

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS JOSÉ DALMAS NETO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA
OLEAGINOSA EM CULTURA SUBMERSA DE *Rhodosporidium toruloides* EM MEIO
DE CULTIVO DE BAIXO CUSTO: PRODUÇÃO DE BODIESEL E TESTES EM
MOTORES DO TIPO DIESEL.

CURITIBA

2019

CARLOS JOSÉ DALMAS NETO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA
OLEAGINOSA EM CULTURA SUBMERSA DE *Rhodosporidium toruloides* EM MEIO
DE CULTIVO DE BAIXO CUSTO: PRODUÇÃO DE BIODIESEL E TESTES EM
MOTORES DO TIPO DIESEL.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e biotecnologia, Setor de tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos R. Soccol

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo B. Sydney

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

D148d

Dalmas Neto, Carlos José

Desenvolvimento de processo para produção de biomassa oleaginosa em cultura submersa de *rhodosporidiumtoruloides* em meio de cultivo de baixo custo: produção de biodiesel e testes em motores do tipo diesel. [recurso eletrônico] / Carlos José Dalmas Neto. – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol. Coorientador: Eduardo B. Sydney

1. Biocombustíveis. 2. Biomassa. 3. Gases do efeito estufa. 4. Cana-de-açúcar. I. Universidade Federal do Paraná. II. Soccol, Carlos Ricardo. III. Sydney, Eduardo B. IV. Título.

CDD: 662.88

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CARLOS JOSÉ DALMAS NETO** intitulada: **Desenvolvimento de processo para produção de biomassa oleaginosa em cultura submersa de *Rhodosporidium toruloides* em meio de cultivo de baixo custo: produção do biodiesel e testes em motores do tipo diesel**, sob orientação do Prof. Dr. **CARLOS RICARDO SOCCOL**, que após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Agosto de 2019.

CARLOS RICARDO SOCCOL
Presidente da Banca Examinadora

LUÍZ GUSTAVO LACERDA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

JULIO CESAR DE CARVALHO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ADESSE LORENZI WOICIECHOWSKI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MARIA GIOVANA BINDER PAGINONCELLI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

DEDICATÓRIA

Dedico a tese aos meus pais, Nelson Luiz Dalmas (*in memoriam*) e Dinair Pires Dalmas, que me proporcionaram condições de desenvolvê-la, e a meu filho, Zaion Bedene Dalmas, que me inspirou a fazê-la com orgulho e afinco.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Carlos R. Soccol, pelo incentivo incessante.

A todos os demais professores do Departamento de Engenharia de Bioprocessos & Biotecnologia, pelo apoio sempre que necessário. Aos técnicos e amigos envolvidos nesta etapa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pesquisa.

Aos srs. Norival Bonamichi e Jardel Massari pelo financiamento ao projeto.

RESUMO

A produção de biocombustíveis a partir de fontes renováveis é uma demanda crescente mundial. Dentre os principais problemas causados pelo uso crescente dos combustíveis fósseis estão os problemas climáticos, com o chamado efeito estufa, que é tido vinculado à concentração e gás carbônico (CO₂) na atmosfera. Em 2018 esta concentração bateu o recorde, com quase 412ppm. Os biocombustíveis emitem menos gás carbônico em função de serem produzidos à partir de matérias primas renováveis. O presente trabalho produziu e relatou dados de anos de pesquisa para a produção de biodiesel a partir desta tecnologia. O processo desenvolvido resultou na produção de 42g/L (base seca) de biomassa com teor de lipídeos de até 50,9%, conferindo uma produtividade de 0,45g/L.h. Sua transformação em biodiesel por hidroesterificação apresentou rendimento mássico de 92%. O produto foi avaliado em motor diesel frente a biocombustíveis existentes no mercado, em laboratório creditado pela ANP (Agência Nacional do Petróleo), resultando em reduções de: 24% no consumo de combustível, 50% em emissões de CO₂, 80% nas emissões de CO e utilização de até 20% menos oxigênio. Além disso, emissões de NO_x foram 45% menores, e a redução na emissão de hidrocarbonetos chegou a 85%. O biodiesel produzido por esta tecnologia representa expressivos ganhos na área ambiental decorrentes das menores emissões, ganhos na metodologia de extração, e de produtividade por espaço de terra cultivável.

Palavras-chave: biodiesel, cana de açúcar, emissões de gases de efeito estufa.

ABSTRACT

The production of biofuels from renewable sources is a growing worldwide demand. Among the main problems caused by the increasing use of fossil fuels are climate problems, with the so-called greenhouse effect, which is linked to the concentration and carbon dioxide (CO₂) in the atmosphere. In 2018 this concentration broke the record with almost 412ppm. Biofuels emit less carbon dioxide because they are produced from renewable raw materials. The present work produced and reported data from years of research for biodiesel production from this technology. The developed technology The developed process resulted in the production of 42g/L (dry base) of up to 50.9% lipid content, yielding a productivity of 0.45g/L*h. Its transformation into biodiesel by hydroesterification presented 92% mass yield. The product was evaluated in a diesel engine against biofuels on the market, in a laboratory accredited by ANP (National Petroleum Agency), resulting in reductions of: 24% in fuel consumption, 50% in CO₂ emissions, 80% in CO and utilization up to 20% less oxygen. In addition, NOx emissions were 45% lower and the reduction in hydrocarbon emissions reached 85%. The biodiesel produced by this technology represents significant gains in the environmental area due to lower emissions, gains in extraction methodology, and productivity per arable land space.

Key-words: biodiesel, sugarcane, greenhouse gas emissions.

SUMÁRIO

1.0 - INTRODUÇÃO	7
1.1 - CANA DE AÇÚCAR	9
1.2 - BIODIESEL	11
1.3 - <i>Rhodosporidium toruloides</i>	12
2.0 - MATERIAS E MÉTODOS	13
2.1 - ADAPTAÇÃO DA CEPA ÀS CONDIÇÕES DE SCALE-UP	13
2.2 - CONDIÇÕES DE CULTIVO	13
2.3 - SEPARAÇÃO CELULAR	18
2.4 - ROMPIMENTO CELULAR	19
2.5 - SEPARAÇÃO DO CALDO HIDROLISADO	20
2.6 - EXTRAÇÃO DO ÓLEO	20
2.7 - SEPARAÇÃO DA MICELA	22
2.8 - COMPOSTOS FENÓLICOS	23
3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1 - RESULTADOS DAS FERMENTAÇÕES	24
3.2 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES	26
3.3 - RESULTADOS DA CONVERSÃO EM BIODIESEL	30
3.4 - RESULTADOS DOS TESTES EM MOTORES	32
4.0 - CONCLUSÕES	43
5.0 - TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO:	45
6.0 - REFERÊNCIAS	52

1.0 - INTRODUÇÃO

Uma fonte de energia segura, justa, viável economicamente e sustentável é vital para prosperidade das formas de vida na Terra (1). O aumento do consumo de energia total e *per capita* registrado nos últimos anos é consequência da busca de conforto e comodidade, além do expressivo aumento da população mundial. Diante disso, há um significativo aumento do número de motores e máquinas em geral, além de suas respectivas potências (2). Neste cenário, caso não haja um aumento da eficiência desses, o consumo energético tende a aumentar de forma insustentável.

No Brasil, de 2009 a 2017, houve aumento de 20% no consumo final de energia (3). Para 2026 a projeção da necessidade energética do Brasil é de 309 Mtep, sendo dos quais 29,6% relacionados ao setor de transportes. Juntos, a indústria e o citado setor continuarão a ser os principais responsáveis por esse consumo, com cerca de 67% do total (4). No mundo, entre 30 a 35% da energia consumida é utilizada para o transporte de passageiros e mercadorias (5). Estes modais consomem basicamente combustíveis líquidos, como o diesel, querosene, gasolina, álcool e biodiesel. A queima destes combustíveis gera entre outros poluentes, o gás Carbônico (CO₂). Dentre os combustíveis citados, apenas os dois últimos são atualmente produzidos a partir de fontes consideradas renováveis.

A comunidade científica continua a discutir se o aquecimento global é causado pelo aumento excessivo de dióxido de carbono na atmosfera, mas essa ideia é geralmente aceita. Essa situação tem causado uma corrida ao desenvolvimento de tecnologias economicamente viáveis e sustentáveis, como forma de substituição aos combustíveis fósseis (6).

Nos últimos 150 anos, a concentração de CO₂ na atmosfera saltou de 280 para mais de 410 ppm (partes por milhão). Isso é um recorde, sendo que o maior valor registrado até agora foi em 2018, de quase 412ppm (7). Além de ter atingido o pico, em 2018, a concentração de CO₂ vem aumentando ano após ano.

Diante do exposto, o aumento da necessidade energética mundial, da enorme participação dos combustíveis fósseis (maior que 80%) na matriz energética mundial e da

taxa recorde de CO₂ na atmosfera, fica clara a necessidade de desenvolvimento de novos combustíveis renováveis, e, principalmente, a conscientização para a utilização dos mesmos.

Uma das fontes mais promissoras de energia renovável é o biodiesel proveniente da cana de açúcar através da fermentação. A busca em sites de patentes depositadas em todo o mundo, com as palavras combinadas “biodiesel” e “levedura” retornou quase 60 patentes depositadas.

O biodiesel produzido pelas leveduras é sustentável, mais eficiente que o biodiesel produzido por oleaginosas e de custo semelhante. O Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná foi pioneiro nesta tecnologia, detém várias patentes a respeito e continuamente vem pesquisando melhorias e aplicações do processo.

Este trabalho faz parte do “Biooil Project”, desenvolvido em uma parceria entre a empresa Ourofino Agronegócio e o Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. Esta parceria resultou em 20 empregos diretos, investimentos em equipamentos exclusivos para o laboratório no valor de aproximadamente US\$70.000 (setenta mil dólares), além da doação de outros equipamentos. A implementação do projeto resultou também em parceria com outras universidades e laboratórios de pesquisas e análises, como Laboratório Greentech, Universidade Positivo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a empresa brasileira USDA, entre outros. O foco do projeto foi o desenvolvimento de uma tecnologia capaz de produzir biodiesel a partir de matérias-primas de baixo custo, através de micro-organismos não-geneticamente modificados (OGM *free*). A fonte de carbono adotada foi o melaço proveniente da produção de cana-de-açúcar, ambos extremamente abundantes no Brasil. Nesses quase 10 anos de parceria, vários experimentos foram realizados, incluindo escolha e adequação de linhagens, otimização das condições de cultura e desenvolvimento e melhoria de processos. Formulação do meio, concentração de substratos, utilização ou não de antibióticos, duração da fermentação, fluxo de ar e / ou oxigênio dissolvido, métodos de separação de células, métodos de extração do óleo intracelular, purificação do óleo, conversão a biodiesel, purificação de biodiesel e até mesmo os testes de desempenho do biodiesel em motores foram realizados. O foco sempre foi obter o menor custo de produção

aliado às maiores eficiências. Além dos testes visando o tema biodiesel, outros fatores do óleo foram avaliados a fim de direcionar novas demandas ao produto.

