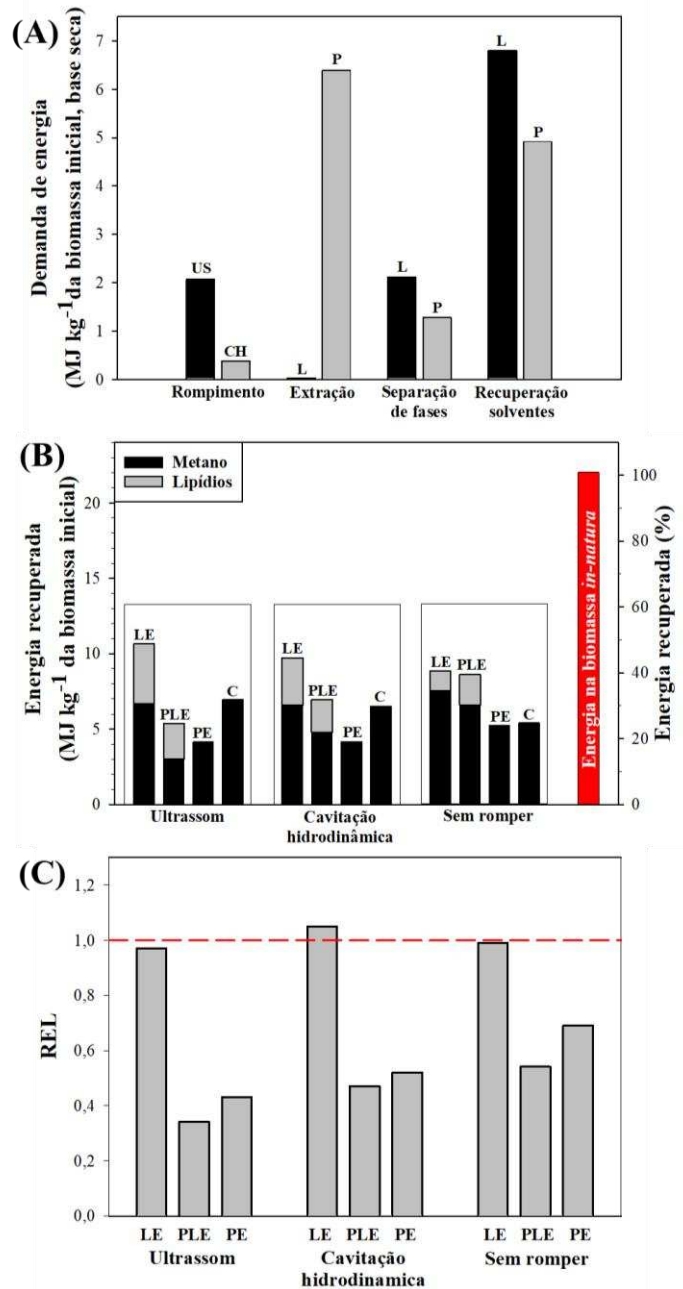


Figura 5.4: Balanço de energia do processamento da biomassa de *Scenedesmus obliquus* BR003 (A) demanda de energia, (B) energia recuperada e (C) razão de energia líquida (REL)

Tabela 5.6: Balanço de massa e energia (E) do processamento da biomassa de *Scenedesmus obliquus* BR003

Etapa	US				CH				SR			
	LE	LPE	PE	C	LE	LPE	PE	C	LE	LPE	PE	C
<b><u>Rompimento celular</u></b>												
<i>Entradas</i>												
Biomassa (kg)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Energia (MJ)	2,06	2,06	2,06	-	0,37	0,37	0,37	-	-	-	-	-
<i>Saida</i>												
Biomassa (kg)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b><u>Extração de proteínas</u></b>												
<i>Entradas</i>												
Biomassa (kg)	-	1,00	1,00	-	-	1,00	1,00	-	-	1,00	1,00	-
E. agitação (MJ)	-	6,38	6,38	-	-	6,38	6,38	-	-	6,38	6,38	-
E. centrifugação (MJ)	-	1,27	1,27	-	-	1,27	1,27	-	-	1,27	1,27	-
<i>Saida</i>												
Conc. proteico (kg)	-	0,39	0,39	-	-	0,31	0,31	-	-	0,08	0,08	-
Biomassa residual (kg)	-	0,59	0,59	-	-	0,67	0,67	-	-	0,92	0,92	-
<b><u>Extração de Lipídios</u></b>												
<i>Entradas</i>												
Biomassa (kg)	1,00	0,59	-	-	1,00	0,67	-	-	1,00	0,92	-	-
Solvente (kg)	20,74	12,22	-	-	20,74	13,83	-	-	20,74	18,98	-	-
E. agitação (MJ)	0,02	0,02	-	-	0,02	0,02	-	-	0,02	0,02	-	-
E. centrifugação (MJ)	2,11	2,11	-	-	2,11	2,11	-	-	2,11	2,11	-	-
E. solvente (MJ)	6,79	4,00	-	-	6,79	4,52	-	-	6,79	6,21	-	-
<i>Saídas</i>												
Lipídios (kg)	0,10	0,06	-	-	0,08	0,06	-	-	0,03	0,05	-	-
E. lipídios (MJ)	3,96	2,36	-	-	3,16	2,18	-	-	1,30	2,04	-	-
Solvente (kg)	18,55	10,94	-	-	18,55	12,37	-	-	18,55	16,98	-	-
Biomassa residual (kg)	0,86	0,53	-	-	0,90	0,61	-	-	0,92	0,87	-	-
<b><u>Digestão anaeróbia</u></b>												
<i>Entradas</i>												
Biomassa (kg)	0,86	0,53	0,59	1,00	0,90	0,61	0,67	1,00	0,92	0,87	0,92	1,00
<i>Saídas</i>												
Metano (L)	187,0	84,3	115,4	194,2	183,6	133,5	115,8	181,4	210,2	183,8	146,8	150,9
E. metano (MJ)	6,69	3,02	4,13	6,95	6,57	4,78	4,15	6,49	7,53	6,58	5,25	5,40
<b><u>Balanço de energia</u></b>												
Entradas (total)	10,97	15,83	9,70	0,00	9,28	14,67	8,02	0,00	8,91	15,98	7,65	0,00
Saídas (total)	10,65	5,38	4,13	6,95	9,73	6,96	4,15	6,49	8,83	8,62	5,25	5,40

O consumo de energia da etapa de rompimento celular representa 2,5 a 21,0% da demanda total de energia das rotas de processamento propostas (Figura 5.4A). A cavitação hidrodinâmica apresentou um consumo de energia de  $0,37 \text{ MJ kg}^{-1}$  de BM (em base seca), sendo 5,5 vezes menor que o rompimento por ultrassom. Waghmare et al. (2019) obtiveram um consumo de  $25,6 \text{ MJ kg}^{-1}$  de biomassa, para rompimento celular por CH, sendo mais eficiente energeticamente quando comparado com o rompimento por US. Além da maior eficiência energética, a cavitação hidrodinâmica é mais adequada para aumento de escala, devido à facilidade de montagem do sistema para geração das bolhas cavitantes, que pode ser obtido simplesmente pela constrição ou introdução de irregularidades no fluxo do líquido. (FARDINPOOR et al., 2021).

A agitação da mistura de solvente e biomassa úmida para extração dos lipídios, foi a etapa com menor demanda de energia, representando 0,1 a 0,2% da demanda total de energia. A energia necessária para agitação da suspensão das microalgas para extração de proteínas foi a etapa de maior consumo de energia, com 40 a 83,5% da demanda total de energia dos tratamentos com extração de proteínas. A extração alcalina das proteínas necessita de uma agitação mais intensa por maior tempo para favorecer a solubilização das proteínas, enquanto a extração de lipídios demanda uma agitação menos intensa, para evitar a formação excessiva de emulsões (AMORIM et al., 2020).

A separação das fases solvente e biomassa úmida consumiu  $2,1 \text{ MJ kg}^{-1}$  de BM (em base seca). Esse valor equivale de 13,2 a 23,7% da demanda total de energia dos tratamentos com extração de lipídios. O consumo de energia encontrado neste trabalho está de acordo com Prét et al. (2020), que encontraram um consumo de  $2,77 \text{ MJ kg}^{-1}$ . No entanto, o consumo de energia da separação de fases para extração de proteínas foi de  $1,3 \text{ MJ kg}^{-1}$  de BM (em base seca), o que representa 7,9 a 16,5% da demanda total de energia. A redução do consumo de energia nos tratamentos de extração de proteínas ocorreu devido ao uso da biomassa com uma concentração de sólidos duas vezes maior em relação aos tratamentos para extração de lipídios, que teve a concentração de sólidos reduzida com a adição do solvente na proporção 1:1.

A etapa de recuperação de solvente foi responsável pelo maior consumo de energia dos tratamentos para extração de lipídios, com 25,3 a 76,2% da demanda total de energia. O consumo de energia dessa etapa depende diretamente da concentração de sólidos da biomassa e da razão solvente: biomassa úmida. Martin (2016) também verificou que a energia necessária para recuperação do solvente equivale a aproximadamente 70% da demanda total de energia, considerando uma concentração de sólidos de 10% e razão de solvente: biomassa úmida de 1:1. Assim, é importante otimizar as condições de extração de lipídios para reduzir o consumo de

energia dessa etapa. O uso de apenas um solvente, conforme utilizado neste trabalho, apresenta grandes vantagens, já que a adição de outro solvente com maior polaridade aumentará a demanda energética para a recuperação (PRÉAT et al., 2020).

Conforme apresentado na Figura 5.4B a recuperação de energia nos tratamentos controle foi 31,1%, 29% e 24,2% para US, CH e SR, respectivamente. Essa recuperação de energia ocorreu por meio da digestão anaeróbia, e está de acordo com os trabalhos reportados na literatura (CARRILLO-REYES et al., 2021; MARKOU et al., 2020; ROKICKA et al., 2021; ZHAO et al., 2014). A recuperação de energia da biomassa de microalgas utilizando a digestão anaeróbia é baixa, sendo justificada pela recalcitrância da parede celular e a baixa razão C/N, ocasionando a liberação de amônia, que é tóxica aos microrganismos anaeróbicos mesmo em baixas concentrações (CARRILLO-REYES et al., 2021; NEVES; ANDRADE; PERELO, 2016).

Os tratamentos com extração de lipídios seguida da digestão anaeróbia da biomassa residual apresentaram os maiores valores de energia recuperada da biomassa com 47,6%, 43,5% e 39,5% para US, CH e SR, respectivamente. Além de extrair energia da biomassa na forma de lipídios, houve um incremento na produção de metano devido ao aumento na solubilidade da biomassa. Já os tratamentos com extração de proteínas apresentaram os menores valores de energia recuperada, com 18,5%, 18,5% e 23,5% para US, CH e SR, respectivamente. Vários trabalhos têm reportado sobre aumento na produção de metano após a extração das proteínas (KLASSEN et al., 2017; RAMOS-SUÁREZ; CARRERAS, 2014; WU et al., 2020). Porém, neste trabalho, menor produção de metano ocorreu, pois, a extração das proteínas remove vários outros compostos orgânicos solúveis que seriam utilizados como substrato na digestão anaeróbia.

A razão de energia líquida (REL, Figura 5.4C) das rotas de processamento propostas neste trabalho variou de 0,34 a 1,05. Com os valores do REL é possível avaliar a sustentabilidade energética de cada rota. Os saldos de energia positivos, neutros e negativos corresponderam ao  $REL > 1$ ,  $REL = 1$  e  $REL < 1$ , respectivamente (CARRILLO-REYES et al., 2021). A rota de extração de lipídios seguida da digestão anaeróbia da biomassa residual apresentou os maiores REL para todos os tratamentos. Porém, apenas o tratamento CH apresentou um REL positivo (1,05), indicando que o uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento da biomassa de *S. obliquus* é energeticamente sustentável. Nos tratamentos que houve extração de proteínas os valores de REL foram menores que 1, devido ao maior consumo de energia na etapa de agitação e a menor quantidade de energia recuperada a partir da biomassa residual.

Os produtos energéticos das microalgas ainda não são competitivos com culturas já bem estabelecidas, como por exemplo a soja, com um REL de 3,7 (TREDICI et al., 2015). No entanto, este trabalho revela que o rompimento celular por cavitação hidrodinâmica é uma operação unitária promissora quando se objetiva racionalizar o consumo de energia. Além disso, embora as rotas de extração de proteínas não tenham apresentado boa eficiência energética, a extração desse composto é uma estratégia promissora para agregar valor, já que o preço desse produto é oito vezes maior que o preço de mercado do óleo de microalgas (BARSANTI; GUALTIERI, 2018). Adicionalmente, estudos de otimização em cada operação unitária da rota certamente contribuirá para o aumento do REL, seja pelo aumento da eficiência ou pela redução do consumo de energia. Esse panorama aponta, portanto, para a viabilidade da produção simultânea de óleo e proteínas de microalgas com recuperação de recursos.

#### 5.4. CONCLUSÕES

O rompimento celular por cavitação hidrodinâmica é uma operação unitária promissora para o processamento de microalgas provenientes da etapa de coleta e espessamento. Neste estudo, a cavitação hidrodinâmica apresentou rendimentos adequados para a extração de lipídios, proteínas e produção de metano com uma maior eficiência energética, pois o consumo de energia foi 5,5 vezes menor quando comparado com o rompimento de células por ultrassom. A rota que apresentou a maior recuperação de energia foi a extração de lipídios seguida da digestão anaeróbia da biomassa residual, com uma razão de energia líquida positiva. Já as rotas que consideraram a extração de proteínas resultaram em menores eficiências energéticas devido ao consumo de energia para agitação da suspensão alcalina e redução na quantidade de compostos passíveis de digestão anaeróbia, que foram extraídos junto com o concentrado proteico. A microalga *Scenedesmus obliquus* possui elevados teores de proteínas adequados a formulação de rações e alimentos, e o maior valor deste composto pode compensar a baixa eficiência energética desse processo.

#### 5.5. REFERÊNCIAS

- ABDULGADER, M. et al. Process analysis and optimization of single stage flexible fibre biofilm reactor treating milk processing industrial wastewater using response surface methodology (RSM). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 149, p. 169–181, 1 set. 2019.
- ABU-SHAMLEH, A.; NAJJAR, Y. S. H. Optimization of mechanical harvesting of microalgae by centrifugation for biofuels production. **Biomass and Bioenergy**, v. 143, p. 105877, dez. 2020.