Desta forma, o presente trabalho descreve a produção em escala piloto de óleo e de biodiesel, além de testes em motores diesel do biocombustível produzido através do cultivo de *Rhodospiridium toruloides* utilizando como substrato a base de caldo de cana

1.1 - CANA DE AÇÚCAR

A cana de açúcar (*Saccharum spp*) é uma das principais culturas do agronegócio brasileiro (8). De acordo com o Procana, o setor sucroalcooleiro foi responsável por aproximadamente 2% do PIB nacional em 2018 (9). O Brasil é hoje o principal produtor de cana-de-açúcar do mundo. Segundo a Companhia Nacional do Abastecimento, CONAB, a safra 2017/2018 atingiu a marca de 633 milhões de toneladas. Seus produtos são largamente utilizados na produção de açúcar, álcool combustível e, mais recentemente, biodiesel (10), além do bioplástico. Nos últimos anos a queima do bagaço de cana de açúcar tem sido utilizada na geração de energia elétrica. Outra parte do bagaço vem sendo hidrolisado para a produção de açúcares fermentescíveis para produção de álcool de segunda geração, um combustível obtido através da fermentação controlada e da destilação de resíduos vegetais, que podem aumentar a produção nacional de energia em até 30% para o mesmo espaço de cana plantado (11). Para cada tonelada de cana processada obtém-se perto de 280Kg de bagaço, a 50% de umidade (12).

A obtenção de bioprodutos derivados da cana só é possível através da extração do suco da cana, popularmente conhecido como caldo de cana, ou garapa, que contém açúcares fermentescíveis em aproximadamente 15% do seu peso (13)

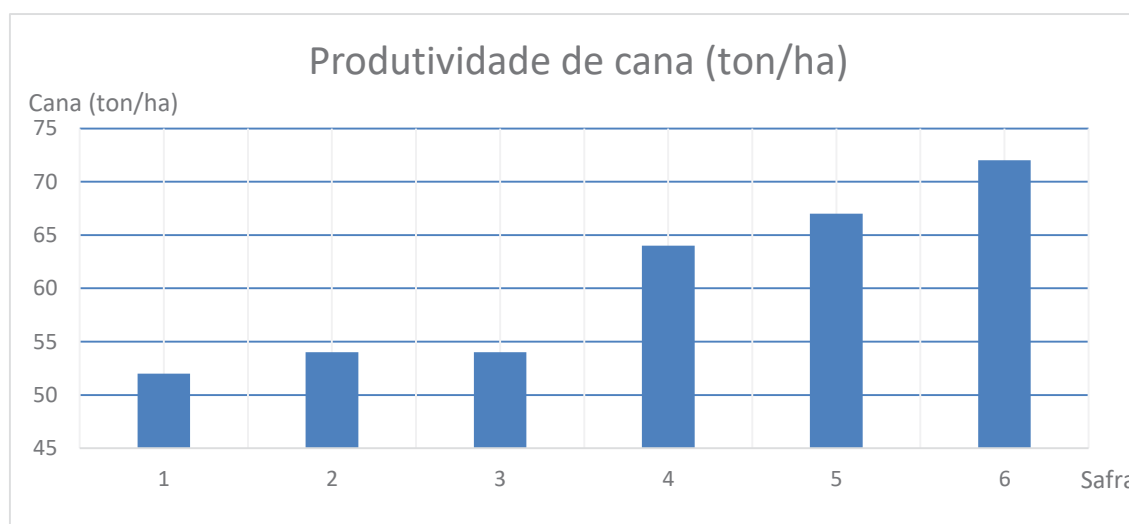
De acordo com a CONAB a produtividade média dos canaviais brasileiros foi de quase 74 t de cana/ha na safra 2015/2016 (14). Segundo a mesma entidade, o rendimento médio em açúcar dos canaviais brasileiros é de 144,4 kg/t de cana na safra 2016/2017 (15). Com estes valores é possível calcularmos a obtenção de açúcar fermentescível (ATR) por hectare nos canaviais brasileiros, cujo valor é de 10.685 kg por ha.

Ao longo dos últimos anos, a produtividade dos canaviais brasileiros tem aumentado de forma consistente, como consta na figura 01 (16). Importante lembrar que os dados apontados no gráfico se referem à safra registrada em um determinado ano, com intervalos regulares de 5 anos para evitar flutuações decorrentes de quebra de safra por fatores climáticos ou de pragas.

Há diversos programas de melhoramento genético da cana em andamento no Brasil, dentre os quais estão institutos de alta reputação, como Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Centro de Tecnologia Canaveira (CTC) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Cada equipe de pesquisa tem uma finalidade específica, como desenvolver uma variedade resistente à seca, aumentar o teor de sacarose na cana, mas o objetivo principal é aumentar a produtividade dos canaviais.

Novas técnicas e equipamentos de colheita vem sendo aprimorados, com o princípio de colher mais cana, e de maneira mais limpa, mas com o objetivo comum de aumento de produtividade de sacarose por ha de cana plantado.

FIGURA 01: PRODUTIVIDADE DE CANA POR SAFRA BRASILEIRA.



Tendo como base o que foi exposto, podemos supor com certa segurança, que dentro de alguns anos a atual produtividade (10.685kg por ha) possa sofrer incremento. A produção de biodiesel a partir da cana que será apresentada neste capítulo utiliza como matéria prima os açúcares contidos na cana. Assim os valores futuramente apresentados de produtividade, poderão também ter acréscimo.

1.2 - BIODIESEL

Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel é definido como um combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil (17). Quimicamente, pode ser definido como combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal (18).

O biodiesel veio para complementar a matriz energética brasileira, de forma a substituir parcialmente o diesel fóssil, ou derivado do petróleo. Segundo o MME (Ministério das Minas e Energia) a mistura de biodiesel ao diesel fóssil teve início em dezembro de 2004, em caráter autorizativo. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (B2), em todo o território nacional. Com o perceptível amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual foi ampliado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) sucessivamente até atingir 5% (B5) em janeiro de 2010, antecipando em três anos a meta estabelecida pela Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 (17). Após sucessivos e graduais aumentos, o Despacho nº 671, de 24/5/2018, publicado no DOU em 25/5/2018, o teor de biodiesel no diesel passou a ser de 10% (B10).

A produção do biodiesel pode ser feita de várias formas diferentes, alternando desde as matérias prima até o tipo de reação química para a obtenção do biocombustível. Cerca de 70% do biodiesel produzido no Brasil advém da soja e 20% do sebo bovino (19). Outras fontes alternativas de produção de biodiesel vem ganhando espaço nas pesquisas, principalmente as microalgas, no entanto, esta tecnologia ainda apresenta custo impeditivo.

Por se tratar de uma *commodity*, a soja está sujeita a variações de preços significativas em seus subprodutos. Além disso, a soja possui grande procura no mercado de alimentos e desta forma, o debate alimentos versus combustíveis encoraja o desenvolvimento de fontes não alimentícias para geração do biocombustível. Não obstante,

a produção de biodiesel por hectare de soja dificilmente ultrapassa os 400L/há (20). Neste mesmo talhão de terra, o biodiesel produzido por leveduras cultivadas em melaço de cana pode produzir mais de 3000L (o autor).

O biodiesel produzido a partir de leveduras, que neste caso se desenvolvem a partir de produtos da cana-de-açúcar, é também chamada "*Single Cell Oil*" (SCO), onde lipídeos produzidos em células são extraídos e se necessário purificados. É importante notar que a SCO visava a produção de determinados ácidos graxos de valor nutricional, especialmente para produtos para crianças e bebês (21). Estes estudos começaram no início de 1959 com o que foi chamado de Processo Torula, onde células inteiras foram usadas como ração animal (22). Ultimamente novas aplicações estão sendo desenvolvidas, entre as quais a produção de ácidos graxos, surfactantes e principalmente biodiesel. Quase cem microrganismos já foram reconhecidos como produtores de grandes quantidades de óleo (23). Alguns exemplos incluem *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces Starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Yarrowia lipolytica* e *Schizochytrium spp.* Mais recentemente, microrganismos geneticamente modificados foram desenvolvidos para estes fins (24) por empresas como Solazyme, LS9 e Amyrys, porém os produtos e subprodutos esbarram em uma série de restrições de segurança e custos impeditivos, quando em 2018 a DSM pagou cerca de US\$ 27,5 milhões à transferência da propriedade intelectual à Amirys (25).

1.3 - *Rhodosporidium toruloides*

O micro-organismo utilizado nessa tese foi uma cepa de *Rhodosporidium toruloides* obtida do banco de cepas do Departamento de Engenharia Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, codificada como DEBB5533. Este micro-organismo já foi encontrada no solo da Alemanha, atmosfera e solo do Japão, tripas de botos nas Bahamas e polpa de madeira de coníferas na Suécia.

É um fungo do tipo basidiomiceto, não-patogênico de cor avermelhada. Essa levedura oleaginosa que pode acumular até 70% do seu peso seco na forma de lipídeos, principalmente sob baixas concentrações de Nitrogênio (C/N baixa) durante parte do cultivo. Atualmente está sendo explorada como alternativa para a produção de biocombustíveis e

produtos químicos avançados. Pode ser facilmente cultivada a temperaturas próxima a 37 °C (26).

2.0 - MATERIAS E MÉTODOS

2.1 - ADAPTAÇÃO DA CEPA ÀS CONDIÇÕES DE SCALE-UP

Para que uma cepa possa ser utilizada desde condições pré-laboratoriais até condições plenamente industriais é fundamental que a mesma possa ser resistente à diversos tipos de *stress* a que a mesma possa ser submetida, como grandes variações de concentração de sais, substratos, pH, temperatura, graus de extermínio de micro-organismos, entre outras.

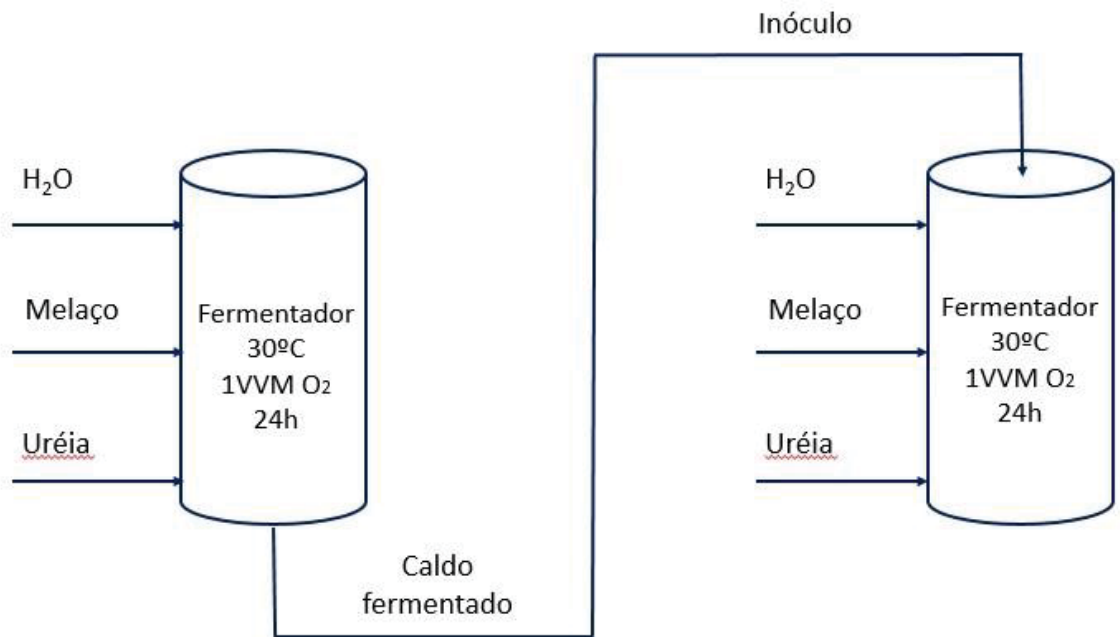
A cepa utilizada neste projeto (DEBB5533) precisou sofrer adaptações, quando submetida à tratamento ácido para a seleção das células mais resistentes. Após o término das fermentações em escala de bancada, 150mL, o caldo fermentado foi centrifugado a 1.200g durante 10 min para a recuperação da biomassa.