- AFIFY, A. E.-M. M. R. et al. Scenedesmus obliquus: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 399–408, dez. 2018.
- ALZATE, M. E. et al. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 488–494, nov. 2012.
- AMORIM, M. L. et al. Extraction of proteins from the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 followed by lipid extraction of the wet deproteinized biomass using hexane and ethyl acetate. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123190, 1 jul. 2020.
- AMORIM, M. L. et al. Pilot-scale biorefining of *Scenedesmus obliquus* for the production of lipids and proteins. **Separation and Purification Technology**, v. 270, p. 118775, set. 2021.
- ANSARI, F. A. et al. Exploration of Microalgae Biorefinery by Optimizing Sequential Extraction of Major Metabolites from *Scenedesmus obliquus*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 12, p. 3407–3412, 29 mar. 2017.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23th. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
- ASTON, J. E. et al. Application of aqueous alkaline extraction to remove ash from algae harvested from an algal turf scrubber. **Algal Research**, v. 35, p. 370–377, 1 nov. 2018.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable ? **Algal Research**, v. 31, n. February, p. 107–115, 2018.
- BATES, R. L.; FONDY, P. L.; CORPSTEIN, R. R. Examination of Some Geometric Parameters of Impeller Power. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, v. 2, n. 4, p. 310–314, 1 out. 1963.
- BAUDELET, P. H. et al. A new insight into cell walls of *Chlorophyta*. **Algal Research Elsevier B.V.**, 1 jul. 2017.
- BILLER, P.; ROSS, A. B. Pyrolysis GC-MS as a novel analysis technique to determine the biochemical composition of microalgae. **Algal Research**, v. 6, n. PA, p. 91–97, 1 out. 2014.
- BRITO, G. F. DA S. et al. Evaluation of advanced oxidative processes in biodiesel wastewater treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 375, p. 85–90, 15 abr. 2019.
- CARRILLO-REYES, J. et al. Thermophilic biogas production from microalgae-bacteria aggregates: biogas yield, community variation and energy balance. **Chemosphere**, v. 275, p. 129898, 1 jul. 2021.
- CARVALHO, J. C. DE et al. Bioresource Technology Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels , food , and feed. **Bioresource Technology**, v. 300, n. December 2019, p. 122719, 2020.

- CHENG, Y.-S.; LABAVITCH, J. M.; VANDERGHEYNST, J. S. Elevated CO<sub>2</sub> concentration impacts cell wall polysaccharide composition of green microalgae of the genus *Chlorella*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2015.
- COUPER, J. R. et al. **Chemical Process Equipment - Selection and Design**. Third edit ed. [s.l.] Elsevier Science, 2012.
- DAUD, N. M. et al. Production of biodiesel and its wastewater treatment technologies: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 94, n. C, p. 487–508, 1 mar. 2015.
- DE CARVALHO, J. C. et al. Culture media for mass production of microalgae. In: **Biofuels from Algae**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 33–50.
- DU, Y.; SCHUUR, B.; BRILMAN, D. W. F. Maximizing Lipid Yield in *Neochloris oleoabundans* Algae Extraction by Stressing and Using Multiple Extraction Stages with N-Ethylbutylamine as Switchable Solvent. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 28, p. 8073–8080, 19 jul. 2017.
- ELERŠEK, T. et al. Electroporation as a Solvent-Free Green Technique for Non-Destructive Extraction of Proteins and Lipids From *Chlorella vulgaris*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 443, 13 maio 2020.
- FARDINPOOR, M. et al. Effects of Hydrodynamic Cavitation-Assisted NaOH Pretreatment on Biofuel Production from *Cyanobacteria*: Promising Approach. **BioEnergy Research** 2021 15:1, v. 15, n. 1, p. 289–302, 1 maio 2021.
- GANESH, R. et al. Bioresource Technology A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. **Bioresource Technology**, v. 262, n. March, p. 319–332, 2018.
- GARLICKA, A. et al. Effects of Thickened Excess Sludge Pre-Treatment Using Hydrodynamic Cavitation for Anaerobic Digestion. **Energies** 2020, Vol. 13, Page 2483, v. 13, n. 10, p. 2483, 14 maio 2020.
- GONZÁLEZ-BALDERAS, R. M. et al. Identification and effect of ozone and ultrasound pretreatments on *Desmodesmus* sp. and *Tetradesmus obliquus* proteins. **Algal Research**, v. 60, p. 102514, 1 dez. 2021.
- GONZALEZ-FERNANDEZ, C. et al. Biochemical methane potential of microalgae biomass using different microbial inocula. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 184, 29 dez. 2018.
- GRUBER-BRUNHUMER, M. R. et al. Associated effects of storage and mechanical pre-treatments of microalgae biomass on biomethane yields in anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 259–268, 1 out. 2016.
- GÜNERKEN, E. et al. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 2, p. 243–260, 1 mar. 2015.
- HANDAYANI, T. et al. Utilization of Dairy Industry Wastewater for Nutrition of Microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1655, n. 1, p. 012123, 1

out. 2020.

- HESS, D. et al. Techno-economic analysis of ash removal in biomass harvested from algal turf scrubbers. **Biomass and Bioenergy**, v. 123, p. 149–158, 1 abr. 2019.
- HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests **Czech Republic**. p. 2515–2522, 2016.
- HU, Y. et al. Filamentous microalgae as an advantageous co-substrate for enhanced methane production and digestate dewaterability in anaerobic co-digestion of pig manure. **Waste Management**, v. 119, p. 399–407, jan. 2021.
- HUERTA, R. R. et al. Clove essential oil emulsion-filled cellulose nanofiber hydrogel produced by high-intensity ultrasound technology for tissue engineering applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 64, p. 104845, 1 jun. 2020.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Cheese and processed cheese products: determination of fat content - gravimetric method - reference method. p. 7, 1987.
- KHOO, C. G. et al. Algae biorefinery: Review on a broad spectrum of downstream processes and products. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 121964, 1 nov. 2019.
- KLASSEN, V. et al. Highly efficient methane generation from untreated microalgae biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.
- KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1834–1846, dez. 2015.
- KULDEEP; SAHARAN, V. K. Computational study of different venturi and orifice type hydrodynamic cavitating devices. **Journal of Hydrodynamics**, v. 28, n. 2, p. 293–305, 1 abr. 2016.
- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1881–1889, 16 out. 2015.
- LI, K. et al. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121934, 1 nov. 2019.
- LORENZO-HERNANDO, A. et al. Recovery of proteins from biomass grown in pig manure microalgae-based treatment plants by alkaline hydrolysis and acidic precipitation. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 599–607, 1 fev. 2019.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.
- LU, W.; WANG, Z.; YUAN, Z. Bioresource Technology Characteristics of lipid extraction from *Chlorella* sp . cultivated in outdoor raceway ponds with mixture of ethyl acetate and ethanol for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 433–437, 2015.

- MAHMOOD, W. M. A. W.; THEODOROPOULOS, C.; GONZALEZ-MIQUEL, M. Enhanced microalgal lipid extraction using bio-based solvents for sustainable biofuel production. **Green Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 5723–5733, 27 nov. 2017.
- MARKOU, G. et al. Methane production through anaerobic digestion of residual microalgal biomass after the extraction of valuable compounds. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 31 mar. 2020.
- MARTIN, G. J. O. Energy requirements for wet solvent extraction of lipids from microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 40–47, 1 abr. 2016.
- MASUKO, T. et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69–72, 1 abr. 2005.
- MOHSENI, A.; FAN, L.; RODDICK, F. A. Impact of microalgae species and solution salinity on algal treatment of wastewater reverse osmosis concentrate. **Chemosphere**, v. 285, p. 131487, 1 dez. 2021.
- MOLINO, A. et al. Microalgae Characterization for Consolidated and New Application in Human Food, Animal Feed and Nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 2436, 1 nov. 2018.
- MOSTAFA, S. S. et al. Microalgae growth in effluents from olive oil industry for biomass production and decreasing phenolics content of wastewater. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 23, n. 1, p. 359–365, 1 mar. 2019.
- MULEY, A. B. et al. Production of biologically active peptides by hydrolysis of whey protein isolates using hydrodynamic cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 71, p. 105385, 1 mar. 2021.
- NAGARAJAN, S.; RANADE, V. V. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Vortex-Based Devices for Cavitation: Influence on Biomethane Potential. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 35, p. 15975–15988, 4 set. 2019.
- NEVES, V. T. D. C.; ANDRADE, E.; PERELO, L. W. Influence of lipid extraction methods as pre-treatment of microalgal biomass for biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 160–165, 2016.
- PANCHA, I. et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, mar. 2014.
- PEREIRA, M. DOS S. et al. Treatment of synthetic milk industry wastewater using batch dissolved air flotation. **Journal of Cleaner Production**, v. 189, p. 729–737, 10 jul. 2018.
- PRÉAT, N. et al. Identification of microalgae biorefinery scenarios and development of mass and energy balance flowsheets. **Algal Research**, v. 45, n. November 2019, p. 101737, 2020.
- RAHIMI, Z.; ZINATIZADEH, A. A.; ZINADINI, S. Milk processing wastewater treatment in an MBR: A comparative study on the use of two synthetic anti-fouling PES-UF

- membranes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 5, p. 103369, 1 out. 2019.
- RAMOS-SUÁREZ, J. L.; CARRERAS, N. Use of microalgae residues for biogas production. **Chemical Engineering Journal**, v. 242, p. 86–95, 15 abr. 2014.
- RIPLEY, A. L. E. et al. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **JSTOR**, v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.
- ROCHA, D. N. et al. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121644, out. 2019.
- ROCHA, D. N. et al. Improving biofuel production by thermochemical conversion of defatted *Scenedesmus obliquus* biomass. **Journal of Cleaner Production**, v. 275, 2020.
- ROKICKA, M. et al. Effects of Ultrasonic and Microwave Pretreatment on Lipid Extraction of Microalgae and Methane Production from the Residual Extracted Biomass. **Bioenergy Research**, p. 1–9, 12 out. 2020.
- ROKICKA, M. et al. Effects of Ultrasonic and Microwave Pretreatment on Lipid Extraction of Microalgae and Methane Production from the Residual Extracted Biomass. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 3, p. 752–760, 12 set. 2021.
- SÁNCHEZ-BAYO, A. et al. Biodiesel and biogas production from *Isochrysis galbana* using dry and wet lipid extraction: A biorefinery approach. **Renewable Energy**, v. 146, p. 188–195, 1 fev. 2020.
- SCARCELLI, P. G. et al. Evaluation of biomethanization during co-digestion of thermally pretreated microalgae and waste activated sludge, and estimation of its kinetic parameters. **Science of The Total Environment**, v. 706, p. 135745, 1 mar. 2020.
- SILVA, M. E. T. DA et al. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 103711, fev. 2020.
- SILVA, M. E. T. DA et al. *Scenedesmus obliquus* protein concentrate: A sustainable alternative emulsifier for the food industry. **Algal Research**, v. 59, p. 102468, nov. 2021.
- SOLÉ-BUNDÓ, M.; GARFÍ, M.; FERRER, I. Pretreatment and co-digestion of microalgae, sludge and fat oil and grease (FOG) from microalgae-based wastewater treatment plants. **Bioresource Technology**, v. 298, p. 122563, 1 fev. 2020.
- SOTO-SIERRA, L.; STOYKOVA, P.; NIKOLOV, Z. L. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. **Algal Research**, v. 36, p. 175–192, dez. 2018.
- SPOSOB, M. et al. Assessment of the relationship between solubilization and biogas production on anaerobic digestion of pretreated lipid-extracted microalgae waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, p. 105702, 1 out. 2020.
- TEULING, E. et al. Comparison of Protein Extracts from Various Unicellular Green Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 36, p. 7989–8002, 13 set. 2017.

- TREDICI, M. R. et al. Energy balance of algal biomass production in a 1-ha “Green Wall Panel” plant: How to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. **Applied Energy**, v. 154, p. 1103–1111, 15 set. 2015.
- VIEIRA, B. B. et al. Optimized extraction of neutral carbohydrates, crude lipids and photosynthetic pigments from the wet biomass of the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. **Separation and Purification Technology**, v. 269, p. 118711, 15 ago. 2021.
- VILARROIG, J. et al. Design and optimization of a semi-industrial cavitation device for a pretreatment of an anaerobic digestion treatment of excess sludge and pig slurry. **Water Environment Research**, v. 92, n. 12, p. 2060–2071, 1 dez. 2020.
- WAGHMARE, A. et al. Hydrodynamic cavitation for energy efficient and scalable process of microalgae cell disruption. **Algal Research**, v. 40, n. March, p. 101496, 2019.
- WANG, S. K. et al. Tofu whey wastewater is a promising basal medium for microalgae culture. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 79–84, 1 abr. 2018.
- WU, H. et al. Sequent production of proteins and biogas from *Chlorella* sp. via CO<sub>2</sub> assisted hydrothermal treatment and anaerobic digestion. **Journal of Cleaner Production**, v. 277, p. 123563, 20 dez. 2020.
- WU, J. et al. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 71, p. 323–329, 2017.
- XU, S. et al. Evaluation of bioethanol and biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* grown in biodiesel waste glycerol: A sequential integrated route for enhanced energy recovery. **Energy Conversion and Management**, v. 197, p. 111907, 1 out. 2019.
- ZHAO, B. et al. Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 423–430, 1 jun. 2014.

## 6. CAPÍTULO IV: Impactos da toxicidade de solventes orgânicos na recuperação de recursos do processo de extração de lipídios da microalga de *Scenedesmus obliquus*

### RESUMO

A biomassa residual úmida obtida após a extração dos lipídios das microalgas é rica em carbono e nutrientes, e tem grande potencial de uso como substrato na digestão anaeróbia, no cultivo subsequente de microalgas e no cultivo de plantas vasculares. Porém, os resíduos dos solventes orgânicos podem inviabilizar o uso da biomassa nessas aplicações. Neste trabalho, os solventes acetato de etila (AE), isopropanol (IP) e a mistura de hexano e etanol (HE) foram utilizados para avaliar o rendimento e a qualidade dos lipídios extraídos da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. O AE e a mistura HE foram selecionados para avaliar o efeito tóxico na digestão anaeróbia, no cultivo da microalga, e na germinação de sementes. O rendimento de extração de lipídios foi de 83,1%, 55,4% e 37,5% para HE, AE e IP, respectivamente, em que AE extraiu majoritariamente lipídios neutros. Na mistura HE, o hexano não apresentou efeito significativo nos ensaios de toxicidade devido a sua baixa solubilidade na fração aquosa. No entanto, o etanol nessa mistura migra para a fase aquosa e a concentração efetiva a 50% (CE<sub>50</sub>), que equivale a concentração do solvente responsável por inibir ou levar a morte de 50% dos organismos, foi 3,78, 26,97 e 4,97 g L<sup>-1</sup> para arqueas metanogênicas, *S. obliquus* e sementes de alface, respectivamente. O AE apresentou CE<sub>50</sub> de 18,74, 18,02 e 5,85 g L<sup>-1</sup> para arqueas metanogênicas, *S. obliquus* e sementes de alface, respectivamente. O AE é menos tóxico para os microrganismos anaeróbios e germinação de sementes, quando comparado com o etanol, que por outro lado é menos tóxico para *S. obliquus*. O acetato de etila é ambientalmente apropriado para uso industrial, por se tratar de um solvente verde e com baixa toxicidade. Além disso, a concentração de acetato de etila presente na fase aquosa contendo a biomassa residual é baixa devido à menor solubilidade em água quando comparado com o etanol. Os resultados deste estudo inédito estabelece um critério crucial a ser considerado na seleção de solventes, quando se objetiva a recuperação de recursos da biomassa residual após a extração de lipídios.

**PALAVRAS-CHAVE:** Digestão anaeróbia; germinação de sementes; acetato de etila; etanol; CE<sub>50</sub>; *Tetrademus obliquus*.

## 6.1. INTRODUÇÃO

As microalgas têm se destacado como uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis, biofertilizantes, alimentos e rações (ALVAREZ et al., 2021; MOLINO et al., 2018; ROCHA et al., 2019; SILVA et al., 2020). Dentre as principais vantagens, destaca-se o grande potencial de produção de biomassa, e a possibilidade de serem cultivadas utilizando águas salobras ou residuárias, impróprias para o cultivo de plantas terrestres. Além disso, possuem grande potencial para captura do CO<sub>2</sub> proveniente de emissões antrópicas (KLIGERMAN; BOUWER, 2015).

A extração dos lipídios para produção de biodiesel a partir da biomassa úmida utiliza majoritariamente solventes orgânicos (DU; SCHUUR; BRILMAN, 2017). Após a extração desse composto há a geração de um resíduo que representa de 60 a 85% da biomassa inicial, em base seca (PRÉAT et al., 2020). Essa biomassa residual é formada por compostos orgânicos rico em carbono e nitrogênio, presos aos fragmentos da parede celular (GÜNERKEN et al., 2015). Vários trabalhos tem verificado o potencial de uso da biomassa desengordurada para produção de metano (MARKOU et al., 2020; ROKICKA et al., 2020), como fonte de nutrientes e carbono para cultivos de microalgas (KATIYAR et al., 2018) e como bioestimulante ou biofertilizante para germinação de sementes e crescimento de plantas (FERREIRA et al., 2019; MARTINI et al., 2021; VIEGAS; GOUVEIA; GONÇALVES, 2021).

A biomassa residual obtida após a extração de lipídios contém solventes orgânicos, em quantidade que depende de suas características, principalmente a solubilidade em água. Os solventes utilizados neste processo são selecionados de acordo com a afinidade com os lipídios das microalgas. De um modo geral, os solventes apolares extraem mais lipídios neutros, que são as fontes de matéria-prima preferencias para serem convertidas a biodiesel (WU et al., 2017; ZARRINMEHR et al., 2022). No entanto, alguns lipídios neutros formam complexos com lipídios polares no citoplasma, exigindo o uso de solventes com maior polaridade para facilitar sua migração para a fase apolar (SÁNCHEZ-BAYO et al., 2020). Assim, é importante selecionar um solvente, ou misturas de solventes, com polaridade intermediária para aumentar o rendimento de extração de lipídios (de JESUS et al., 2019).

Há uma grande quantidade de trabalhos publicados que avaliam a eficiência de extração de lipídios das microalgas com o uso de diversos solventes orgânicos, principalmente hexano (de JESUS et al., 2019), assim como a mistura de clorofórmio e metanol (ARABIAN, 2022). No entanto, outros autores testaram diversos solventes e misturas como hexano e etanol (ESCORSIM et al., 2018), acetato de etila (SÁNCHEZ-BAYO et al., 2020) e isopropanol

(SAINI et al., 2021). Esses solventes apresentam uma polaridade maior que o hexano, e são menos tóxicos que a mistura clorofórmio e metanol.

Os solventes devem ser selecionados de acordo com os princípios da química verde, com um bom rendimento de extração de lipídios, baixo consumo de energia para recuperação, e baixa toxicidade a saúde humana e ao meio ambiente (ANGLES et al., 2017). Hexano, acetato de etila, etanol e isopropanol são reconhecidos pela agência Norte Americana *Food and Drug Administration* (FDA) como produtos que se enquadram na categoria geralmente reconhecida como seguro (em inglês GRAS). Dentre estes, o acetato de etila, etanol e isopropanol são considerados como solventes verdes (ALFONSI et al., 2008).

No contexto da recuperação de resíduos, é importante avaliar a toxicidade dos solventes verdes para as comunidades de microrganismos anaeróbios, microalgas e plantas, e assim definir a melhor destinação da biomassa residual após a extração de lipídios. Dentre os poucos estudos que avaliaram a toxicidade dos solventes na digestão anaeróbia, Sánchez-Bayo et al. (2020) observaram um aumento na produção de metano devido à presença de acetato de etila na biomassa residual de *Isochrysis galbana*. Yun et al. (2016) verificaram que concentrações de hexano com DQO acima de 4 g L<sup>-1</sup> inibe a produção de metano na digestão anaeróbia da biomassa de *C. vulgaris*. Porém, não há estudos em que tenham sido investigados o efeito de diferentes concentrações de acetato de etila, e o efeito combinado do etanol e hexano na digestão anaeróbia da biomassa residual. Também não há informações sobre a toxicidade do acetato de etila e da mistura de hexano e etanol em cultivos fotoautotróficos de microalgas, e da fitotoxicidade desses solventes em plantas.

No presente trabalho, os solventes acetato de etila, isopropanol e a mistura de hexano e etanol (2:1) foram utilizados para avaliar o rendimento e as classes de lipídios extraídos de *Scenedesmus obliquus* BR003. Os rendimentos foram comparados com a mistura de clorofórmio e metanol, conforme o método Bligh-Dry. O efeito inibitório dos solventes e misturas também foi avaliado na digestão anaeróbia, no cultivo de microalgas, e na germinação de sementes, e a partir destes dados, a concentração efetiva de 50% (EC<sub>50</sub>) foi determinada. Este estudo contribui com informações adicionais para a seleção de solventes visando a recuperação de recursos do efluente contendo a biomassa residual após a extração de lipídios.

## 6.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1. Produção e coleta da biomassa

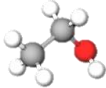

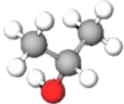
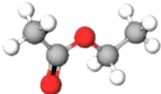
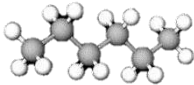

A linhagem *Scenedesmus obliquus* BR003 foi obtida da coleção do Laboratório de Biocombustíveis, do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. As microalgas foram cultivadas em tanque aberto tipo *raceway* com capacidade de 4000 L e meio de cultura formulado com água da rede de abastecimento e fertilizantes agrícolas nas seguintes concentrações: 171,12 mg L<sup>-1</sup> de ureia (Fertilizantes Heringer, Brasil), 44,36 mg L<sup>-1</sup> de monofosfato de amônio (Yara Brasil Fertilizantes, Brasil), 176,33 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (Fertilizantes Heringer, Brasil), 45,96 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio hepta-hidratado (Multitécnica, Brasil) e 14,65 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de ferro monohidratado (Pigminas, Brasil). O carbono foi fornecido na forma de CO<sub>2</sub>, por meio da injeção de gás de combustão, com aproximadamente 12% (v/v) de CO<sub>2</sub>. A intensidade média diária de radiação foi 752,1  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sob luz solar direta, com temperatura entre 20 e 30 °C. O crescimento da cultura foi monitorado diariamente pela densidade óptica a 750 nm medida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO, Alemanha).

A biomassa foi coletada no 12º dia de cultivo durante a fase estacionária de crescimento e concentrada pelo processo de floculação (Poliamina Catiônica, SNF Floerger, França), seguida de filtração por gravidade com membrana de poliéster com porosidade média de 100  $\mu\text{m}$ . A biomassa coletada foi caracterizada e armazenada a -20°C em recipientes estéreis até a realização dos experimentos. Os teores de sólidos totais da biomassa foi 50,4±2,5 g L<sup>-1</sup>, cinzas 11,66±0,82%, proteínas solúveis 40,84±1,40%, carboidratos 11,53±1,08%, lipídios 17,62±0,94%, carbono orgânico total 40,77±0,46%, nitrogênio total 9,33±0,13%, DQO 96,87±0,08 gO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> e pH 7,33.

### 6.2.2. Extração de lipídios

A eficiência da extração de lipídios de *S. obliquus* foi avaliada com o uso dos solventes Acetato de Etila (AE), Isopropanol (IP) e mistura Hexano:Etanol (HE) na proporção 2:1, conforme proposto Escorsim et al. (2018). A metodologia proposta por Bligh e Dyer (BD) foi utilizada como tratamento controle (de JESUS et al., 2019). Os solventes utilizados e suas propriedades são apresentados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1: Propriedades dos solventes utilizados na extração dos lipídios de *Scenedesmus obliquus* BR003

Propriedades	Etanol	Metanol	Isopropanol	Acetato de Etila	Hexano	Clorofórmio
	$C_2H_5OH$	$CH_3OH$	$C_3H_8O$	$C_4H_8O_2$	$C_6H_{14}$	$CHCl_3$
Fórmula molecular						
Densidade a 20 °C (g m <sup>-3</sup> )	0,789	0,79	0,786	0,902	0,6606	1,48
Solubilidade em H <sub>2</sub> O (g L <sup>-1</sup> )	Miscível	Miscível	Miscível	87,0 <sup>b</sup>	0,0095 <sup>b</sup>	8,0 <sup>b</sup>
Índice de polaridade <sup>a</sup>	5,2	5,1	3,9	4,4	0,1	4,1
Classe	Álcoois	Álcoois	Álcoois	Éster	Hidrocarboneto	Halogenado
CAS	64-17-5	67-56-1	67-63-00	141-78-6	110-54-3	67-66-3
Pureza	≥ 99,6%	≥ 99,8%	≥ 99,5%	≥ 99,5%	≥ 98,5%	≥ 99,8%
Fabricante	Hexis S/A (Brasil)	Dinâmica Ltda (Brasil)	Dinâmica Ltda (Brasil)	Êxodo Científica (Brasil)	Labsynth Ltda (Brasil)	Labsynth Ltda (Brasil)

(a) Polaridade em relação à água conforme Ramluckan et al. (2014)

(b) Solubilidade a 20 °C

A extração de lipídios a partir da biomassa seca foi realizada em tubos tipo Falcon de 50 mL, em triplicata. A biomassa liofilizada foi rompida por maceração em gral e pistilo por 10 minutos. Para extração dos lipídios, utilizou-se 1 g da biomassa e 30 mL dos solventes AE ou IP, ou da mistura HE. A suspensão foi agitada a 300 rpm por 30 minutos em mesa de agitação orbital a 25 °C. As amostras foram centrifugadas a 3.600 g por 10 minutos. Na sequência, a fase orgânica foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL que foram mantidos em estufa a 105 °C até a completa evaporação dos solventes para quantificação gravimétrica dos lipídios. Foram realizadas três extrações subsequentes nas mesmas condições descritas anteriormente.

Para a extração dos lipídios pela mistura de solventes do método BD, utilizou 1 g da biomassa seca e rompida, 20 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e 8 mL de água deionizada. A mistura foi agitada a 300 rpm por 30 minutos em mesa de agitação orbital a 25 °C. As amostras foram centrifugadas a 3.600 g por 10 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi transferido para um funil de separação e 10 mL de clorofórmio foi adicionado. Após a separação das fases, a fração orgânica foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL que foram mantidos em estufa a 105 °C até a completa evaporação do solvente orgânico para quantificação gravimétrica dos lipídios. Foram realizadas três extrações subsequentes nas mesmas condições descritas anteriormente.

### 6.2.3. Ensaios de toxicidade

Os solventes AE e Hex:EtOH foram selecionados para avaliar o efeito inibitório na digestão anaeróbia, no cultivo de microalgas, e na germinação de sementes, simulando concentrações presentes na biomassa residual, após a extração de lipídios da microalga. A toxicidade do AE foi avaliada por meio de um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com a adição do solvente em 5 níveis: 0, 2,5, 5, 10 e 20 g L<sup>-1</sup>. No ensaio de toxicidade da mistura HE, o efeito individual e da interação dos solventes foram avaliadas com o uso do delineamento composto central rotacional (DCCR) com esquema fatorial 2<sup>2</sup> com seis pontos axiais e três repetições no ponto central, conforme a Tabela 6.2. As concentrações (níveis) de HE foram determinadas com o auxílio do diagrama de equilíbrio do sistema água, etanol e hexano, conforme Gomis et al. (2007).

Tabela 6.2: Concentrações de Hexano e Etanol utilizados no delineamento composto central rotacional (DCCR)

Solventes	Níveis				
	- $\alpha$	(-)	0	(+)	+ $\alpha$
Hexano (g L <sup>-1</sup> )	0,0	0,17	0,58	0,98	1,15
Etanol (g L <sup>-1</sup> )	0,0	7,4	25,4	43,4	50,9

### *Digestão anaeróbia*

A biomassa úmida de *S. obliquus* utilizada como substrato nos ensaios de digestão anaeróbia foi rompida por ultrassom (VCX 750, Sonics & Materials, EUA) com sonda de 13 mm e frequência 20 kHz, por 5 minutos em banho de gelo para evitar superaquecimento da amostra.