A biomassa foi suspensa em solução ácida com pH 4,0 após a adição de ácido sulfúrico, e permaneceu por 2h. Após este período parte das células foi semeada na superfície de placas de Petri com meio YPD (1% Extrato de levedura, 2% Dextrose (D-glicose), 2%Peptona, 2% agar) previamente esterilizado. As placas foram tampadas e colocadas em estufa a 32 C durante 48h. As colônias que cresceram foram então inoculadas em 20mL do meio de cultivo utilizado nos reatores, à base de melaço de cana e uréia. Os cultivos celulares que apresentaram a maior velocidade de crescimento foram novamente centrifugados a 1.200g por 10 min e então misturadas com soro de leite em pó, na concentração (m/m) de 90% de células, e então liofilizadas a 200mbar e -45 C por 48h. À partir deste liofilizado as células foram novamente congeladas em solução de glicerol 50% e mantidas em freezer a -80°C. Este tratamento permitiu que a cepa adquirisse alta resistência frente a contaminações.

2.2 - CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os meios de cultivo de baixo custo para produção de biomassa oleaginosa da levedura *Rhodosporidium toruloides* foram realizados conforme Soccol et al 2017 (21) e estão descritos a seguir. A figura 02 representa esquematicamente os escalonamentos.

FIGURA 02: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ESCALONAMENTOS



Água deionizada: 15mL

Melaço de cana: 0,8g

Ureia: 53mg

Esta proporção de melaço/água deionizada é variável uma vez que é calculada tomando-se como base a concentração de açúcares do melaço, que não é constante, e varia de acordo com o tipo da cana, e o canavial colhido. O valor dos açúcares totais solúveis no meio de cultivo deve ficar em torno de 40 g/L.

Após a formulação do meio, o pH é regulado para 5,0 com a adição de Ácido Clorídrico 2N e/ou Hidróxido de Sódio 2N. O frasco é então parcialmente fechado, com o auxílio de um material poroso e permeável ao ar, é finalmente enviado ao setor de esterilização. Esta esterilização deve ser bastante criteriosa. Para tanto é pré calculada uma taxa de extinção de 99,99% dos contaminantes contidos no melão. De forma a obter esta taxa, a temperatura e o tempo do processo são ajustados. Para se adequar a possíveis normas sanitárias e/ou ambientais não é utilizado nenhum tipo de antibiótico.

Depois de esterilizado, o meio de cultivo é enviado à uma câmara de ar onde o *vial* está acondicionado. Após verificar que a temperatura do meio de cultivo aproxime-se dos 35 C, o frasco contendo o *vial* e o frasco erlenmeyer contendo o meio de cultivo são levados até a câmara de fluxo laminar, previamente higienizada com agente sanitizante e luz ultravioleta (UV) por 15 min. A chama do fluxo é acesa e então o frasco contendo o meio de cultivo é aberto, numa distância máxima de 15cm da chama. Em operação paralela, o frasco contendo o *vial* é aberto e vertido todo o seu conteúdo dentro o meio de cultivo. Esta operação é denominada de inoculação, e este cultivo de aproximadamente 15mL é agora denominado de pré-inóculo.

O pré-inóculo é rapidamente fechado e inserido a um agitador orbital, sob 32 C a 180 rpm. Este meio é mantido nestas condições por aproximadamente 24h. Após este período é retirada uma pequena amostra para visualização em microscopia aumentada 1000x, sem contagem. Se não houver contaminação este cultivo será escalonado. Os teores de substratos finais não são avaliados.

Para o aumento do volume de fermentação, é preparado um frasco erlenmeyer de volume total 500mL com os seguintes componentes:

Água deionizada: 150mL

Melão de cana: 8,0g

Ureia: 530mg

Faz-se a mesma ressalva na proporção melão/água deionizada que no preparo do pré-inóculo. O meio de cultivo deste erlenmeyer tem seu pH também ajustado para 5,0 e é então autoclavado a 121 °C por 15 min, de acordo com as necessidades previstas. O meio de

cultivo é resfriado para 32 °C em câmara de ar e então é inoculado com o pré-inóculo, sob as mesmas condições de assepsia anteriormente utilizadas. Tem-se então o inóculo, o qual possui uma viabilidade de aproximadamente 24h, mantido a 32 C e 180RPM, caso após este período a análise microscópica não aponte contaminação. O próximo escalonamento deverá ser feito para um meio de cultivo de 1,5L.

Este e os demais cultivos pelos volumes envolvidos foram realizados em fermentadores, os quais fornecem monitoramento e controle dos parâmetros ajustados, além de condições de assepsia.

Para a fermentação de 1,5L foi utilizado um reator com volume total de 5L. Foram adicionados 1,5L de água, 80g de melão além de 5,3g de Ureia. O reator é preenchido com o meio de cultivo e enviado para esterilização a 120 °C por 15 min.

Após esterilizado, o reator é montado, com todos os sensores previamente calibrados e resfriado através do borbulhamento de ar comprimido previamente esterilizado por filtro de 0,22µm (micrômetros) com uma vazão de 5vvm (volume de ar por volume de meio) até a temperatura de 30°C. Paralelamente ao resfriamento é feita a calibração da sonda de Oxigênio.

Ao atingir a temperatura de 30°C, controlada através de camisa de circulação de água com resistência elétrica, a vazão de ar é momentaneamente interrompida, o pH é novamente ajustado para 5,0±0,2 e é acionada a agitação do reator, na velocidade de 200RPM (rotações por minuto). Através de um tubo amostrador localizado na tampa, o cultivo de 150mL (que fora denominado inóculo) é transferido para o interior do reator com o auxílio de ar comprimido. Ao término da transferência o ar é novamente insuflado na vazão de 1vvm. Eventualmente pode ocorrer a formação de espuma no reator, e caso a mesma não seja contida, pode ocasionar o vazamento do cultivo através da saída de ar. Para que isto não ocorra este reator tem um sensor de nível, que quando atinge o nível pré-determinado aciona uma bomba peristáltica que injeta uma substância tensoativa. Após 24h de fermentação, este cultivo de 1,5L será inoculado ao reator de 15L caso não haja contaminação, verificada através de microscopia. Ao final do cultivo são verificadas as concentrações finais de açúcares redutores (27), Nitrogênio, concentração celular e concentração de óleo (ambos pelo método gravimétrico)

O reator de 10L é um reator também em vidro borossilicato, porém com volume total de 20L, e é controlado pelo mesmo equipamento que monitora o reator de 1,5L porém com outros sensores. Este reator é também é dotado de camisa para resfriamento e resistência elétrica. Ao vaso do reator são adicionados cerca de 8,0L de água deionizada 400g de melaço e 25g de Ureia. O reator é então montado e esterilizado *in loco*, através da resistência elétrica localizada na camisa do mesmo. A temperatura é regulada para 98°C e assim mantida por 4h, enquanto a agitação é acionada a 50RPM. Após este tempo, a temperatura é diminuída para 30°C através da circulação de água na camisa. Paralelamente também é feita a calibração da sonda de Oxigênio, com ar comprimido filtrado a 0,22µm borbulhado pelo meio de cultivo na vazão de 5vvm. Após a calibração da sonda a aeração é diminuída para 1vvm, e o cultivo com duração de 24h do reator de 1,5L é transferido a este reator por bombas peristálticas, através de mangueiras de silicone esterilizadas. A agitação é elevada para 200RPM e o pH é novamente ajustado para 5,0±0,2. Como no reator anterior, a demanda de Oxigênio é utilizada apenas para estimar o nível de metabolismo celular. O nível do reator é mantido pela adição, quando necessária, de solução de óleo de silicone em água a 10%. Após 24h de fermentação é realizada a visualização do cultivo por microscopia. Na ausência de contaminação o cultivo será escalonado. Ao final do cultivo são verificadas as concentrações finais de açúcares redutores, Nitrogênio, e concentração celular.

O escalonamento desta fermentação foi realizado em fermentador em aço inox 316 com acabamento polido, de volume total 500L. Este reator também é dotado de central de comando para pH, temperatura, oxigênio e nível de cultivo. Para tanto, foram adicionados ao reator 80L de água proveniente da rede de tratamento, 4kg de melaço e 250g de Ureia. Após formulado o meio, o reator é fechado e aquecido a 98°C por 4h através das resistências elétricas contidas na camisa. A agitação é acionada a 50RPM. Após este tempo o reator é resfriado a 30°C através da circulação de água na camisa e do aumento da agitação para 200RPM, com o borbulhamento de ar a 1,0vvm filtrado em filtro de 0,22µm para dentro do reator. Neste momento também é feita a calibração da sonda de Oxigênio. Após o reator resfriado, o pH é corrigido para 5,0 e o sensor de nível é ativado. O cultivo anterior de 15L é então bombeado para este reator, cuja fermentação tem duração prevista de 24h, para então ser enviado ao reator de 1500L. Ao final do cultivo são verificadas as

concentrações finais de açúcares redutores, Nitrogênio, concentração celular e concentração de óleo.

O reator utilizado para o próximo escalonamento é um vaso em aço inox 316 com acabamento polido, volume total de 1500L, munido de todos os controles citados anteriormente. Para o preparo deste reator, foram adicionados 800L de água, 40kg de melaço além de 2,5kg de Ureia. Para a esterilização o mesmo é fechado, a agitação é acionada a 50RPM e a temperatura regulada para 98°C durante 4h, através das resistências elétricas localizadas na camisa. Decorrido este prazo é iniciada a aeração do meio à uma vazão de 3vvm e a agitação é elevada para 200RPM para a calibração da sonda de Oxigênio. Em operação paralela, a temperatura do reator é diminuída até os 30°C através da passagem de água pela camisa. Ao atingir a temperatura desejada o pH é corrigido para 5,0±0,2 e o cultivo de 150L é bombeado para este reator. A duração prevista para esta fermentação é de 48h, sendo que a demanda de Oxigênio tem importância fundamental neste processo fermentativo. De acordo com o estágio do cultivo (fase lag, exponencial, manutenção, etc) a taxa de consumo de Oxigênio varia. Como a temperatura, a vazão de ar e a agitação são mantidas constantes, a variação do consumo de O₂, reflete-se diretamente na concentração deste dissolvido, indicada pelo sensor presente. Através de uma equação de reta foi estabelecida uma relação entre a concentração de açúcares e a concentração de Oxigênio no meio. Assim, automaticamente, quando a concentração de Oxigênio ultrapassa o valor determinado, é feita a adição de mais fonte de Carbono através do bombeamento de aproximadamente 40kg de melaço de cana *in natura*, ou seja, não esterilizado. Não há necessidade de esterilização do *feed*, uma vez que a concentração celular presente no reator inibe por completo possíveis contaminantes presentes no melaço.

Para o término da fermentação foi determinado como tempo ótimo o momento quando a concentração de açúcares fica abaixo de 0,5%, ou 5 gramas por litro. Ao final de 24h após o *feed*, normalmente a fermentação é encerrada.

Todas as operações aqui descritas, assim como condições adotadas foram repetidas inúmeras vezes de modo a se obter precisão e confiabilidade dos critérios adotados.

2.3 - SEPARAÇÃO CELULAR

Foi exaustivamente estudada, com a aplicação das operações unitárias de decantação e floculação, com ou sem aditivos, filtração em diversos tipos de filtro, com inúmeras malhas diferentes, com ou sem auxílio de adjuvantes, além da centrifugação, sob diversas temperaturas, tempos e rotações. Foi observado que apenas a decantação é suficiente para a separação celular com eficiência de 99%.