A digestão anaeróbia foi realizada conforme a metodologia do Potencial Bioquímico do Metano (BMP, na sigla em inglês) (HOLLIGER et al., 2016), em frascos de penicilina de 120 mL preenchido com 60 mL de uma mistura de inóculo anaeróbio e microalgas, na proporção de 2:1 ( $SV_{\text{inóculo}}: SV_{\text{substrato}}$ ) e concentração de sólidos totais igual a  $10 \text{ g L}^{-1}$ , conforme Alzate et al. (2012). Os solventes foram adicionados em cada tratamento conforme as concentrações definidas no item anterior. A alcalinidade do inóculo foi ajustada para  $3,4 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  com a adição de  $5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ , para garantir a capacidade tamponante durante o ensaio, conforme proposto por Holliger et al. (2016). Os frascos foram fechados com septos de borracha butílica e selados com lacres de alumínio. Em seguida, as amostras foram purgadas com nitrogênio e incubadas a  $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e agitação orbital de 60 rpm (430-RFPDE, Nova Ética, Brasil). O volume do biogás produzido foi monitorado por medições periódicas da pressão da parte superior do frasco contendo a fase gasosa (headspace) com manômetro digital (MVR-87, Instrutherm, Brasil). O teor de metano no biogás foi determinado por cromatografia (CG-FID 7820A, Agilent Technologies EUA), padronizado para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP), e normalizado em relação à DQO (substrato + solvente) adicionada em cada tratamento.

O controle negativo nos ensaios consistiu apenas na adição de inóculo, utilizado para quantificar a produção endógena de metano. Essa geração de metano foi subtraída da produção dos tratamentos com microalgas. O experimento foi encerrado assim que a produção diária de metano ficou abaixo de 1% do volume acumulado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O modelo de Gompertz modificado (Equação 6.1) foi utilizado para descrever a cinética de produção de metano e se obter os parâmetros úteis do modelo (MOHSENI; FAN; RODDICK, 2021).

$$Y_{(t)} = Y_m \exp \left[ - \exp \frac{(K e (\lambda - t_i))}{Y_m} + 1 \right] \quad (6.1)$$

em que,  $Y_{(t)}$  ( $\text{mL CH}_4 \text{ gDQO}^{-1}$ ) é o rendimento de metano no tempo  $t$  (d),  $Y_m$  ( $\text{mL CH}_4 \text{ gDQO}^{-1}$ ) é o rendimento máximo de metano,  $K$  ( $\text{mL CH}_4 \text{ gDQO d}^{-1}$ ) é a taxa específica de produção de metano,  $\lambda$  (d) é a fase lag, e  $e$  é o número de Euler (2,71828). Os valores de  $Y_m$ ,  $K$  e  $\lambda$  foram encontrados minimizando a soma de quadrados dos resíduos, pelo o método de gradiente

reduzido generalizado não linear (Microsoft Excel Solver) (MOHSENI; FAN; RODDICK, 2021).

### *Cultivo de microalgas*

A linhagem *S. obliquus* BR003 foi cultivada em frascos estéreis de 250 mL com 150 mL de meio BG-11. A concentração inicial foi ajustada para  $1,58 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. Os cultivos foram mantidos em condições fotoautotróficas sob agitação em incubadora com fotoperíodo e agitação orbital (430-RFPDE, Nova Ética, Brasil) a 120 rpm, com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro), e irradiância média de  $114 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O carbono foi fornecido diariamente na forma de bicarbonato de sódio na quantidade de  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  de cultivo, e o pH mantido entre 6,5 e 8,0, controlado pela adição de solução de HCl  $2 \text{ mol L}^{-1}$ . O crescimento das microalgas foi monitorado diariamente por densidade ótica a 680nm em um leitor de microplacas (multiskan GO, Thermo scientific, Alemanha). O ensaio foi realizado com três repetições para cada tratamento.

No terceiro dia de cultivo, durante a fase exponencial de crescimento, os solventes foram adicionados conforme concentrações definidas no item 6.2.3 (FALCONÍ et al., 2021). O ensaio de toxicidade teve duração de 96 horas após a adição dos solventes, conforme Dupraz et al. (2019). Ao final do cultivo, amostras de cada tratamento foram coletadas para contagem de células usando uma câmara de Neubauer e imagens microscópicas para avaliar as diferenças na morfologia das células devido à toxicidade dos solventes. A taxa específica de crescimento ( $\mu$ , em d<sup>-1</sup>) foi calculada conforme Equação 6.2, descrita por (ANDERSEN, 2005).

$$\mu = \frac{\ln C_f - \ln C_i}{t_f - t_i} \quad (6.2)$$

em que,  $\ln C_i$  é o logaritmo natural da concentração inicial de células do cultivo (cel mL<sup>-1</sup>),  $\ln C_f$  é o logaritmo natural da concentração final de células do cultivo (cel mL<sup>-1</sup>),  $t_f - t_i$  é o intervalo de tempo (dias).

### *Germinação de sementes*

O ensaio de toxicidade foi realizado com sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). Essa cultura foi escolhida por se tratar de uma espécie bioindicadora reconhecida pelas Diretrizes de Ensaio de Efeitos Ecológicos (EPA, 2012). Além disso, quando reidratadas, entram no processo de germinação, com rápidas alterações fisiológicas e tornam-se altamente sensíveis às alterações externas. O teste de germinação foi feito utilizando o extrato da biomassa de *S. obliquus* rompida por ultrassom. O extrato aquoso foi obtido após a filtração da biomassa em

filtro com porosidade média de 8  $\mu\text{m}$  (VIEGAS; GOUVEIA; GONÇALVES, 2021). A condutividade elétrica do extrato foi 1,54 mS/cm e pH 6,3.

A dormência fisiológica das sementes de alface foi quebrada com o armazenamento destas à temperatura de 10 °C por 72 horas. Logo após, a superfície das sementes foi esterilizada com solução de hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos, e lavadas com água deionizada. Em seguida 30 sementes foram dispostas sobre duas folhas de papel Germitest<sup>®</sup> dentro de uma placa de Petri de 90 mm, previamente umedecidas com 4 mL do extrato de microalgas e solventes, conforme as concentrações definidas no item 2.3. Água deionizada foi utilizada como controle negativo. As placas foram tampadas e vedadas com plástico filme, e colocadas em incubadora (430-RFPDE, Nova Ética, Brasil) a temperatura de 20 °C e fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro) com irradiância de 114  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , conforme recomendações de BRASIL, (2009). Os testes foram realizados em quatro repetições. Os filtros, placas de Petri e o extrato de microalgas foram esterilizados em autoclave antes do uso.

Para avaliar os efeitos da fitotoxicidade dos solventes, foram utilizados os parâmetros indicadores: germinação relativa das sementes ( $GR$ , %) (Equação 6.3), comprimento relativo das raízes ( $CRR$ , %) (Equação 6.4), e o índice de germinação ( $IG$ , %) (Equação 6.5), conforme Gerber et al. (2017).

$$GR = 100 \frac{NSC}{NSB} \quad (6.3)$$

$$CRR = 100 \frac{CRC}{CRB} \quad (6.4)$$

$$IG = GR \times CRR / 100 \quad (6.5)$$

em que,  $NSC$  é o número de sementes germinadas no tratamento com o composto;  $NSB$  é o número de sementes germinadas no tratamento controle;  $CRC$  é o comprimento das raízes no tratamento com o composto (mm);  $CRB$  é o comprimento das raízes no tratamento controle (mm). Foram consideradas como germinadas as sementes que emitiram raiz primária com 2 mm ou mais de comprimento.

O ensaio foi encerrado ao 7º dia, e 10 plântulas de cada tratamento foram escolhidas aleatoriamente para obtenção das medidas de comprimento da plântula (CP), da raiz (CR) e da parte aérea (CPA).

#### *Determinação da curva concentração-reposta e $CE_{50}$*

A concentração efetiva a 50% ( $CE_{50}$ ) dos solventes AE e HE foi determinada a partir do modelo de Hill, conforme Equação 6.6 (ZHENG et al., 2013). Os valores de  $CE_{50}$  foram calculados usando a produção de metano ( $\text{mL gDQO}^{-1}$ ), taxa de crescimento específica ( $\text{d}^{-1}$ ) e

índice de germinação (%), para os ensaios de digestão anaeróbia, cultivo de microalga e germinação de sementes, respectivamente.

$$R(x) = R_{min} + (R_{máx} - R_{min}) \frac{x^H}{x^H + CE_{50}^H} \quad (6.6)$$

em que  $R(x)$  é a resposta biológica;  $R_{máx}$  e  $R_{min}$  são a máxima e mínima resposta, considerada como 100% e 0% respectivamente;  $H$  é o número de Hill;  $x$  é a concentração variável dos solventes ( $\text{g L}^{-1}$ ); e  $CE_{50}$  é a concentração efetiva dos solventes ( $\text{g L}^{-1}$ ) para obter 50% da resposta ( $R(x)$ ), quando comparado ao controle.

#### 6.2.4. Procedimentos analíticos

O teor de água, sólidos totais, voláteis e fixos (cinzas), assim como a demanda química de oxigênio (DQO) e nitrogênio total Kjeldahl (NTK) foram determinados conforme metodologia proposta por APHA (2017). A DQO teórica dos solventes foi calculada a partir da estequiometria da reação de oxidação (DIONISI et al., 2018). O carbono orgânico total (COT) foi quantificado em analisador de carbono (SSM-5000A, Shimadzu, Japão). O teor de lipídios totais da biomassa foi determinado pelo método gravimétrico proposto por Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1987). As proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951). Os carboidratos neutros foram determinados pelo método fenol - ácido sulfúrico de Dubois, adaptado para microplacas por Masuko et al. (2005). A alcalinidade e a concentração de ácidos orgânicos totais do digestato foram determinados conforme metodologia proposta por Ripley et al. (1986).

#### 6.2.5. Análise de dados

Os dados de extração de lipídios e taxa de crescimento do cultivo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey *post hoc* a 5 % de probabilidade.

### 6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 6.3.1. Extração de lipídios

A extração de lipídios da biomassa de *Scenedesmus obliquus* BR003 em três estágios permitiu obter 14,6%, 9,8% e 6,6% de lipídios extraídos da biomassa seca com os solventes hexano:etanol (HE), acetato de etila (AE) e isopropanol (IP), respectivamente (Figura 6.1A). Esses teores representam 83,1%, 55,4% e 37,5% de rendimento de lipídios, em relação ao teor de lipídios totais da biomassa. Não houve diferença no rendimento de extração entre método

Bligh-Dyer (BD) e o tratamento com uso da mistura HE ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ). O método BD é utilizado para extração de lipídios de microalgas devido ao alto rendimento de extração, porém, a toxicidade e o alto custo do clorofórmio o torna inapropriado para uso em escala industrial (SAINI et al., 2021).

Os resultados obtidos indicam que o uso de misturas de solventes permite melhor ajuste da polaridade para obter maiores rendimentos de extração. Os solventes apolares como o clorofórmio e hexano, com índice de polaridade 4,1 e 0,1 respectivamente, tem uma maior seletividade para extração de lipídios apolares (ZARRINMEHR et al., 2022). Ao adicionar um solvente polar, como o metanol e etanol, a polaridade da mistura aumenta e favorece um melhor rendimento de extração de lipídios, devido a solubilização dos lipídios polares, principalmente os lipídios estruturais como fosfolipídios e glicolipídios (de JESUS et al., 2019). Escorsim et al. (2018) obtiveram um maior rendimento de extração de lipídios com o uso do hexano e etanol na proporção 2:1, representando um aumento de 192% e 27% quando comparado com a extração utilizando apenas o hexano ou etanol, respectivamente.

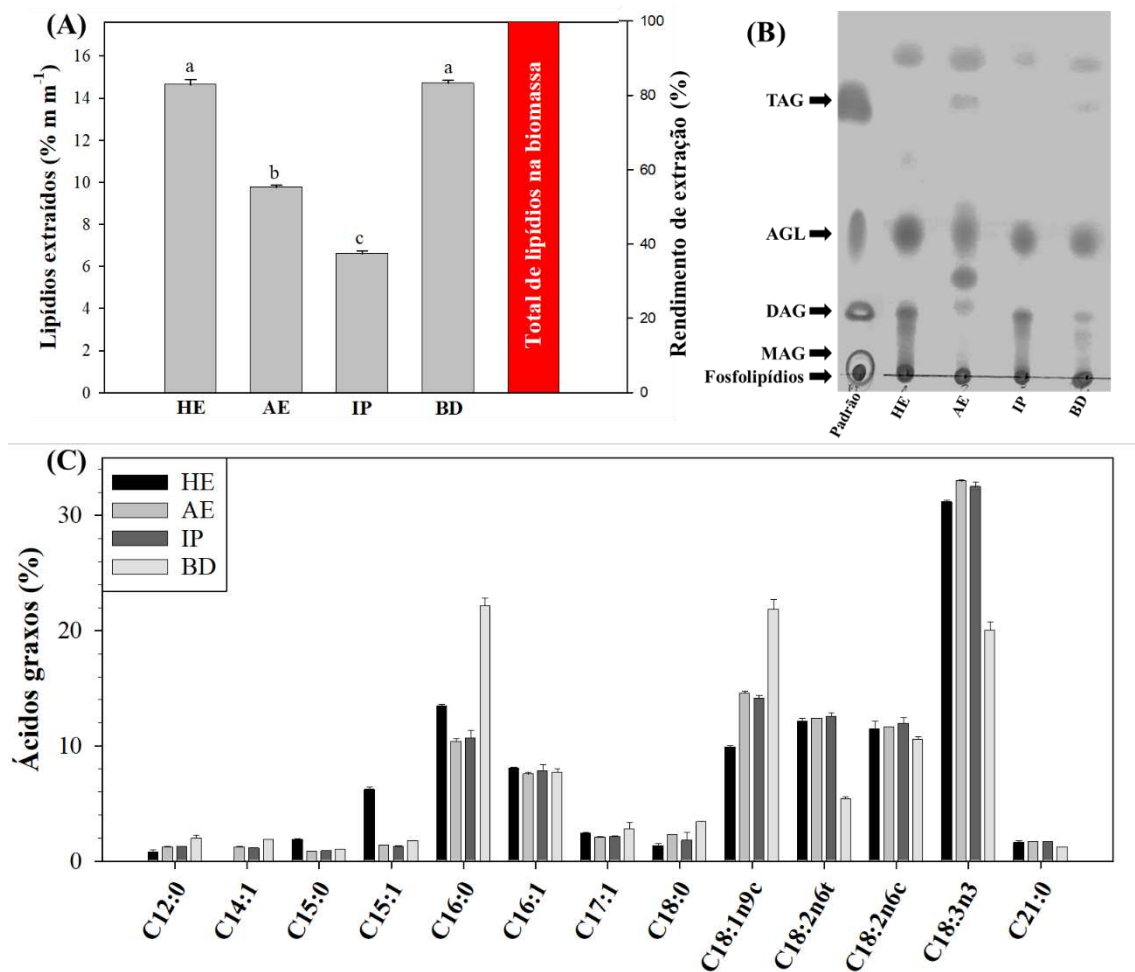


Figura 6.1: (A) Total de lipídios extraídos e rendimento de extração, (B) cromatografia em camada delgada e (C) composição de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAMES) dos lipídios de *Scenedesmus obliquus* BR003 extraídos com hexano e etanol (HE), acetato de etila (AE), isopropanol (IP) e pelo método Bligh-Dyer (BD).

O uso do solvente verde acetato de etila permitiu obter rendimento de extração acima de 50%, com predominância de ácidos graxos e TAGs (Figura 6.1B). O AE é um solvente apolar da classe dos ésteres, e tem uma ótima seletividade para extração dos lipídios neutros, que é a classe de lipídios efetivamente convertida a biodiesel (WU et al., 2017). Além disso, devido ao maior índice de polaridade (4,4), o AE também consegue solubilizar e extrair parte dos lipídios polares. Já o isopropanol é um solvente polar e miscível em água, com grande capacidade de permear as células e solubilizar os lipídios celulares, principalmente fosfolipídios, DAG, MAG e AGL (Figura 6.1B). Porém, o rendimento de extração de lipídios foi baixo, devido à baixa seletividade em detrimento de sua polaridade (índice de polaridade de 3,9), sendo inferior à dos álcoois de cadeia curta, como etanol e metanol, mas superior aos solventes de elevada afinidade aos lipídios neutros, como o hexano (SAINI et al., 2021).

Conforme apresentado na Figura 6.1C, os principais ácidos graxos encontrados nos óleos extraídos foram: C16:0 (Palmítico), C16:1 (palmitoleico), C18:1 (Oléico), C18:2n6t (Linoelaidico), C18:2n6c (Linoléico) e C18:3 (Linolênico). Esses ácidos graxos representam mais de 90% do total de FAMES, e são responsáveis por garantir a qualidade e propriedades dos biocombustíveis (WU et al., 2017). As extrações com diferentes solventes afetaram os percentuais de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Os maiores teores de ácidos graxos saturados foram observados nos tratamentos BD e HE, com 28,1% e 19,1%, respectivamente. Já os maiores teores de poli-insaturados foram observados nos tratamentos AE e IP, com 56,9% para os dois tratamentos. De acordo com Zarrinmehr et al. (2022) a polaridade do solvente afeta a composição dos ácidos graxos, sendo que solventes apolares aumentam a extração de ácidos graxos saturados, enquanto os solventes polares aumentam a extração de poli-insaturados e monoinsaturados.

Apesar do maior rendimento de extração obtido com a mistura de hexano e etanol, o uso destes solventes não é apropriado em escala industrial, pois, o hexano não é considerado um solvente verde (ALFONSI et al., 2008), e o etanol é miscível em água, dificultando e até mesmo inviabilizando a recuperação deste álcool, que se particiona majoritariamente na fase aquosa que compõe a água residuária do processo de extração dos lipídios das microalgas.

Embora apresente menores rendimentos de extração de lipídios, quando comparado com a extração utilizando a mistura de hexano e etanol, o acetato de etila é um solvente de baixo custo e ambientalmente apropriado para uso industrial, por se tratar de um solvente verde com baixa solubilidade em água, o que facilita a sua recuperação (WU et al., 2017).

### 6.3.2. Efeito inibitório dos solventes

#### *Digestão anaeróbia*

O efeito inibitório da mistura dos solventes HE na produção de metano foi avaliado com uso de um DCCR. O modelo foi avaliado quanto à falta de ajuste, análise de identidade, análise de distribuição dos resíduos e pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). O modelo apresentou um bom ajuste aos dados de produção de metano com o  $R^2$  de 62%, que representa uma boa correlação entre os valores previstos e os dados experimentais.

De acordo com os coeficientes associados a cada parâmetro, o hexano não apresentou efeito inibitório para a produção de metano. De fato, Yun et al. (2016) verificaram que o hexano causa inibição da produção de metano com dose acima de  $1,13 \text{ g L}^{-1}$ , e neste trabalho foi utilizada a dose máxima de  $1,15 \text{ g L}^{-1}$ . Estudos recentes indicam que as comunidades anaeróbias compostas por bactérias redutoras de sulfato, sintróficas e fermentativas se associaram com arqueas metanogênicas para metabolizar alcanos em metano (BOHUTSKYI et al., 2019). Enquanto o etanol apresentou efeito inibitório significativo para a produção de metano. Quanto maior a dose de etanol na biomassa algal, menor foi a produção de metano.

O modelo Gompertz modificado se ajustou bem aos dados ( $R^2 > 97,3\%$ ), e foi utilizado para modelar a curva de produção de metano (Figura 6.2A), e se obter parâmetros cinéticos e avaliar o efeito inibitório do etanol na produção de metano (Tabela 6.3) (MOHSENI; FAN; RODDICK, 2021). A produção máxima de metano foi obtida no tratamento sem adição de etanol e  $0,58 \text{ g L}^{-1}$  de hexano. Ao se adicionar etanol houve inibição da atividade dos microrganismos metanogênicos em todos os tratamentos. Essa inibição gerou um aumento na concentração final de ácidos orgânicos e redução do pH ao final do ensaio (Tabela 6.3), devido a redução da atividade metanogênica e acúmulo de ácidos orgânicos utilizado como substrato pelas bactérias acetogênicas (YANTI et al., 2014). É importante salientar que nos tratamentos com as maiores doses ( $43,40$  e  $50,85 \text{ g L}^{-1}$ ) a inibição foi definitiva, e não houve produção de metano.

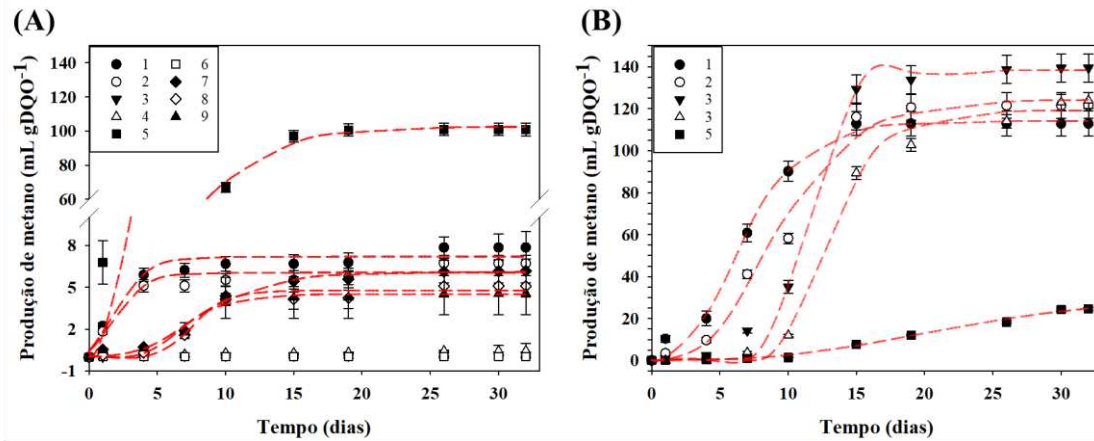


Figura 6.2: Produção acumulada de metano em testes de BMP com adição (A) hexano e etanol (1) HE-0,17:7,4; (2) HE-0,98:7,4; (3) HE-0,17:43,4; (4) HE-0,98:43,4; (5) HE-0,58:0,0; (6) HE-0,58:50,9; (7) HE-0,0:25,4; (8) HE-1,15:25,4; (9) HE-0,98:25,4 g L<sup>-1</sup>, e (B) acetato de etila com (1) 0,0; (2) AE-2,5; (3) AE-5; (4) AE-10; (5) AE-20 g L<sup>-1</sup>

Tabela 6.3: Parâmetros cinéticos e dados observados da produção de metano, pH e ácidos orgânicos ao final do ensaio de BMP

Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Produção de CH <sub>4</sub> (mL CH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup> )	Parâmetros cinéticos			pH final	Ácidos orgânicos (mg L <sup>-1</sup> )
		$Y_m$	$K$	$\lambda$		
<i>Controle</i>	112,86±6,0	114,07	13,72	2,5	7,73	935,5
<i>Hexano:Etanol</i>						
HE-0,17:7,4	7,85 ± 1,13	7,18	1,74	0	5,46	3.401,8
HE-0,98:7,4	6,71 ± 0,58	6,04	1,52	0	5,42	3.401,8
HE-0,17:43,4	0,16 ± 0,16	-	-	-	7,89	1.105,6
HE-0,98:43,4	0,44 ± 0,53	-	-	-	7,70	1.190,6
HE-0,58:0,0	100,96 ± 3,74	102,42	10,06	2,64	7,81	595,3
HE-0,58:50,85	0,01 ± 0,11	-	-	-	7,84	1.020,6
HE-0,0:25,4	6,17 ± 0,84	6,09	0,64	3,51	5,45	3.316,8
HE-1,15:25,4	5,09 ± 0,77	4,75	1,15	5,62	5,35	3.401,8
HE-0,98:25,4	4,55 ± 1,52	4,49	0,77	4,16	5,40	3.401,8
<i>Acetato de etila</i>						
AE-2,5	121,51 ± 6,17	124,36	11,78	3,98	7,66	595,3
AE-5,0	139,41 ± 1,24	138,3	29,49	8,81	7,48	510,3
AE-10,0	123,86 ± 3,82	119,21	16,18	9,35	6,93	1.190,6
AE-20,0	24,54 ± 0,22	32,29	1,22	9,47	6,67	2.296,2

$Y_m$ : rendimento máximo de metano (mL CH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup>).

$K$ : taxa específica de produção de metano (mL CH<sub>4</sub> gDQO d<sup>-1</sup>).

$\lambda$ : fase de lag (d).

Na digestão anaeróbia os álcoois são obtidos na etapa de acidogênese e fornecidos como substratos para as bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas (YANTI et al., 2014). Vários estudos têm verificado que o aumento da concentração de álcoois produzidos por microrganismos nos reatores reduz a concentração de ácidos orgânicos e evita a acidificação,

além de aumentar a produção de metano (MA et al., 2020; WU et al., 2015; YU et al., 2018). Henry et al. (1996) verificaram que o etanol adicionado em baixas concentrações ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) é convertido diretamente em metano pelas arqueias metanogênicas. Porém, em altas concentrações há inibição da atividade metanogênica. O etanol reduz o crescimento celular das bactérias e arqueias devido à sua toxicidade, e afeta a integridade da membrana celular, resultando em transporte descontrolado de solutos e inativação de enzimas (HUFFER et al., 2011). De fato, Ingram e Buttke (1985) comprovaram que a maioria das bactérias exibe inibição de crescimento em concentrações de etanol entre 1% a 10%, e poucas crescem em concentrações acima de 10%. O uso do etanol para extração de lipídios das microalgas inviabiliza a digestão anaeróbia da biomassa residual úmida, pois, devido a miscibilidade em água, todo o etanol utilizado estará presente na biomassa residual em concentrações acima de 10%.

Ao contrário ao que foi verificado para o etanol, o acetato de etila apresentou um efeito positivo na produção de metano. A adição do solvente aumentou o rendimento de metano nos tratamentos com concentrações de AE até  $10 \text{ g L}^{-1}$ . O maior rendimento foi obtido no tratamento com adição de  $5 \text{ g L}^{-1}$ , e equivale ao incremento de 24% na produção de metano em relação ao tratamento controle (sem adição de solventes). Porém, no tratamento com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de AE houve uma redução de 88% no rendimento de produção de metano em relação ao tratamento controle.

O modelo Gompertz modificado foi utilizado para modelar a curva de produção de metano (Figura 6.2B) e obter parâmetros cinéticos, com um bom ajuste ( $R^2 > 98\%$ ). Com o aumento na concentração do AE, houve aumento na fase lag ( $\lambda$ ), além de maiores concentrações de ácidos orgânicos totais e redução do pH ao final do ensaio. A maior extensão da fase lag indica que houve inibição temporária da atividade dos microrganismos anaeróbios, principalmente os metanogênicos (BOHUTSKYI et al., 2019). A diminuição do pH é causada pelo acúmulo de ácidos orgânicos como produtos intermediários, que são produzidos durante a etapa de acetogênese (YANTI et al., 2014). A inibição da atividade metanogênica ocorre quando o acúmulo de ácidos orgânicos é maior que a capacidade tamponante do sistema, como observado na concentração de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de AE.

Durante a digestão anaeróbia, o AE é transformado em ácido carboxílico e álcool, que são então convertidos a acetato e hidrogênio durante a etapa de acetogênese (SÁNCHEZ-BAYO et al., 2020; YANTI et al., 2014). O acetato é um intermediário fundamental na decomposição anaeróbica da matéria orgânica, e contribui com aproximadamente 60 a 70% do metano produzido, pois é um importante precursor da metanogênese (PAN et al., 2021). Assim, o acetato de etila utilizado para extração de lipídios das microalgas, e presente na biomassa

residual em concentrações de até  $10 \text{ g L}^{-1}$ , contribui com a produção de metano por meio da digestão anaeróbia. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, após a extração de lipídios o efluente contendo resíduo de AE deverá ser diluído aproximadamente 9 vezes, visando a digestão anaeróbia.