Após o término da fermentação, quando confirmada pela análise no teor de açúcares no caldo inferior a 5%, o reator tem a aeração interrompida, a agitação desligada e a temperatura do reator reduzida para 15°C. A decantação então é iniciada, e pela diferença de densidade entre as células e o caldo, estas começam naturalmente a decantar-se no fundo do fermentador. Após 4h é medido o volume decantado, e quando este valor atinge o parâmetro pré-estabelecido, que é de 33% da altura total de meio, a decantação é encerrada e o caldo concentrado (a fração inferior do fermentador, onde estão as células) é bombeada ao reator de rompimento celular. Caso a decantação não tenha concentrado o caldo de maneira suficiente pode-se diminuir ainda mais a temperatura ou aumentar o tempo da operação. Em mais de 90% das fermentações piloto realizadas a decantação é encerrada após 4h. Com isto a concentração celular aumenta cerca de 3vezes, chegando ao valor de 120g/L de biomassa úmida.

2.4 - ROMPIMENTO CELULAR

Para que a extração do óleo acumulado no interior das células seja eficiente é fundamental que a membrana celular seja aberta, possibilitando o transbordo dos lipídeos acumulados através de vacúolos. A extração sem o rompimento celular é possível através da utilização de solventes, porém de toxicidade bastante elevada, difícil separação e posterior recuperação, além de invariavelmente fornecer um produto com baixo grau de pureza, necessitando de várias etapas de purificação.

Inúmeros métodos de rompimento celular foram testados, levando-se em conta a eficiência e o custo do processo. O rompimento de melhor custo/eficiência foi a via química, com o auxílio de ácidos minerais. O caldo concentrado contendo a biomassa é enviado ao reator de lise celular, construído em aço inox AISI 304 com acabamento polido, dotado de camisa para aquecimento, e/ou resfriamento, e tem sua temperatura elevada para 90°C, sob

agitação de 25RPM. Ao atingir esta temperatura é adicionado Ácido Clorídrico 33%, até que o pH seja reduzido para 2,0. O reator é dotado de um condensador no topo, para evitar a perda de ácido por evaporação.

Assim que se visualizar através da análise microscópica que maior parte das células estão rompidas o processo de hidrólise é encerrado. Geralmente para se atingir este patamar 3,5 a 4h são suficientes. O caldo resultante é destinado à unidade de separação celular, onde a massa proteicolipídica é recuperada para posterior extração do óleo contido nesta. Esta massa consiste em uma matriz de macromoléculas formadas pelos vacúolos que armazenam o óleo (fração lipídica), e uma série de proteínas, entre elas diversas proteínas de ligação (fração proteica) que conferem a esta massa uma consistência homogênea e estável.

2.5 - SEPARAÇÃO DO CALDO HIDROLISADO

A centrífuga utilizada é do tipo tubular e é toda construída em aço inox. O tubo interno tem volume de 8L e pode girar a uma velocidade de até 12.000 RPM. A vazão do caldo hidrolisado é determinada através de cálculos que demonstrem um tempo de residência ligeiramente superior ao que fora avaliado em centrífuga de bancada.

À medida que o caldo vai sendo separado, pela saída superior da centrífuga é obtido o sobrenadante. A fase aquosa consiste de um caldo com pH baixo e teor de açúcares perto de 10g/L, devido ao açúcar residual da fermentação, além da hidrólise de alguns compostos formados durante a lise celular. Este caldo contém elevados teores de HMF (hidroximetilfurfural).

Dentro do tubulão vai sendo retida a massa proteico lipídica. Com as condições acima descritas, a massa proteicolipídica é recuperada com teor de umidade de 70% (m/m).

2.6 - EXTRAÇÃO DO ÓLEO

As condições ótimas de extração foram determinadas através de uma série de experimentos envolvendo ao menos 5 variáveis distintas, dentre elas: o método de extração,

o grau de rompimento celular, o teor de umidade presente na massa proteicolipídica, tempo e temperatura de extração. Uma série de resultados interessantes poderiam ser extrapolados às condições piloto, porém dentre os melhores resultados foi feita uma segunda avaliação com base na toxicidade do solvente utilizado e o custo total da operação. A qualidade do óleo extraído também foi outro fator analisado, e este sim o qual define a metodologia a ser utilizada.

A extração do óleo foi realizada em três etapas, todas sob praticamente as mesmas condições, com exceção do tempo de operação. Logo após a recuperação da massa, esta é enviada ao mesmo reator utilizado na produção celular, devidamente sanitizado. A pasta é inserida no reator a uma temperatura próxima de 35°C. Na sequência é adicionado Clorofórmio na relação de 3 partes de solvente para 1 parte de massa úmida. A temperatura é regulada para 50°C e a agitação é acionada a 50RPM para mistura dos componentes, sem a formação de vórtices, o que aceleraria a evaporação do solvente, condição indesejada neste momento. Amostras de 2mL da mistura são retiradas a cada 3 minutos e centrifugadas a 7.200g durante 1 minuto, separando a fase leve (massa extraída) e a fase pesada (micela do solvente e do óleo extraído). A micela é recuperada e posta em um tubo com a massa conhecida. Este tubo é aquecido em forno micro-ondas por 30 segundos. A massa do tubo contendo o óleo é anotada. A determinação do final da extração é dada quando 3 amostras seguidas apresentarem variação de peso do tubo mais o óleo inferior a 2%. Normalmente após 15 minutos variações inferiores a esta são obtidas.

A micela obtida pela saída superior da centrífuga chamada de sobrenadante é uma solução aquosa com impurezas. A fase líquida mais pesada, eluída pela segunda saída da centrífuga contém a micela, mistura de solvente e óleo é enviada para a destilação. A massa coletada dentro da centrífuga ainda contém quantidade apreciável de óleo e é novamente enviada ao reator de lise, misturada com Clorofórmio 1/1 (m/m) sob as mesmas condições de temperatura e agitação. Amostras de 2mL são retiradas a cada 3 minutos para determinação da concentração de óleo. Nesta segunda extração, normalmente o equilíbrio é obtido após 5min de mistura. A mistura é novamente centrifugada, sob as mesmas condições, obtendo-se assim 3 fases, de características semelhantes às obtidas anteriormente. Na terceira extração as condições adotadas de concentração de solvente, temperatura e agitação do reator são as mesmas das duas extrações anteriores. Assim como

nas fases anteriores, quando 3 amostras consecutivas indicam a mesma concentração de óleo, a extração é finalizada. A massa obtida é centrifugada pela última vez.

A tabela 01 apresenta um balanço de massa das etapas de extração, considerando como base de cálculo 1000g de massa proteicolipídica.

TABELA 01 – BALANÇO DE MASSA REPRESENTATIVO DAS EXTRAÇÕES

	Entrada (g)		Saída (g)		
	Biomassa	Solvente	Fase superior	Fase média	Fase inferior
1º Extração	1000	3000	770	200	3030 (óleo 90)
2º Extração	200	400	20	145	435 (óleo 45)
3º Extração	145	145	15	130	155 (óleo 15)

2.7 - SEPARAÇÃO DA MICELA

O destilador é constituído em aço inox 304 com controle de temperatura independente para *reboiler*, condensador e vaso recuperador. A micela é adicionada ao reboiler que tem sua temperatura regulada para 65 C, a bomba de circulação de micela é acionada a uma vazão de 2 L/min. O reboiler tem construção cônica, e a sucção da bomba é feita pelo fundo do *reboiler*. O recalque da bomba é enviado à parte mais alta da parede do reboiler, ocasionando rápida evaporação do solvente através do sistema pelicular, onde a película de micela desce pela parede do reboiler e gradativamente vai tendo o solvente evaporado. O solvente volatilizado ascende naturalmente, pela diferença de densidade com o ar até o condensador, onde é condensado. O líquido formado desce por força gravitacional até o vaso recuperador, de onde pode ser utilizado em outras extrações. À medida em que o solvente contido na micela presente no boiler vai sendo evaporado, a concentração de óleo na micela vai aumentando, assim a taxa de evaporação de solvente decresce. Para evitar este decréscimo a pressão no extrator é reduzida para 260mmHg.

A concentração de óleo na micela é determinada de maneira semelhante às operações de extração. Uma amostra de 2mL do reboiler é retirada a cada 5 minutos, e é adicionada a um tubo de massa conhecida e enviada ao micro-ondas por 30 segundos.

Igualmente, quando 3 amostras consecutivas indicam a mesma proporção de óleo na micela a recuperação do solvente é encerrada. Via de regra em 30 minutos de operação a recuperação de solvente é encerrada. O solvente, conforme já foi relatado, é armazenado para ser utilizado em extrações posteriores. O óleo é reservado e uma amostra vai para o setor de análises, para que as condições de conversão a biodiesel sejam determinadas.

As análises foram realizadas da seguinte maneira:

Índice de acidez: INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v1: Métodos Químicos Físicos para Análise de Alimentos. SP: I MESP, 3. ed., 1985. p. 279.– Ca 5a 40.

Índice de Iodo: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1995 [A.O.C.S. Recommended Practice Cd 1 – 25] .

Índice de peróxidos: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. Champaign, USA, AOCS, 1990. [AOCS Official method Cd 8-53].

Índice de saponificação: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. Champaign, USA. A.O.C.S., 1990. [A.O.C.S. Official method Cd 3-25].

A umidade foi calculada através de Karl Fischer.

2.8 - COMPOSTOS FENÓLICOS

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu usando ácido gálico como padrão de referência (27). A absorvância foi lida a 760 nm. A curva padrão foi feita com soluções de 100, 80, 60, 40, 20, 10 µg/mL de ácido gálico e determinada por regressão linear ($R^2 = 0,9963$) e resultou na equação 01:

$$\text{Compostos Fenólicos Totais} = (10,473 \times \text{Abs}) - 0,0727 \quad \text{Equação 01}$$

Os compostos fenólicos totais foram expressos como μg de equivalente de ácido gálico por g de peso seco.

A concentração de antioxidantes contidos nos extratos obtidos por extração úmida foi quantificada de acordo com (28). Resumidamente, os extratos foram diluídos em álcool metílico concentrado nas seguintes concentrações: 5, 4, 2, 1,25, 0,75, 0,25, 0,125, 0,0625 mg/mL. Em ambiente de luz controlada, 0,1mL de cada diluição foi misturado com 3,9mL da solução DPPH e homogeneizado. Foi preparada uma solução de controle substituindo os extratos por álcool metílico e foi feita a calibração do espectrofotômetro. As absorbâncias foram lidas a 515 nm. Uma curva padrão foi preparada usando diferentes concentrações do radical DPPH. A capacidade de eliminação da concentração de radical DPPH foi calculada a partir da curva de calibração determinada por regressão linear. A porcentagem de captação do radical DPPH foi calculada em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%) (Equação 2).

$$AA (\%) = [(Ab_{S_{\text{controle}}} - Ab_{S_{\text{extrato}}}) / Ab_{S_{\text{controle}}}] \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

A capacidade de eliminar o radical DPPH foi calculada a partir de uma equação de inibição específica da seção linear da curva criada a partir de diferentes diluições de cada extrato. O IC_{50} que denota a quantidade (μg) de óleo necessário para reduzir a concentração inicial de radicais DPPH em 50%, foi então calculado.

A determinação do perfil de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa após a preparação dos ésteres metílicos. As análises foram realizadas em um cromatógrafo HP5890 série II, equipado com um detector de ionização em chama (FID) e uma coluna AT-Wax (20 m X 0,25 mm X 0,25 m). A temperatura do forno permaneceu a 100°C por 1 minuto, em seguida foi elevada até 220°C por 6 minutos, permanecendo nesta temperatura por 20 minutos (taxa de aquecimento = 20°C/min). Os componentes graxos foram identificados pela comparação com os tempos de retenção dos ésteres metílicos padrões e a quantificação foi feita pela normalização das áreas.