#### *Cultivo de microalgas*

O efeito inibitório da mistura dos solventes HE no crescimento do cultivo de *S. obliquus* BR003 foi avaliado com uso de um DCCR. O modelo foi avaliado pela falta de ajuste, análise de identidade, análise de distribuição dos resíduos e pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). O modelo apresentou um bom ajuste aos dados de taxa de crescimento com o  $R^2$  de 95%, que representa uma boa correlação entre os valores previsto e os dados experimentais. De acordo com os coeficientes associados a cada parâmetro, apenas o etanol apresentou efeito inibitório significativo no crescimento de *S. obliquus*.

Na Figura 6.3A é possível observar que após a adição da mistura HE, houve fase lag nos tratamentos com a presença de etanol, indicando que houve inibição. Nos tratamentos com concentrações de 7,4 e 25,4  $\text{g L}^{-1}$  de etanol no cultivo, a inibição foi temporária, e a taxa de crescimento apresentou comportamento parecido com o tratamento sem adição de etanol (Figura 6.3C). Nos tratamentos com concentrações de 43,4 e 50,9  $\text{g L}^{-1}$  de etanol, houve inibição definitiva, levando à redução na taxa de crescimento e morte das células de *S. obliquus*.

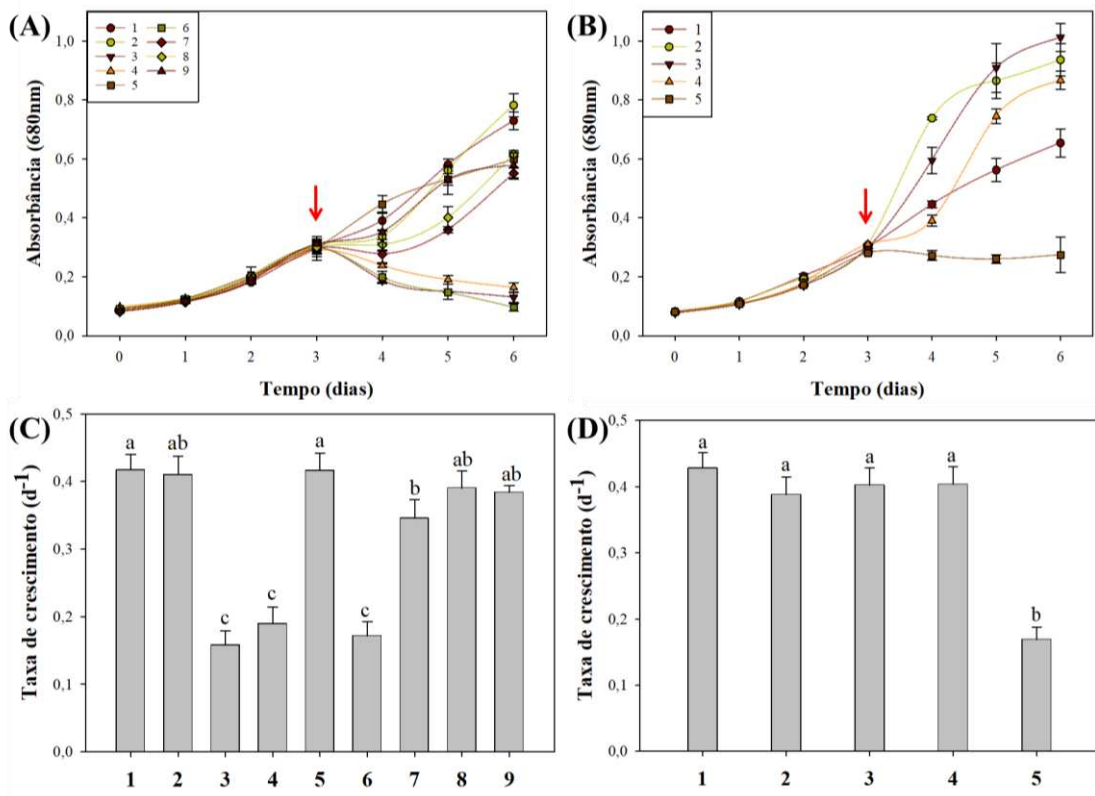


Figura 6.3: Curva de crescimento e taxa de crescimento específica de *Scenedesmus obliquus* BR003 com adição de (A e C) hexano e etanol e (B e D) acetato de etila, respectivamente. As concentrações nos tratamentos são (1) HE-0,17:7,4; (2) HE-0,98:7,4; (3) HE-0,17:43,4; (4) HE-0,98:43,4; (5) HE-0,58:0,0; (6) HE-0,58:50,9; (7) HE-0,0:25,4; (8) HE-1,15:25,4; (9) HE-0,98:25,4  $g L^{-1}$  de hexano e etanol e (1) 0,0; (2) AE-2,5; (3) AE-5; (4) AE-10; (5) AE-20  $g L^{-1}$  de acetato de etila. A adição de solvente foi efetuada no terceiro dia de cultivo, indicado pela seta vermelha

Ao analisar a morfologia das células (Figura 6.4A), observa-se que a adição de etanol deixou as células com o aspecto enrugado. Também houve aumento do tamanho das células nos tratamentos com concentração de 25,4  $g L^{-1}$  de etanol (18 a 20  $\mu m$ ) quando comparado com os demais tratamentos (10 a 13  $\mu m$ ). Os tratamentos com concentrações de 43,4 e 50,9  $g L^{-1}$  de etanol apresentaram evidente clorose das células, com a degradação dos pigmentos verdes.

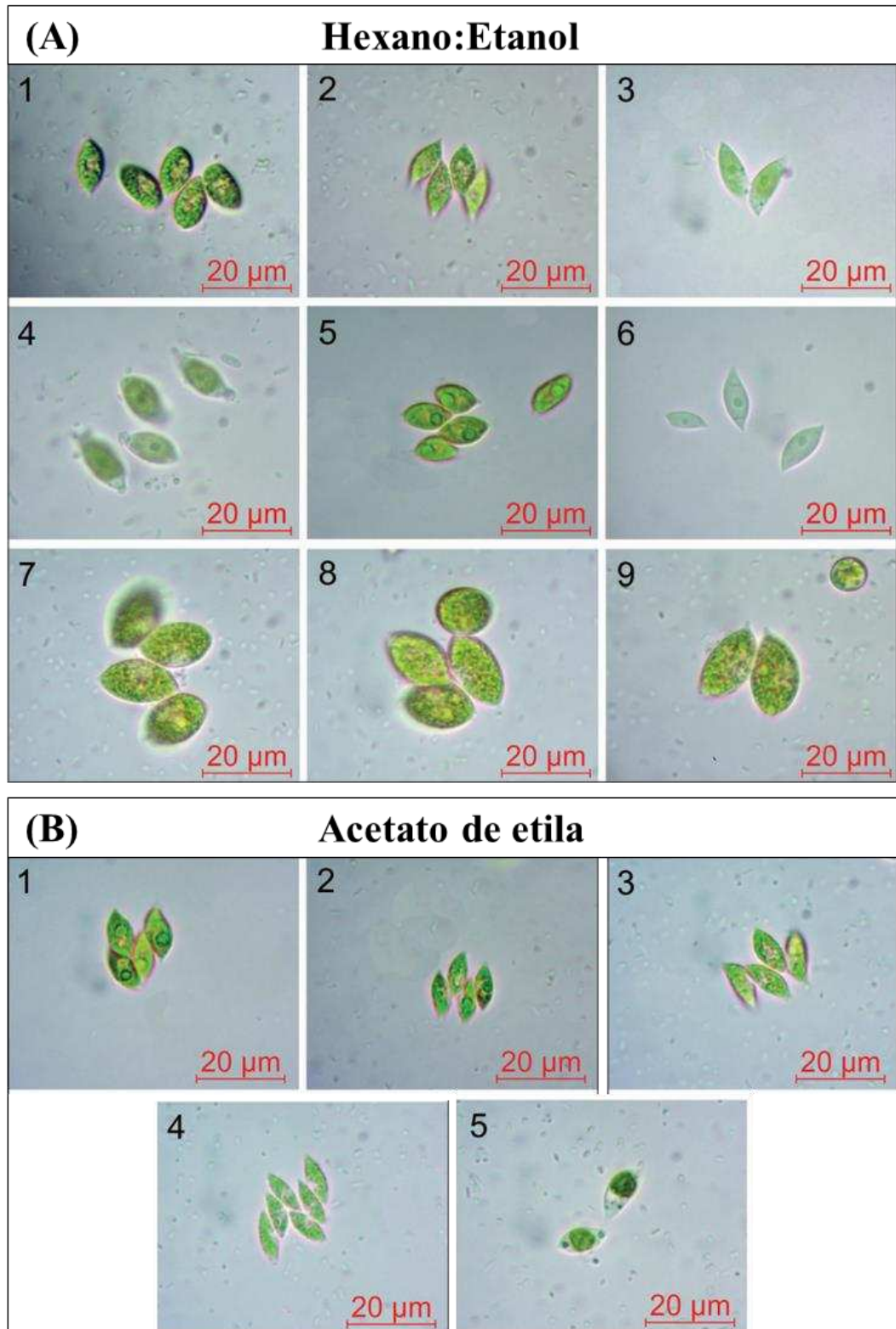


Figura 6.4: Imagens de células de *Scenedesmus obliquus* BR003 em microscopia de campo claro com adição (A) hexano e etanol (1) HE-0,17:7,4; (2) HE-0,98:7,4; (3) HE-0,17:43,4; (4) HE-0,98:43,4; (5) HE-0,58:0,0; (6) HE-0,58:50,9; (7) HE-0,0:25,4; (8) HE-1,15:25,4; (9) HE-0,98:25,4 g L<sup>-1</sup>, e (B) acetato de etila com (1) 0,0; (2) AE-2,5; (3) AE-5; (4) AE-10; (5) AE-20 g L<sup>-1</sup>

Até o presente momento não há trabalhos publicados que avaliaram o efeito do etanol no crescimento de *S. obliquus*. Dentre os poucos estudos com microalgas verdes, Jiang et al.

(2017) verificaram que o etanol causou uma desaceleração significativa no metabolismo primário, como fotossíntese, síntese de proteínas, metabolismo de carboidratos e ATP, em *Chamydomonas reinhardtii*. Os autores também observaram como mecanismo de proteção, a regulação de proteínas relacionadas ao estresse, transportadores, citoesqueleto e reguladores, o que favorece o aumento da fluidez da membrana celular, favorecendo o extravasamento dos compostos intracelulares.

O etanol é um álcool considerado como solvente verde, e amplamente utilizado na extração de compostos intracelulares das microalgas. Por ser miscível em água, todo o etanol utilizado na extração estará presente na biomassa residual e, a depender da concentração, poderá inviabilizar o reaproveitamento deste resíduo, já que concentrações acima de 15% resultam na inativação imediata da maioria dos organismos vegetativo (INGRAM; BUTTKE, 1985). De acordo com o resultado deste trabalho, a biomassa residual contendo até 2,5% (m/v) de etanol pode ser utilizada como fonte de carbono e nutrientes para o cultivo de *S. obliquus*.

Em relação ao acetato de etila é possível observar na Figura 6.3B que após a adição deste solvente no cultivo, houve fase lag apenas nas concentrações de 10 e 20 g L<sup>-1</sup>, indicando que houve inibição. Porém, a inibição no tratamento com 10 g L<sup>-1</sup> foi temporária, e as células voltaram a crescer, e ao final do cultivo a taxa de crescimento foi igual ao tratamento controle, sem adição de AE (Figura 6.3D). Contrariamente, a adição de 20 g L<sup>-1</sup> de AE causou inibição definitiva e com consequente inviabilidade celular das células de *S. obliquus*. Também é possível observar na Figura 6.4B, que a morfologia das células do tratamento com a concentração máxima de AE apresentou aspecto de parede celular danificada.

O acetato de etila é um éster simples considerado como solvente verde, com grande potencial para a extração de lipídios das microalgas. De acordo com o resultado deste trabalho, após a extração dos lipídios, a biomassa residual com até 1% (m/v) de AE pode ser utilizada como fonte de carbono e nutrientes para o cultivo de *S. obliquus*. Destaca-se que este é o primeiro estudo que avalia o efeito inibitório do acetato de etila em cultivos de microalgas.

#### *Germinação de sementes*

A influência dos solventes na germinação e capacidade de desenvolvimento da plântula foi avaliada através do índice de germinação (IG) de cada tratamento em relação ao meio controle, com adição de apenas água deionizada (Tabela 6.4). No tratamento AE-0, no qual foi adicionado o extrato de microalga sem adição de solvente, o IG foi 156,2%, indicando que o extrato de *S. obliquus* apresentou atividade bioestimulante na germinação de sementes de alface (VIEGAS; GOUVEIA; GONÇALVES, 2021). Os fitohormônios, amonoácidos, macro e

micronutrientes presentes no extrato provavelmente são os responsáveis pelos efeitos positivo para a germinação das sementes (FERREIRA et al., 2019; MARTINI et al., 2021; VIEGAS; GOUVEIA; GONÇALVES, 2021).

Tabela 6.4: Efeito da adição do extrato de *Scenedesmus obliquus* BR003 contendo mistura dos solventes hexano e etanol, e acetato de etila na germinação de sementes de alface

<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>GR (%)</b>	<b>CRR (%)</b>	<b>IG (%)</b>	<b>CP (mm)</b>	<b>CR (mm)</b>	<b>CPA (mm)</b>
<i>Controle</i>	100,0	100,0	100,0	24±1,41	12,71±1,5	11,29±1,11
<i>Hexano:Etanol</i>						
HE-0,17:7,4	76,67	57,3	43,93	13,14±1,77	7,29±0,95	5,86±0,9
HE-0,98:7,4	61,67	50,56	31,18	11,57±1,81	6,43±1,27	5,14±0,69
HE-0,17:43,4	0	0	0	0	0	0
HE-0,98:43,4	0	0	0	0	0	0
HE-0,58:0,0	100,0	144,94	144,94	31,14±3,24	18,43±2,57	12,71±1,11
HE-0,58:50,85	0	0	0	0	0	0
HE-0,0:25,4	93,33	29,21	27,27	8,14±0,9	3,71±0,49	4,43±0,53
HE-1,15:25,4	41,67	62,92	26,22	20,0±1,41	8,0±1,0	12,0±0,82
HE-0,98:25,4	50,0	28,09	14,04	8,0±1,0	3,57±0,53	4,43±0,53
<i>Acetato de etila</i>						
AE-0,0	100	156,18	156,18	39,14±3,24	19,86±2,48	19,29±0,95
AE-2,5	83,33	157,3	131,09	38±4,08	20±2,65	18±1,53
AE-5,0	93,33	103,37	96,48	27,57±2,88	13,14±2,48	14,43±1,13
AE-10,0	0	0	0	0	0	0
AE-20,0	0	0	0	0	0	0

(GR) germinação relativa; (CRR) comprimento relativo das raízes; (IG) índice de germinação; (CP) comprimento da plântula; (CR) comprimento das raízes; (CPA) comprimento da parte aérea.

A fitotoxicidade do extrato de microalgas com adição da mistura dos solventes HE foi avaliado com uso de um DCCR. O modelo foi avaliado pela falta de ajuste, análise de identidade, análise de distribuição dos resíduos e pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). O modelo apresentou um bom ajuste aos dados de índice de germinação, com o  $R^2$  de 75,12%, que representa uma boa correlação entre os valores previsto e os dados experimentais. De acordo com os coeficientes associados a cada parâmetro, apenas o etanol apresentou efeito inibitório significativo para a germinação de sementes.

O aumento na concentração do etanol causou uma redução no índice de germinação, com valores abaixo de 44% (Tabela 6.4). Segundo Gerber et al. (2017), um efluente é considerado fitotóxico quando apresenta IG menor que 80%. Além disso, o etanol também afetou no comprimento da raiz (CR) e da parte aérea (CPA), que é uma resposta da planta à compostos tóxicos (LEE et al., 2015). As substâncias fitotóxicas em contato com as sementes

são absorvidas juntamente com a água, impedindo que a germinação se inicie ou afetando no alongamento das raízes (AVELAR AMADO et al., 2020).

Conforme o resultado deste trabalho, o etanol apresentou fitotoxicidade a partir da menor concentração testada ( $7,4 \text{ g L}^{-1}$ ). Também é possível observar esse efeito na Figura 6.5A. Infelizmente a literatura é escassa de informações acerca do efeito inibitório do etanol na germinação de sementes de alface. Dentre os poucos trabalhos, Bradow and Connick (1988) verificaram que o etanol em concentração de até  $1,58 \text{ mg L}^{-1}$  não apresentou fitotoxicidade.

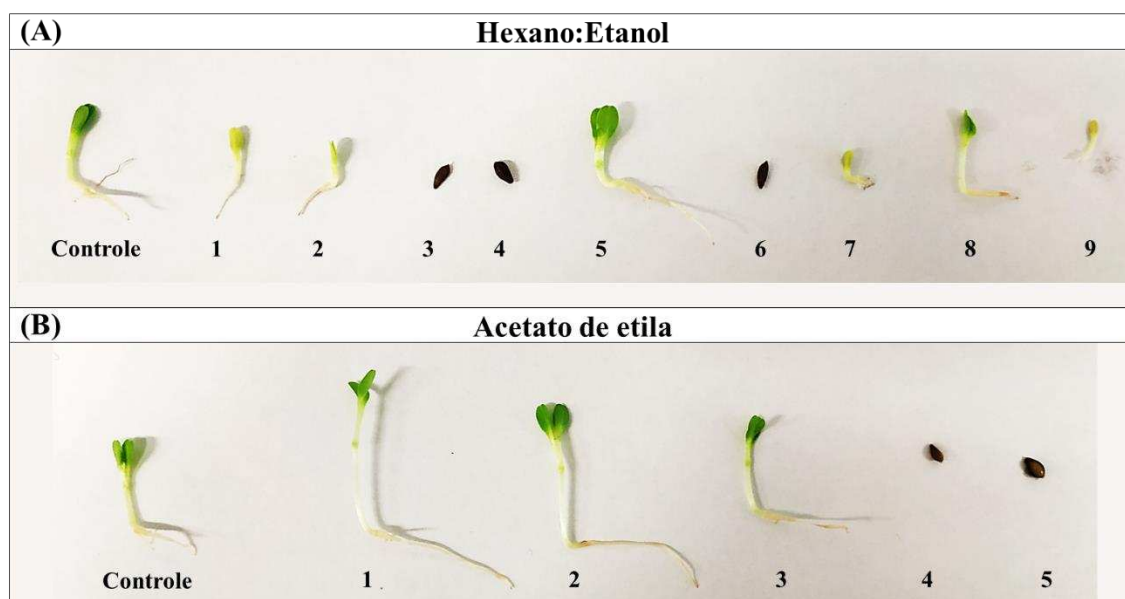


Figura 6.5: Sementes de alface após 7 dias de germinação em extrato de microalgas com (A) hexano e etanol (1) HE-0,17:7,4; (2) HE-0,98:7,4; (3) HE-0,17:43,4; (4) HE-0,98:43,4; (5) HE-0,58:0,0; (6) HE-0,58:50,9; (7) HE-0,0:25,4; (8) HE-1,15:25,4; (9) HE-0,98:25,4  $\text{g L}^{-1}$ , e (B) acetato de etila com (1) AE-0,0; (2) AE-2,5; (3) AE-5; (4) AE-10; (5) AE-20  $\text{g L}^{-1}$ . No controle foi adicionado apenas água deionizada

Em relação ao acetato de etila, o uso do extrato de microalgas com a adição deste solvente não apresentou efeito tóxico na germinação de sementes de alface, até a concentração de  $5 \text{ g L}^{-1}$  (Tabela 6.4). Também é possível observar que o CR reduziu com o aumento da concentração do AE, mesmo assim o comprimento da plântula (CP) e CR foram maiores quando comparado com o tratamento controle, com adição apenas da água deionizada. Nos tratamentos acima de  $10 \text{ g L}^{-1}$  não houve germinação das sementes, indicando efeito tóxico, como também é possível observar na Figura 6.5B.

Assim como o etanol, não há trabalhos publicados até o momento da realização dessa pesquisa que avaliaram o efeito fitotóxico do acetato de etila. A maioria das publicações disponíveis avalia o efeito alelopático na germinação de sementes, de extratos vegetais obtidos

com uso de solventes orgânicos, como por exemplo o acetato de etila, hexano e etanol (AVELAR AMADO et al., 2020; MEDEIROS et al., 2020; ZHAO et al., 2022).

### **6.3.3. Determinação da concentração efetiva a 50% (CE<sub>50</sub>)**

A toxicidade dos solventes presente na biomassa desengordurada foi avaliada por meio da concentração efetiva a 50% (CE<sub>50</sub>), que equivale a concentração do solvente responsável por inibir ou levar a morte de 50% dos organismos (arqueas metanogênicas, *S. obliquus* e alface). A CE<sub>50</sub> foi obtida por meio do modelo de Hill, que apresentou um bom ajuste aos dados de produção de metano, taxa de crescimento e índice de germinação de sementes, com coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) acima de 90%.

A mistura HE foi avaliada, porém, nos testes de digestão anaeróbia, cultivo de microalgas e germinação de sementes a toxicidade do hexano não apresentou efeito significativo. Assim, apenas o etanol foi considerado, e apresentou CE<sub>50</sub> de 3,78, 26,97 e 4,97 g L<sup>-1</sup> para arqueas metanogênicas, *S. obliquus* e alface, respectivamente (Figura 6.6A, Figura 6.6C e Figura 6.6E). Enquanto o acetato de etila apresentou uma CE<sub>50</sub> de 18,74, 18,02 e 5,85 g L<sup>-1</sup> para arqueas metanogênicas, *S. obliquus* e alface, respectivamente (Figura 6.6B, Figura 6.6D e Figura 6.6F). Ao contrário do etanol, a menor toxicidade do AE ocorreu na digestão anaeróbia, e em baixas concentrações foi responsável pelo aumento da produção de metano, conforme é possível observar na curva de dose-resposta (Figura 6.6B).

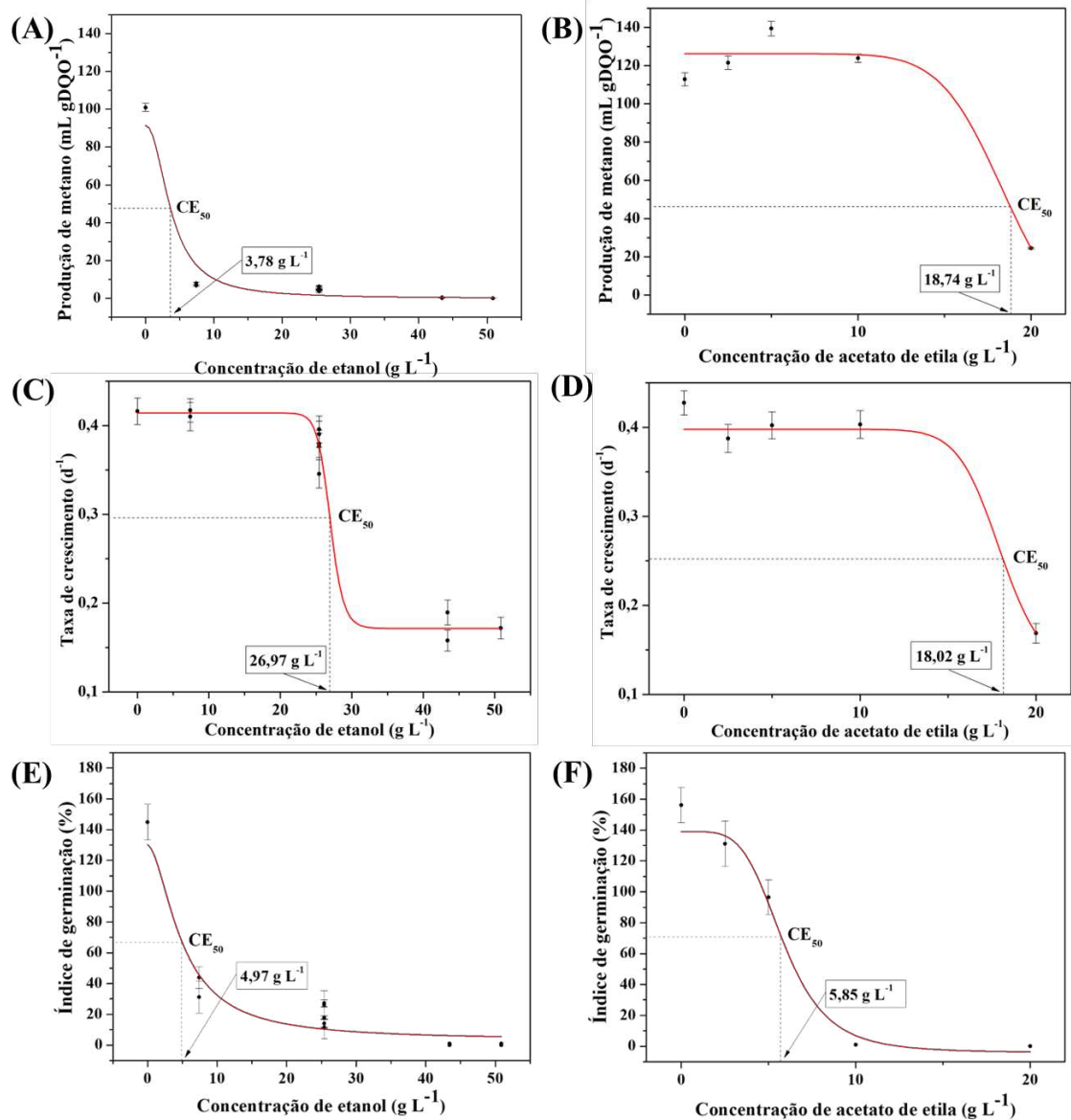


Figura 6.6: Curva de concentração-resposta dos solventes etanol e acetato de etila na (A e B) digestão anaeróbia, (C e D) cultivo de *Scenedesmus obliquus* BR003 e (E e F) germinação de sementes de alfafa

De forma conjunta, os efeitos de toxicidade dos solventes nos três sistemas biológicos avaliados podem ser analisados no *heatmap* (Figura 6) em que os efeitos positivos são destacados nos maiores valores (vermelho) ao passo que os efeitos negativos são apontados nos menores valores (azul).

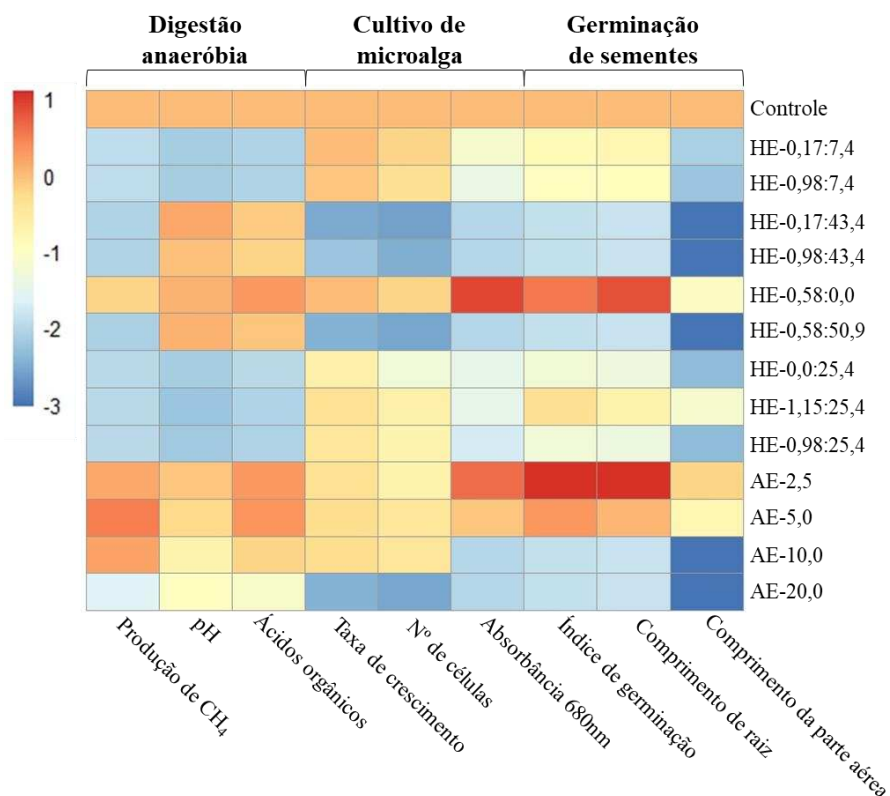


Figura 6.7: *Heatmap* de similaridade entre os parâmetros avaliados nos três sistemas biológicos e as concentrações dos solventes. Os dados foram normalizados pelo escore Z

O etanol apresentou maior toxicidade para os microrganismos anaeróbios, seguido das sementes de alface. Nos cultivos de microalgas a toxicidade do etanol é menor e depende da espécie (OKUMURA, J. KOYAMA, H. TAKAKU, H. S, 2001). Jiang et al. (2017) verificaram uma  $CE_{50}$  de  $18 \text{ g L}^{-1}$  de etanol em *Chamydomonas reinhardtii*. Neste trabalho foi observado que a linhagem *S. obliquus* BR003 é mais resistente aos efeitos tóxicos do etanol, quando comparado com outras linhagens de microalgas (JIANG et al., 2017; OKUMURA, J. KOYAMA, H. TAKAKU, H. S, 2001).