3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - RESULTADOS DAS FERMENTAÇÕES

O processo de *scale-up* foi realizado levando em conta fermentações conduzidas apenas em fermentadores, uma vez que cultivos em frascos do tipo Shaker apresentam limitações na transferência de oxigênio. Os reatores além de oferecerem a possibilidade de ar comprimido, ou até mesmo oxigênio concentrado quando operam em altas agitações, as hélices chocam-se com as bolhas do gás, quebrando-as e aumentando a área superficial para transferência de massa. Os reatores ainda possibilitam uma agitação muitas vezes superior a de um shaker, graças as hélices internas.

TABELA 02 – PARAMETROS DAS FERMENTAÇÕES

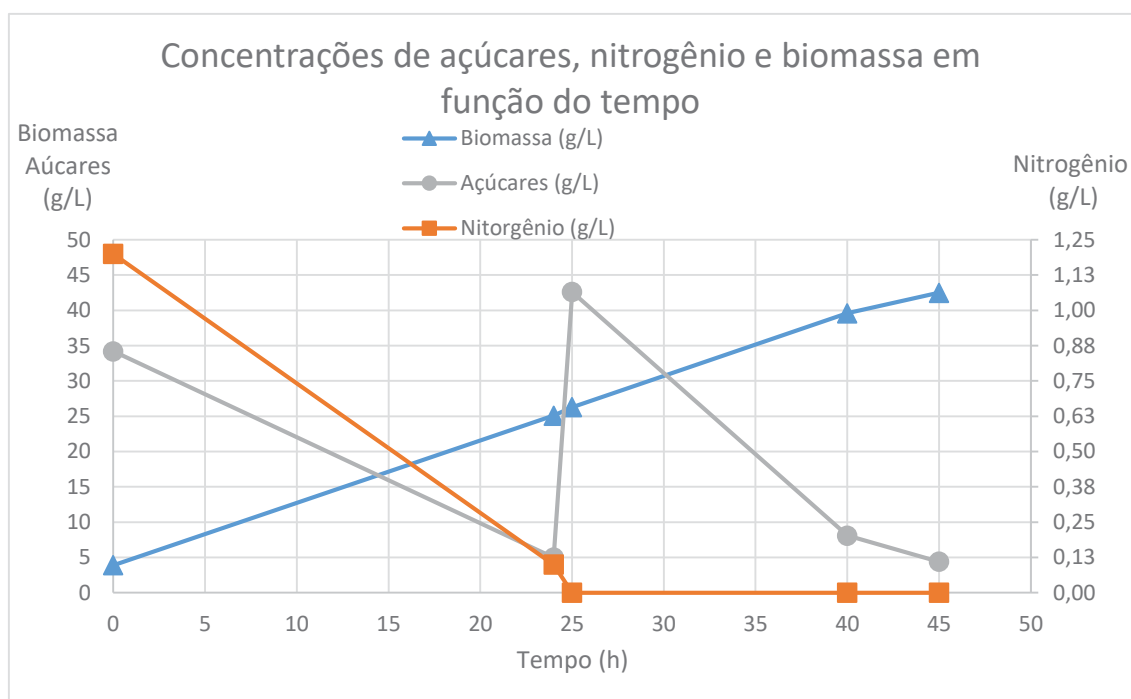
Volume de fermentação (L)	1,5	15	150	1500
Tempo de fermentação (h)	24	24	24	48
Biomassa final (g/L)	27,4	28,1	24,5	42,5
Concentração de açúcares iniciais (g/L)	50,7	42,1	40,8	34,2
Concentração de açúcares finais (g/L)	4,9	2,4	3,2	4,4
Consumo de substrato (g)	68,7	397	3.760	67.400
Concentração de lipídeos (g/L)	9,8	9,5	10,1	21,6
Produtividade de lipídeos (g/L*h)	0,40	0,39	0,42	0,45
Fator conversão substrato em biomassa	0,54	0,64	0,58	0,59

Verifica-se que a geração de biomassa e concentração lipídicas são muito próximas durante processo de escalonamento entre volumes 1,5L, 15L, 150L e 1500L, conforme demonstrado na tabela 02, evidenciando que as condições do meio, como as físico químicas (material, geometria, formato das pás, etc) do reator não interferiram no processo fermentativo. A tabela 02 deixa claro que a concentração de lipídeos no reator de 1500L foi maior que as anteriores. Este valor é justificado levando-se em conta que este cultivo teve um pulso a mais de açúcares, quando o Nitrogênio estava praticamente zerado, assim, o micro-organismo utilizou este substrato para o armazenamento de óleo nos seus vacúolos.

Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com outros autores, como Zhou et al 2012 (29), que obtiveram um fator de conversão de substrato em biomassa de 0,36 e Bonturi et al 2015 (30) que conseguiram 0,22 (ambos utilizando meios de cultivo à base de glicose) os valores aqui alçados (entre 0,54 e 0,64) demonstram que o tratamento ao qual a

cepa foi submetida, proporcionou às células manterem-se vigorosas independente do reator utilizado. Também evidenciou as corretas relações de C/N, aeração, temperatura e pH adotadas. Isto foi fundamental para a alta produtividade relatada neste trabalho. Os autores citados obtiveram respectivamente valores de 0,25 e 0,09 para o fator de conversão de substrato em produto. Nos dados expostos neste trabalho conseguimos 0,30 e utilizando um método de extração comprovadamente menos agressivo.

FIGURA 03: EVOLUÇÃO DOS PARAMETROS CINÉTICOS NO REATOR DE 1500L



3.2 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES

Para a extração do óleo foram realizados experimentos comparando o método convencional de extração, baseado na metodologia de Soxhlet, utilizando biomassa seca e Hexano, através de processo de extração-líquido-líquido (ELL), utilizando Clorofórmio como agente de extração dos lipídios. Ambas as metodologias estão descritas em Dalmas Neto et al 2019 (31). Diversas análises foram realizadas para averiguação da qualidade do óleo extraído e ficam bem claras algumas diferenças, que podem influenciar nas aplicações dos óleos obtidos

A tabela 03 fornece valores da porcentagem óleo extraídos pela metodologia convencional utilizando hexano (extração Soxhlet) e a extração líquido-líquido (extração

clorofórmio), e sua relação com a pureza do óleo obtido. O método de extração líquido-líquido do óleo utilizando clorofórmio fornece um rendimento total cerca de 5% superior ao utilizando metodologia clássica de Soxhlet utilizando Hexano como solvente.

TABELA 03 – TEORES DE ÓLEO E PUREZA DOS EXTRATOS

Solvente	Extração Soxhlet			Extração líquido-líquido		
	% de óleo	Pureza óleo (%)	Rendimento em óleo (%)	% de óleo	Pureza óleo (%)	Rendimento em óleo (%)
Hexano	46,1 ± 0,6	94,3	43,4	4,83 ± 0,3	N.A.	N.A.
Clorofórmio	43,2 ± 0,4	N.A.	N.A.	50,9 ± 1,2	91,8	46,7

Para melhor visualização do óleo obtido, na tabela 04 consta a qualificação completa dos extratos, com teores de lipídeos, proteínas, carboidratos, cinzas e umidade. Isso fornece uma clara ideia da pureza dos extratos. Na tabela 05 estão reportados valores obtidos para ambos os óleos em termos do Índice de acidez, peróxidos e saponificação, parâmetros relevantes quando se trata da produção de biodiesel.

TABELA 04: CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS EXTRAÍDOS EM AMBOS OS MÉTODOS

Extração	Lipídeos % (Soxhlet)	Proteínas % (Kjeldahl)	Carboidratos % (DNS)	Cinzas % (Cinza seca)	Umidade % (Karl Fischer)
Soxhlet Hexano	94.3	1.3	3.2	0.8	0.4
ELL Clorofórmio	91.8	2.0	1.4	2.6	4.1

TABELA 05 – ÍNDICE DE ACIDEZ, PERÓXIDO E SAPONIFICAÇÃO DOS ÓLEOS OBTIDOS POR AMBOS OS MÉTODOS

Extração	Índice de Acidez	Índice de Peroxido	Índice de Saponificação
----------	------------------	--------------------	-------------------------

	(%)	(meq/kg)	(mgKOH/g)
Soxhlet Hexano	1.36	2.97	199.70
ELL Clorofórmio	1.17	0.54	199.40

Os valores do índice de acidez e do índice de saponificação para ambos os métodos de extração foram muito próximos, indicando que nas condições adotadas os métodos de extração não influenciaram a acidez do óleo obtido. O índice de acidez reflete a porcentagem de ácidos graxos livres (AGL) presentes no extrato oleoso. São parâmetros importantes para avaliação de óleos destinados à alimentação, uma vez que AGL estão relacionados a sabores e odores desagradáveis.

O índice de saponificação representa a quantidade de base necessária para esterificar 1g do extrato, e está diretamente ligada à pureza desse mesmo. Ambos os valores estão bastante próximos, como era de se esperar visto que a pureza dos mesmos é bastante alta.

Porém o Índice de peróxido elevado para a extração Soxhlet com Hexano evidencia a alta formação de peróxidos para esta metodologia. Os peróxidos são formados quando o óleo é submetido a altas temperaturas por longos períodos, ou sua prolongada oxigenação. São compostos não desejáveis nos óleos uma vez que se caracterizam por produzirem odores e sabores ranços. Durante a secagem da biomassa e durante a própria extração por Soxhlet o óleo é submetido a condições degradantes, o que não é verificado na ELL. A extração por Soxhlet necessita que a biomassa seja seca, sob condições de 80°C, e a própria extração é realizada a aproximadamente 60°C durante horas. Na ELL não há a necessidade de secagem, e a extração é muito mais rápida, sob temperaturas menores, isso implica também em custos menores.

Estas características indesejáveis nos óleos podem ser minimizadas devido à presença natural de compostos antioxidantes. Muitos óleos são ricos em antioxidantes, como tocoferóis e outros compostos fenólicos. O óleo obtido da levedura *Rhodospiridium toruloides* é rico em α e β carotenos que possuem elevado poder antioxidante.

Observamos que no método de extração dos óleos microbianos utilizando técnica por Soxhlet ocorre uma destruição de compostos fenólicos, o que acarretou em maiores teores de peróxidos, e menores quantidades de compostos fenólicos no extrato final, aumentando o IC₅₀. Ao trocarmos o Hexano pelo Clorofórmio, capaz de solubilizar maiores quantidades de compostos fenólicos o IC₅₀ teve redução de 70% em relação à extração convencional conforme dados apresentados na tabela 06.

TABELA 06 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E IC₅₀ PARA DOS EXTRATOS

Extração	Compostos fenólicos totais (µg _{GAE} /g)	IC ₅₀ (mg/mL)
Soxhlet Hexano	1,543	3,538
ELL Hexano	5,761	2,510
ELL Clorofórmio	7,518	2,082

Apesar de apresentarem propriedades físico-químicas distintas, os óleos extraídos apresentam a mesma composição em termos de ácidos graxos, conforme demonstra a tabela 07. Apesar de diferenças pontuais, como por exemplo o teor de ácido oleico (C18:2) que variou de 5,7 para 7,6% (entre eles uma variação de 33%), o balanço geral de compostos saturados e insaturados foi praticamente igual. O índice de Iodo, muito parecido para os dois extratos reforça a semelhança entre ambos. Esta semelhança era esperada, uma vez que a composição dos ácidos graxos é definida durante o crescimento celular, e os métodos de extração tem influência limitada sobre a composição. A composição semelhante indica que mesmo para diferentes utilizações, ambos os extratos tenham comportamentos semelhantes frente às condições de reações químicas e armazenamento, o que interfere diretamente na vida de prateleira do óleo.

Em função das melhores características e menores custos, as avaliações de conversão em biodiesel e demais testes foram realizados com o óleo extraído por EEL com Clorofórmio.