A maior toxicidade do AE foi observada em germinação de sementes de alface em concentrações acima de  $5,0 \text{ g L}^{-1}$ , seguida do cultivo de *S. obliquus*. De fato, o AE apresentou menor toxicidade para os microrganismos anaeróbios e germinação de sementes, quando comparado com o etanol. Diante destes resultados, o acetato de etila é um solvente ambientalmente adequado para uso industrial, por se tratar de um solvente verde com baixa toxicidade. Além disso, a concentração de acetato de etila presente na biomassa residual é baixa devido à menor solubilidade em água quando comparado com o etanol, que é miscível, e todo o álcool utilizado na extração estará presente na biomassa residual.

## 6.4. CONCLUSÕES

Este trabalho investigou o rendimento e a qualidade dos lipídios extraídos com diferentes solventes orgânicos, além da toxicidade para a digestão anaeróbia, cultivo de microalgas, e germinação de semente. A mistura de solventes hexano e etanol, na proporção 1:2, apresentou rendimento idênticos ao método de Bligh-Dyer, ao passo que o acetato de etila resultou em menor rendimento de extração, com predominância de lipídios neutros. O acetato de etila é menos tóxico para os microrganismos anaeróbios e germinação de sementes, enquanto o etanol apresentou uma toxicidade menor para as células de *S. obliquus*.

Diante destes resultados, o acetato de etila é um solvente ambientalmente adequado para uso industrial e com grande potencial de uso na extração de lipídios de microalgas. Além disso, a concentração de acetato de etila presente na biomassa residual após a extração é baixa devido à menor solubilidade em água quando comparado com o etanol, que é miscível, e todo o álcool utilizado na extração estará presente na biomassa residual. Por se tratar de um solvente verde com baixa toxicidade, seu emprego permite a recuperação e recursos como energia na forma de metano, como de água e nutrientes para cultivos de microalgas, e como biofertilizante para o cultivo de plantas vasculares.

## 6.5. REFERÊNCIAS

- ALFONSI, K. et al. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. **Green Chem.**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 2008.
- ALVAREZ, A. L. et al. Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. **Algal Research**, v. 54, p. 102200, abr. 2021.
- ALZATE, M. E. et al. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 488–494, nov. 2012.
- ANDERSEN, R. **Algal culturing techniques**. China: Elsevier, 2005.
- ANGLES, E. et al. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening. **Algal Research**, v. 21, p. 27–34, 1 jan. 2017.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23th. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
- ARABIAN, D. Optimization of cell wall disruption and lipid extraction methods by combining different solvents from wet *Chlorella vulgaris*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 99, n. 7, p. 569–583, 1 jul. 2022.

- AVELAR AMADO, P. et al. Assessment of allelopathic, cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Smilax brasiliensis* Sprengel leaves. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 192, p. 110310, 1 abr. 2020.
- BOHUTSKYI, P. et al. Production of lipid-containing algal-bacterial polyculture in wastewater and biomethanation of lipid extracted residues: Enhancing methane yield through hydrothermal pretreatment and relieving solvent toxicity through co-digestion. **Science of The Total Environment**, v. 653, p. 1377–1394, fev. 2019.
- BRADOW, J. M.; CONNICK, W. J. SEED-GERMINATION INHIBITION BY VOLATILE ALCOHOLS AND OTHER COMPOUNDS ASSOCIATED WITH *Amaranthus palmeri* RESIDUES 1. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 7, 1988.
- BRASIL. **Regras para Análise de Sementes — Ministério da Agricultura e Pecuária**. , 2009. Disponível em: <[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946\\_regras\\_analise\\_\\_sementes.pdf/view](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf/view)>. Acesso em: 27 jan. 2023
- DE JESUS, S. S. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents. **Renewable Energy**, v. 143, p. 130–141, 1 dez. 2019.
- DIONISI, D. et al. Calculation of the potential production of methane and chemicals using anaerobic digestion. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, n. 5, p. 788–801, set. 2018.
- DU, Y.; SCHUUR, B.; BRILMAN, D. W. F. Maximizing Lipid Yield in *Neochloris oleoabundans* Algae Extraction by Stressing and Using Multiple Extraction Stages with N-Ethylbutylamine as Switchable Solvent. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 28, p. 8073–8080, 19 jul. 2017.
- DUPRAZ, V. et al. Demonstrating the need for chemical exposure characterisation in a microplate test system: toxicity screening of sixteen pesticides on two marine microalgae. **Chemosphere**, v. 221, p. 278–291, abr. 2019.
- EPA. **Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test**. , 2012. Disponível em: <<https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0154-0025>>
- ESCORSIM, A. M. et al. Extraction of *Acutodesmus obliquus* lipids using a mixture of ethanol and hexane as solvent. **Biomass and Bioenergy**, v. 108, p. 470–478, jan. 2018.
- FALCONÍ, J. H. H. et al. Strain screening and ozone pretreatment for algae farming in wastewaters from sugarcane ethanol biorefinery. **Journal of Cleaner Production**, v. 282, p. 124522, fev. 2021.
- FERREIRA, A. et al. *Scenedesmus obliquus* microalga-based biorefinery – from brewery effluent to bioactive compounds, biofuels and biofertilizers – aiming at a circular bioeconomy. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 5, p. 1169–1186, 2 set. 2019.
- GERBER, M. D. et al. Phytotoxicity of effluents from swine slaughterhouses using lettuce and cucumber seeds as bioindicators. **Science of The Total Environment**, v. 592, p. 86–

90, ago. 2017.

GOMIS, V. et al. Isobaric vapor–liquid and vapor–liquid–liquid equilibrium data for the water–ethanol–hexane system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 259, n. 1, p. 66–70, out. 2007.

GÜNERKEN, E. et al. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 2, p. 243–260, 1 mar. 2015.

HENRY, M. P. et al. Use of Anaerobic Hybrid Reactors for Treatment of Synthetic Pharmaceutical Wastewaters Containing Organic Solvents. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, v. 66, p. 251–264, 1996.

HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11, p. 2515–2522, 14 dez. 2016.

HUFFER, S. et al. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6400–6408, set. 2011.

INGRAM, L. O. N.; BUTTKE, T. M. Effects of Alcohols on Micro-Organisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 25, n. C, p. 253–300, 1 jan. 1985.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Cheese and processed cheese products: determination of fat content - gravimetric method - reference method. p. 7, 1987.

JIANG, Y. et al. Metabolic responses to ethanol and butanol in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 17 out. 2017.

KATIYAR, R. et al. Utilization of de-oiled algal biomass for enhancing vehicular quality biodiesel production from *Chlorella* sp. in mixotrophic cultivation systems. **Renewable Energy**, v. 122, p. 80–88, jul. 2018.

KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1834–1846, dez. 2015.

LEE, S. M. et al. Phytotoxic mechanisms of bur cucumber seed extracts on lettuce with special reference to analysis of chloroplast proteins, phytohormones, and nutritional elements. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 230–237, 1 dez. 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

MA, X. et al. Effect of ethanol pre-fermentation on organic load rate and stability of semi-continuous anaerobic digestion of food waste. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122587, 1 mar. 2020.

MARKOU, G. et al. Methane production through anaerobic digestion of residual microalgal biomass after the extraction of valuable compounds. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 31 mar. 2020.

MARTINI, F. et al. The potential use of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana*

- as biostimulants on maize plants. **Algal Research**, v. 60, p. 102515, dez. 2021.
- MASUKO, T. et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69–72, 1 abr. 2005.
- MEDEIROS, J. E. S. et al. Phytochemical screening and the evaluation of allelopathic activity of extract and fractions of solanum lycocarpum A. St. Hil. (solanaceae) leaves. In: **Solanum: An Overview**. [s.l.] Nova Science Publishers, Inc., 2020. p. 181–198.
- MOHSENI, A.; FAN, L.; RODDICK, F. A. Impact of microalgae species and solution salinity on algal treatment of wastewater reverse osmosis concentrate. **Chemosphere**, v. 285, p. 131487, 1 dez. 2021.
- MOLINO, A. et al. Microalgae Characterization for Consolidated and New Application in Human Food, Animal Feed and Nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 2436, 1 nov. 2018.
- OKUMURA, J. KOYAMA, H. TAKAKU, H. S, Y. Influence of Organic Solvents on the Growth of Marine Microalgae. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, n. 2, p. 123–128, 6 set. 2001.
- PAN, X. et al. Deep insights into the network of acetate metabolism in anaerobic digestion: focusing on syntrophic acetate oxidation and homoacetogenesis. **Water Research**, v. 190, p. 116774, 15 fev. 2021.
- PEREIRA, S. et al. Treatment of synthetic milk industry wastewater using batch dissolved air flotation. **Journal of Cleaner Production**, 2018.
- PRÉAT, N. et al. Identification of microalgae biorefinery scenarios and development of mass and energy balance flowsheets. **Algal Research**, v. 45, n. November 2019, p. 101737, 2020.
- RAMLUCKAN, K.; MOODLEY, K. G.; BUX, F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**, v. 116, p. 103–108, 2014.
- RIPLEY, A. L. E. et al. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **JSTOR**, v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.
- ROCHA, D. N. et al. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121644, out. 2019.
- ROKICKA, M. et al. Effects of Ultrasonic and Microwave Pretreatment on Lipid Extraction of Microalgae and Methane Production from the Residual Extracted Biomass. **Bioenergy Research**, p. 1–9, 12 out. 2020.
- SAINI, R. K. et al. Advances in Lipid Extraction Methods—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13643, 20 dez. 2021.
- SÁNCHEZ-BAYO, A. et al. Biodiesel and biogas production from *Isochrysis galbana* using dry and wet lipid extraction: A biorefinery approach. **Renewable Energy**, v. 146, p.

188–195, 1 fev. 2020.

- SILVA, M. E. T. DA et al. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 103711, fev. 2020.
- VIEGAS, C.; GOUVEIA, L.; GONÇALVES, M. Evaluation of microalgae as bioremediation agent for poultry effluent and biostimulant for germination. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, p. 102048, nov. 2021.
- WU, C. et al. Effect of ethanol pre-fermentation and inoculum-to-substrate ratio on methane yield from food waste and distillers' grains. **Applied Energy**, v. 155, p. 846–853, 1 out. 2015.
- WU, J. et al. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 71, p. 323–329, 2017.
- YANTI, H. et al. Effect of ester compounds on biogas production: beneficial or detrimental? **Energy Science & Engineering**, v. 2, n. 1, p. 22–30, 1 mar. 2014.
- YU, M. et al. Ethanol prefermentation of food waste in sequencing batch methane fermentation for improved buffering capacity and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 187–193, 1 jan. 2018.
- YUN, Y.-M. et al. Inhibition of residual n-hexane in anaerobic digestion of lipid-extracted microalgal wastes and microbial community shift. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7138–7145, 13 abr. 2016.
- ZARRINMEHR, M. J. et al. The effect of solvents polarity and extraction conditions on the microalgal lipids yield, fatty acids profile, and biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126303, 1 jan. 2022.
- ZHAO, Y. et al. The inhibitory effects of *Ulva prolifera* extracts on early growth of *Spartina alterniflora* and the underlying mechanisms. **Journal of Environmental Management**, v. 319, p. 115639, 1 out. 2022.
- ZHENG, G. et al. An integrated microfluidic device in marine microalgae culture for toxicity screening application. **Marine Pollution Bulletin**, v. 72, n. 1, p. 231–243, 15 jul. 2013.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

Para superar os desafios da produção de biocombustíveis de microalgas em escala industrial, o processo *downstream* deve ser otimizado para reduzir o custo de produção, consumo de energia e aumentar a eficiência dos processos. Outra estratégia que deve ser adotada é a extração das proteínas, para agregar valor à cadeia de produção de biocombustíveis, além de contribuir com a redução no consumo de energia. Além disso, a digestão anaeróbia da biomassa residual, permite a recuperação de nutrientes, água e carbono, e geração de energia a ser utilizada na biorrefinaria.

Nas condições otimizadas da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular de *Scenedesmus obliquus* BR003, foi possível obter um menor consumo de energia, quando comparado com o rompimento por ultrassom, para extração de lipídios, proteínas e pigmentos. O rendimento de extração de proteínas e pigmentos podem ser aumentados com o uso da biomassa com pH alcalino, durante o rompimento celular. Assim, o uso da cavitação hidrodinâmica para rompimento celular das microalgas pode contribuir com o aumento da eficiência de extração e melhoria da eficiência energética do processamento das microalgas para uso energético e alimentar.

De acordo com as rotas de extração estudadas, a que apresentou a maior recuperação de energia foi a extração de lipídios seguida da digestão anaeróbia da biomassa residual, com razão de energia líquida positiva. Já as rotas que consideraram a extração de proteínas resultaram em menores eficiências energéticas. A microalga *Scenedesmus obliquus* possui elevados teores de proteínas adequados a formulação de rações e alimentos, e o maior valor deste composto pode compensar a baixa eficiência energética desse processo.

O acetato de etila é um solvente ambientalmente adequado e com grande potencial de uso na extração de lipídios de microalgas. Esse solvente é menos tóxico para os microrganismos anaeróbios e germinação de sementes, enquanto o etanol apresentou uma toxicidade menor para as células de *S. obliquus*. Por se tratar de um solvente verde com baixa toxicidade, o emprego do acetato de etila para extração dos lipídios permite o uso da biomassa residual para recuperação de recursos e energia.