TABELA 07 – COMPOSIÇÃO DOS ACIDOS GRAXOS E ÍNDICE DE IODO DOS ÓLEOS EXTRAIDOS PELOS MÉTODOS SOXHLET E EXTRAÇÃO LIQUÍDO-LIQUÍDO.

Ácido graxos (%m/m)	Soxhlet Hexano	ELL Clorofórmio
C14:0	1,00	1,05
C16:0	21,50	20,89
C16:1	0,70	1,24
C17:0	0,00	0,32
C17:1	0,00	0,26
C18:0	4,60	5,12
C18:1	62,10	61,93
C18:2	7,60	5,71
C18:3	0,70	0,42
C20:0	0,10	0,46
C20:1	0,40	0,77
C22:0	0,30	0,35
C22:1	0,10	0,33
C24:0	0,70	1,12
Total	99,80	99,97
Saturados (%)	28,20	29,30
Insaturados (%)	71,60	70,66
Índice de Iodo (cg/g)	72,3	71,3

3.3 - RESULTADOS DA CONVERSÃO EM BIODIESEL

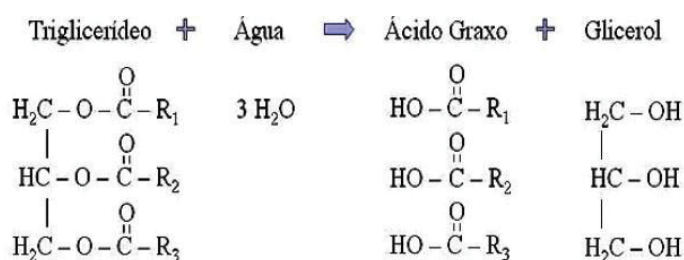
A conversão em biodiesel e a purificação foram realizadas conforme a metodologia descrita em Soccol et al 2017 (21), para a escala de bancada e determinação de parâmetros para *scale-up*. Esta metodologia foi adotada em razão das características específicas do óleo microbiano produzido, o qual apresentava baixas taxas de conversão frente às reações de transesterificação. Além da dificuldade de separação dos ésteres dos demais produtos.

A transformação do óleo microbiano em biodiesel envolve num primeiro estágio a conversão de todos os triglicerídeos em ácidos graxos livres, durante a esterificação ácida. Quando a reação alcança a conversão desejável, a transesterificação é iniciada (segunda etapa). A esterificação ácida foi realizada sob agitação e temperatura controlada. Metanol e ácido sulfúrico foram adicionados. Quando os níveis de ácido graxo livres são superiores a 98%, a reação é interrompida através da redução da temperatura. Após a interrupção da

esterificação, metanol e hidróxido de sódio foram adicionados ao à mistura, e a temperatura foi elevada para 70°C durante 15 minutos para conversão dos ácidos em ésteres.

Esta metodologia foi então escalonada através de uma tecnologia denominada Hidroesterificação. Ela foi patenteada pelo professor da UFRJ, Donato Aranda (número do pedido PI 0500417-9 B1) que consiste também em uma primeira conversão de toda a matéria oleosa a ácidos graxos e glicerol, mediante a hidrólise, sob temperaturas e pressões elevadas, conforme demonstra a figura 04 e por fim, a esterificação dos ácidos graxos em ésteres. O glicerol obtido via esta rota tem elevada pureza, e é facilmente separado dos ácidos graxos.

FIGURA 04– ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE

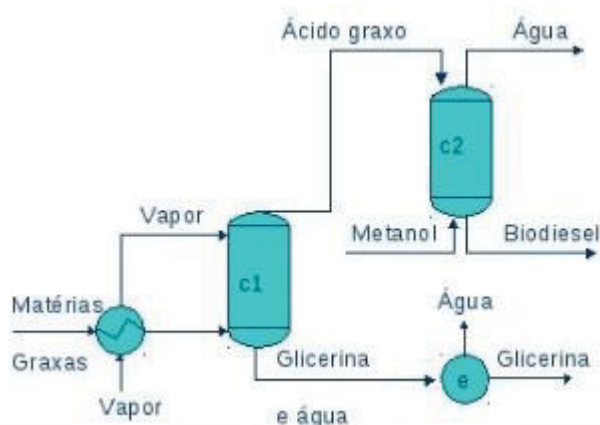


O processo de hidrólise em si consiste no aquecimento do material graxo a 250 C e mistura com água na razão de excesso de 50%, com utilização de ácido sulfúrico como catalisador, na concentração de 1% (massa catalisador/massa de óleo). Apesar de 80% do óleo vegetal ser convertido nos primeiros 20 minutos, a reação foi mantida até os 60min. Após o prazo estipulado a mistura é *flasheada* onde o excesso de água e ácido são retirados na forma de vapor, e após condensados retornam ao processo. A glicerina é coletada quase pura. A parte líquida (ácidos graxos), ainda a cerca de 200°C é submetida à alimentação de solução de hidróxido de sódio em metanol a 1% até uma concentração final de 10% em relação à massa de ácido graxo. Esta relação mássica corresponde a uma razão molar de álcool de aproximadamente 3:1. Nestas condições a reação de esterificação ocorre em cerca de 60min, e após isso a mistura é enviada à destilação, onde separa-se o metanol em excesso, os ésteres, a água gerada na esterificação e eventual matéria prima não convertida ou contaminantes.

Nas condições acima descritas o rendimento, massa de ácido graxo/massa de material oleoso na reação de esterificação foi de 92%. O rendimento mássico da reação de esterificação (massa de éster/massa de ácido graxo) foi de 100%.

Estas reações foram realizadas sob diversas condições experimentais em escala piloto na planta de hidroesterificação da USDA, em Ponta Grossa/PR, porém sendo divulgados apenas os resultados mais expressivos, devido à patente vigente. Simplificadamente o sistema de hidroesterificação é disposto na figura 05.

FIGURA 05 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DE OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES



Após a conversão do óleo em biodiesel, o mesmo foi enviado ao laboratório de máquinas térmicas da UFRJ. Antes do início dos testes, porém, foi realizado um laudo completo no biodiesel que abordava os 27 parâmetros exigidos-pela ANP. O resultado dessa análise está apresentado na tabela 08.

3.4 - RESULTADOS DOS TESTES EM MOTORES

Na época dos testes, a legislação brasileira determinava que o teor mínimo de biodiesel no diesel mineral fosse de 5% em volume. Desta maneira o biodiesel produzido por

Rhodosporidium toruloides foi diluído nas concentrações de 5%, conforme legislação em vigor e também a 20%, a fim de avaliar com mais intensidade as possíveis mudanças nos ensaios. Para melhor entendimento dos resultados obtidos, estes foram comparados com um biodiesel B5 obtido de uma planta oleaginosa, denominada como “B5 REF”. O mesmo foi feito com biodiesel com 20% de óleo renovável vegetal, denominado “B20 REF”.

Alguns equipamentos utilizados nos testes estão nas figuras 06 e 07, além das características do motor, dispostas na tabela 09.

FIGURA 06 – CONJUNTO MOTRIZ E ANALISADOR DE DADOS

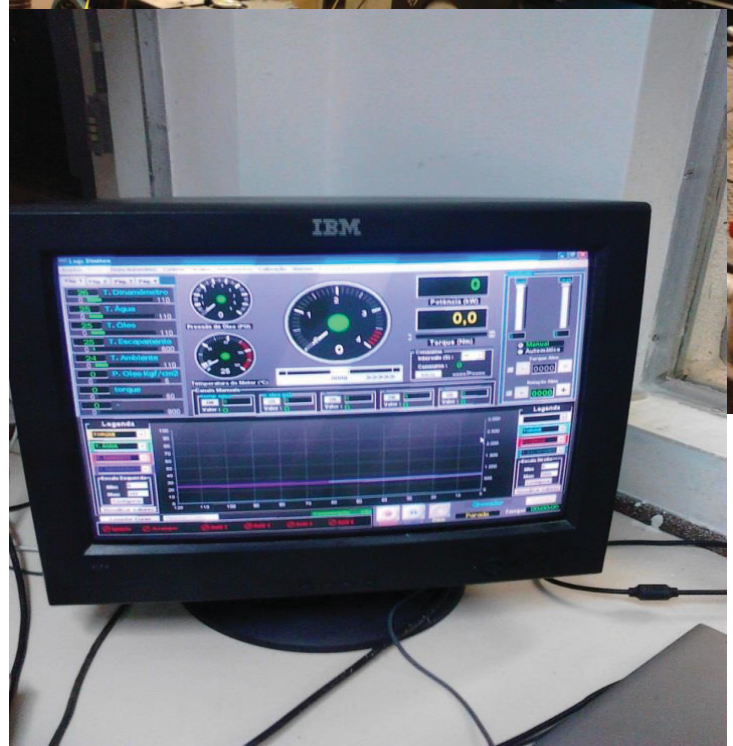
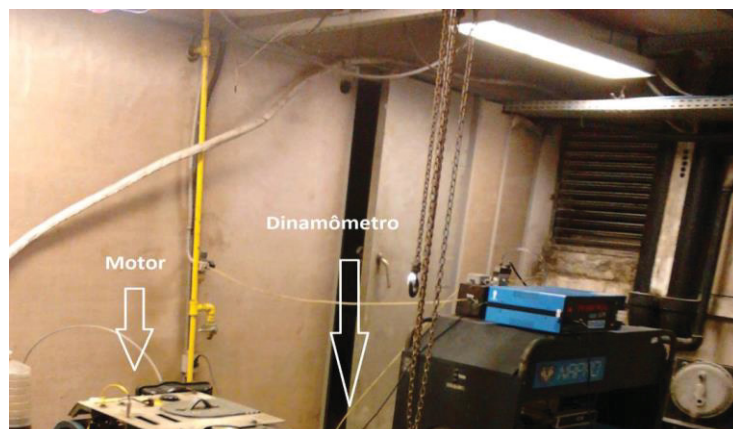


FIGURA 07 –

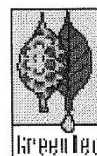
PROGRAMA DE

LEITURA DO DADOS AVALIADOS

TABELA 08 - LAUDO COMPLETO DO BIODIESEL



ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



CERTIFICADO DE QUALIDADE DE B-100

Empresa: OUROFINO

Amostra: HEDF 2012/01

CARACTERÍSTICAS	RESULTADO	MÉTODO	UNIDADE	Resolução N°7 - ANP	
				Mín.	Máx.
Aspecto	Claro a 25°C / Isento de impurezas	NBR 16048	-	LII	LII
Massa específica a 20° C	857,7	ASTM D4052	kg/m ³	850	900
Viscosidade Cinemática a 40°C	5,24	ASTM D445	mm ² /s	3	6
Teor de Água, máx.	350	EN 12937	mg/kg		380
Contaminação Total, máx.	22	EN 12662	mg/kg		24
Ponto de fulgor, mín.	172,0	ASTM D93	°C	100	
Teor de éster, mín.	96,6	EN 14103	% massa	96,5	
Resíduo de carbono, max.	0,019	ASTM D4530	% massa		0,050
Cinzas sulfatadas, máx.	<0,01	ASTM D374	% massa		0,02
Enxofre total, máx.	<0,01	NBR 15867	mg/kg		50
Sódio + Potássio, máx.	<0,01	NBR 15553	mg/kg		5
Cálcio + Magnésio, máx.	<0,01	NBR 15553	mg/kg		5
Fósforo, máx.	<0,01	NBR 15553	mg/kg		10
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	1	ASTM D130	-		1
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	6	ASTM D6371	°C		19
Índice de acidez, máx.	0,38	ASTM D664	mg KOH/g		0,5
Glicerol livre, máx.	0,02	ASTM D6584	% massa		0,02
Glicerol total, máx.	0,242	ASTM D6584	% massa		0,25
Monoacilglicerol	0,429	ASTM D6584	% massa		0,80
Diacilglicerol	0,129	ASTM D6584	% massa		0,20
Triacilglicerol	0	ASTM D6584	% massa		0,20
Metanol ou Etanol, max.	0,02	EN 14110	% massa		0,2
Índice de Iodo	61,7	EN 14111	g/100g	Anotar	Anotar
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.	6,3	EN 14112	h	6	

Rio de Janeiro, 24 de outubro de 2012

Prof. Donato A. G. Aranda

(AC Certisign RFB G3 ICP Brasil - a8 96 9f 4e 8c 23 c4 ee 23 64 19 65 d0 2c 25 10 95 4a 2f 3b)

Escola de Química/UFRJ

CRO 03314401, 3ª. Região

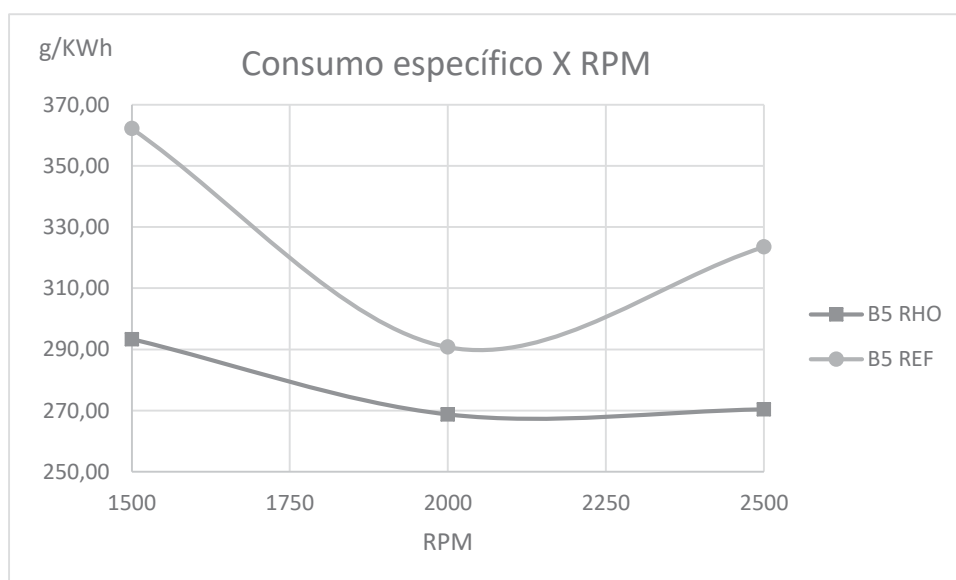
E-mail: donato@eq.ufrj.br

TABELA 09 – CARACTERÍSTICAS DO MOTOR DIESEL UTILIZADO NOS TESTES DO BODIESEL.

Tipo do motor	04 tempos a diesel
Marca e modelo	Agrale M95W
Número de cilindros	01 (vertical)
Injeção	Direta
Cilindrada	744cm ³
Potência máxima	15,5cv @3.000RPM
Torque máximo	4,3 kgf*m @2.500RPM

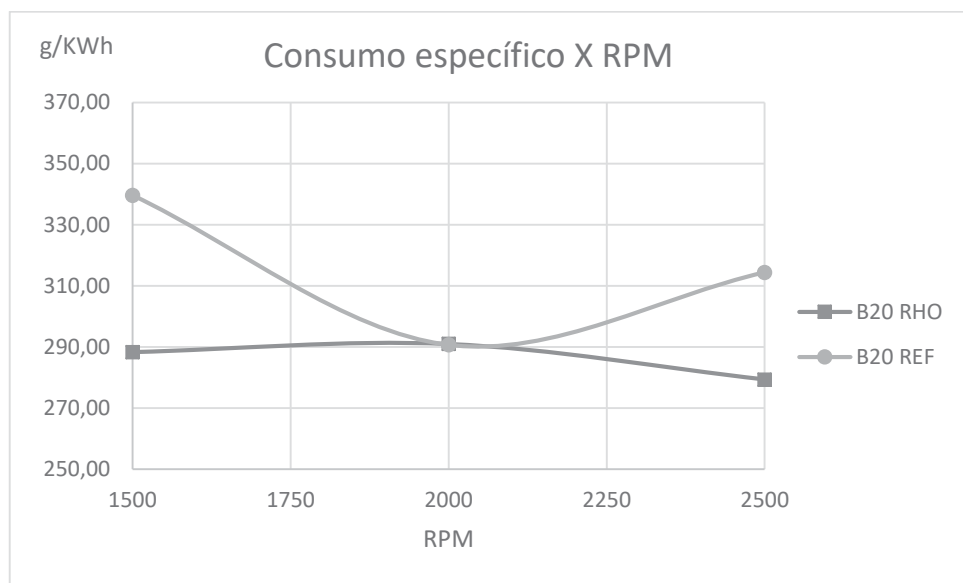
Foram avaliados para os quatros combustíveis os valores de consumo específico de combustível, emissões de Dióxido de carbono, Monóxido de carbono, Oxigênio, compostos nitrogenados e hidrocarbonetos. As imagens comparam os dois B5, o de referência e o produzido a partir da biomassa microbiana oleaginosa de *Rhodosporidium toruloides*, denominado “B5 RHO”. De maneira análoga os B20’s são comparados.

FIGURA 8. CONSUMO ESPECÍFICO DE COMBUSTÍVEL (EM G/KW*H) PARA B5 RHO E B5 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO DO MOTOR.



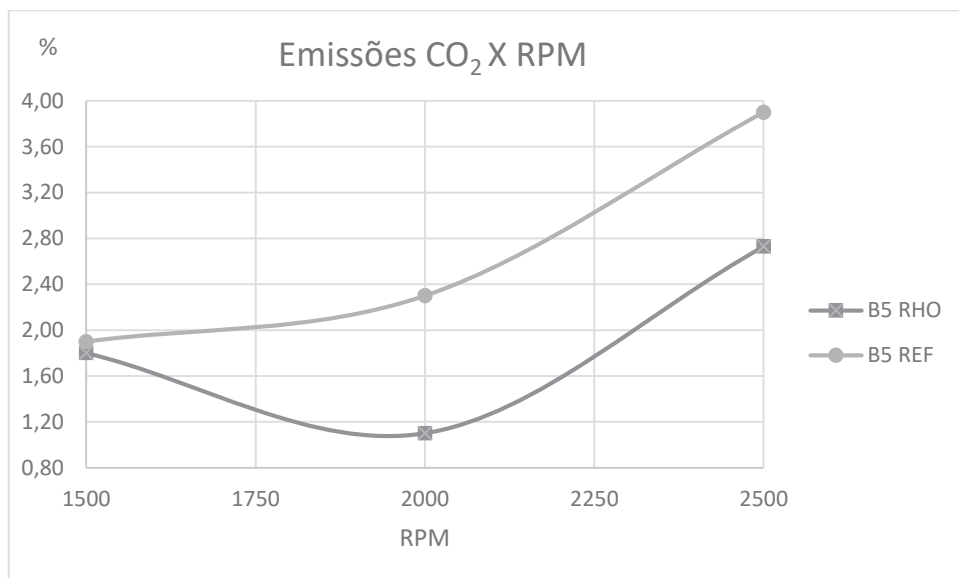
A figura 08 mostra que o consumo específico X RPM do B5 RHO é menor, ou seja: para gerar 1kwh de energia o motor utiliza menor massa de combustível, o que sugere um poder calorífico maior do B5 RHO. A 1.500 RPM, por exemplo o consumo de B5 RHO foi de 293 g, e o de B5 REF foi de 362g, uma economia expressiva de cerca de 24%. Em outras rotações a discrepância não foi tão alta, mas demonstram a mesma tendência. Lembrando que motores a diesel trabalham em rotações bem mais baixas que motores do ciclo Otto.

FIGURA 09. CONSUMO ESPECÍFICO DE COMBUSTÍVEL (EM G/KW*H) PARA B20 RHO E B20 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO DO MOTOR.



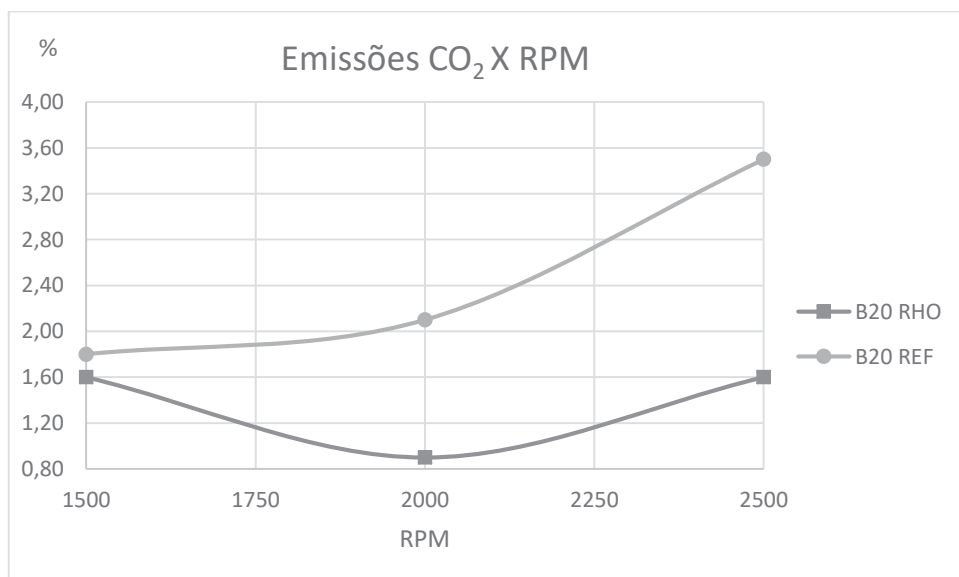
Verifica-se a mesma tendência no comportamento do B20 em relação ao consumo específico de combustível, porém com diferenças mais modestas. Em todas as medições avaliadas, o consumo do B20 RHO foi menor que o B20 REF.

Figura 10. EMISSÕES DE CO₂ (EM %) PARA B5 RHO E B5 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO DO MOTOR.



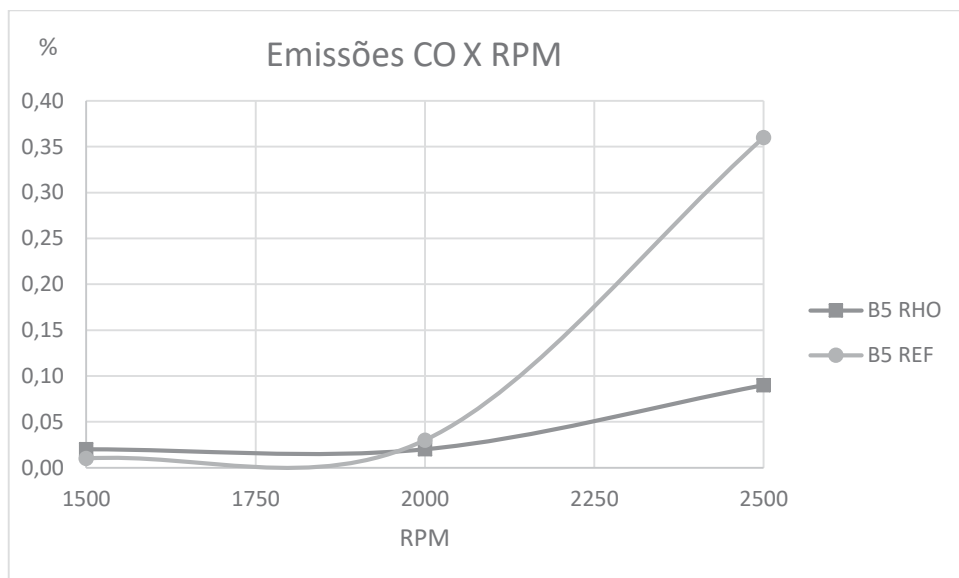
O gás carbônico é gerado através da queima completa do biodiesel, com o motor funcionando sob excesso de ar, ou seja, sob condições normais. O biodiesel B5 RHO foi mais limpo que o B5 REF, emitindo menor quantidade de gases. As reduções, em algumas situações, no caso de 2.000 RPM, superaram 50%. O CO₂ é apontado como um dos gases causadores do efeito estufa.

FIGURA 11. EMISSÕES DE CO₂ (EM %) PARA B20 RHO E B20 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO.



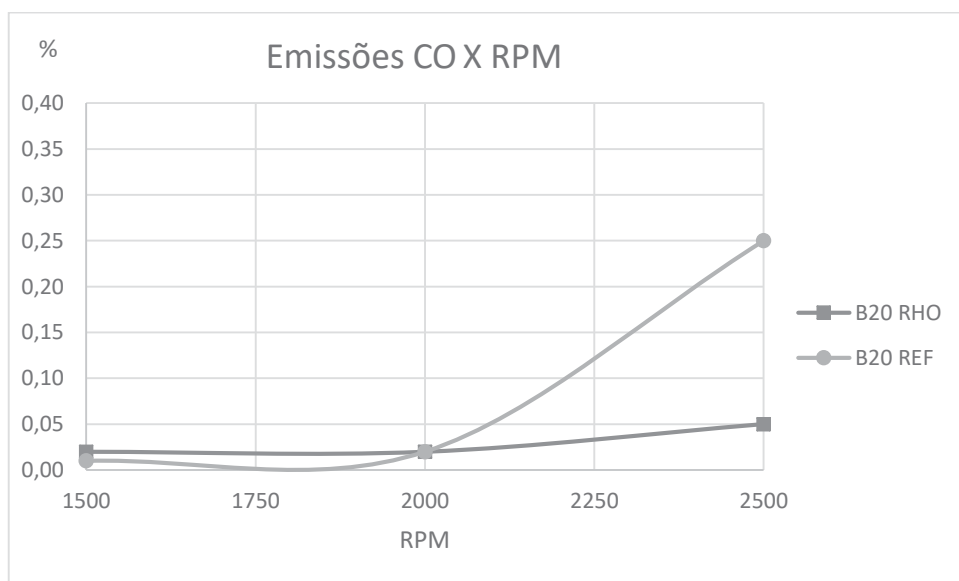
A figura 11 aponta claramente as menores emissões de CO₂ do B20 RHO frente ao B20 REF, características também avaliada com os B5. A 2.500RPM, a redução nas emissões chega a mais de 200%.

Figura 12. EMISSÕES DE CO (EM %) PARA B5 RHO E B5 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO DO MOTOR.



O monóxido de carbono é emitido quando a combustão não é completa. Porém não é correto afirmar que os resultados aqui apresentados como decorrentes de combustão deficiente em ar. Eles estão em baixas concentrações, e são inexoravelmente gerados, mesmo sob condições altamente favoráveis. Através da figura 12 verifica-se comportamentos semelhantes para o B5 RHO e o B5 REF em 1.500 e 2.000RPM. Entretanto, a 2.500RPM as emissões do B5 RFE tornam-se 4 vezes maiores que o B5 RHO. A alta concentração deste gás no ar é umas das principais causas de mortes.

FIGURA 13. EMISSÕES DE CO (EM %) PARA B20 RHO E B20 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO.



A figura 13 apresenta um comportamento muito parecido ao revelado na figura 12. Emissões de CO relativamente equilibradas entre 1.500 e 2.000RPM, porém uma emissão explosiva de CO à partir de 2.500RPM para o B20 REF, chegando a superar as emissões do B20 RHO em 5 vezes.

Através da análise da figura 14 fica evidente a maior emissão de Oxigênio por parte do B5 RHO frente ao B5 REF. Como o ar injetado ao motor é o mesmo para ambos os combustíveis, podemos afirmar que o B5 RHO consome menos Oxigênio que o B5 REF. Isto é um resultado positivo, uma vez que pode-se projetar máquinas com sistemas de alimentação de ar menores. A diferença a 2.000 e 2.500RPM é bastante saliente, da ordem de 20%.

FIGURA 14 - EMISSÕES DE O₂ (EM %) PARA B5 RHO E B5 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO DO MOTOR.

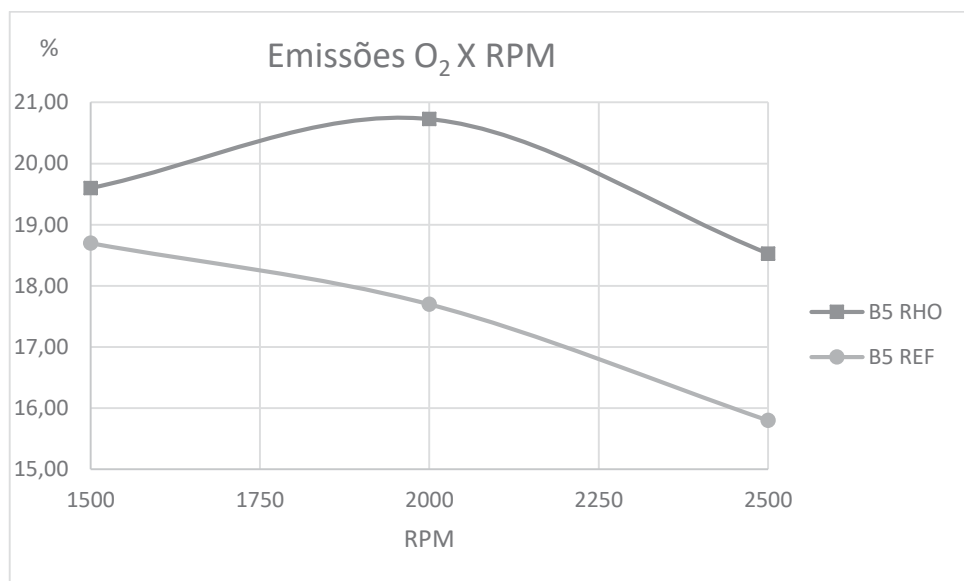
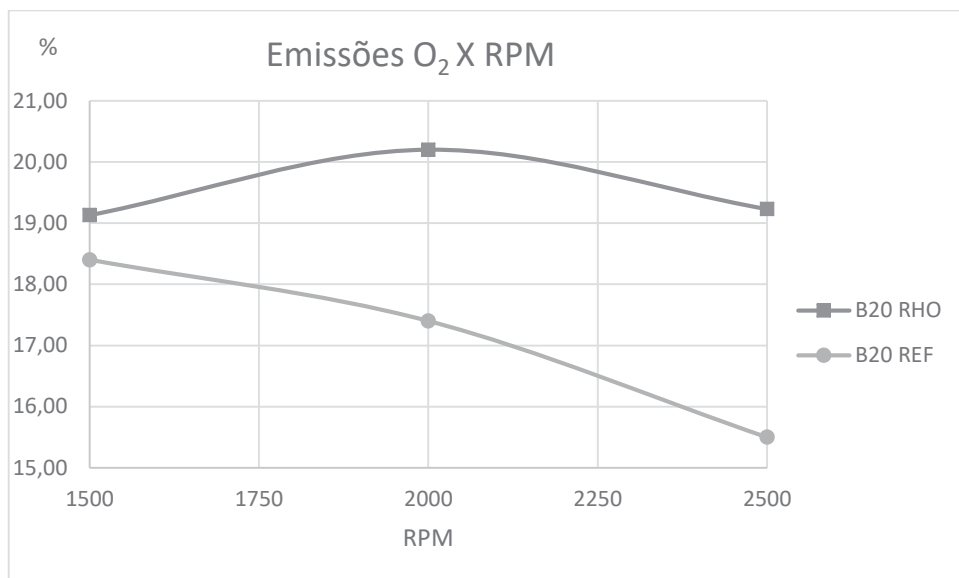
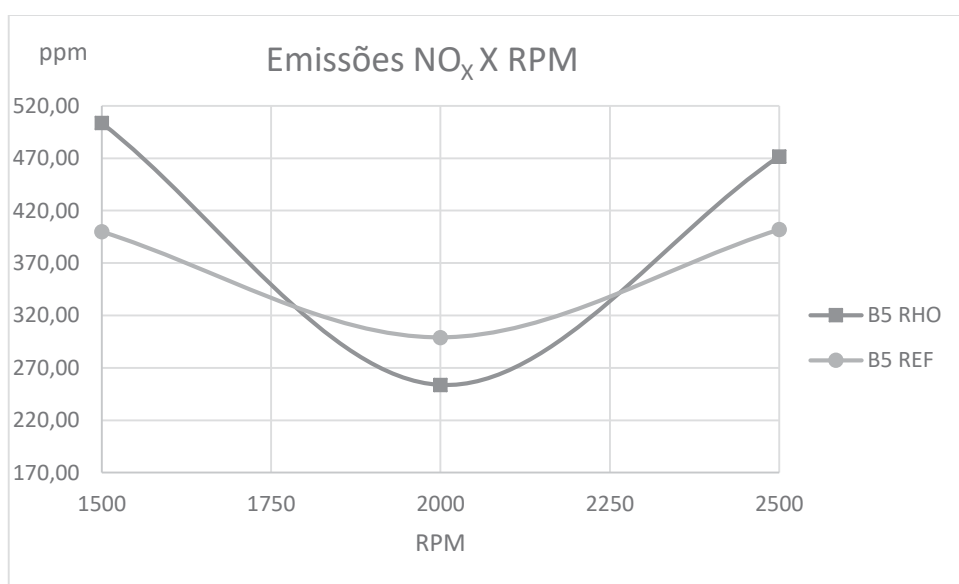


Figura 15 - EMISSÕES DE O₂ (EM %) PARA B20 RHO E B20 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO.



A figura 15 corrobora o que já foi constatado na figura 14. Uma necessidade menor de ar nas câmaras de combustão operadas com biodiesel produzido por *Rhodosporidium toruloides*. Ressaltamos que com estes resultados, preliminares, pode-se pensar em menores sistemas de alimentação de ar para motores a diesel se operados com biodiesel de *Rhodosporidium toruloides*. As reduções a 2.000 e 2.500RPM também são da ordem de 20%.

FIGURA 16 - EMISSÕES DE NO_x (EM PPM) PARA B5 RHO E B5 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO.



A figura 16 representa uma certa ruptura na tendência observada de melhores resultados obtidos com biodiesel de *Rhodospiridium toruloides*. Em dois dos três pontos do gráfico o B5 RHO emitiu maiores quantidades de NO_x que o B5 REF. Dentro os processos de formação dos NO_x podemos destacar o chamado processo térmico, onde a formação destes compostos acontece devido às altas temperaturas nas câmaras de combustão. Os testes reportados na tabela 08 sugerem que o B5 RHO apresenta maior poder calorífico que o B5 REF. Diante disso, caso o sistema de arrefecimento do motor não seja projetado para estas condições, o B5 RHO pode levar a um aumento excessivo na temperatura dentro do cilindro, ocasionando a maior formação no NO_x. Outra possibilidade sugere a grande quantidade de compostos nitrogenados presentes no próprio combustível. De acordo com a tabela 08 o biodiesel produzido por *Rhodospiridium toruloides* apresenta um teor de éster de 96,6%. Os ésteres não são nitrogenados, porém os outros 3,4% constituintes deste biocombustível podem conter Nitrogênio em sua composição.

A figura 17 porém demonstra um desempenho superior do biodiesel produzido por *Rhodospiridium toruloides*, o que nos leva a supor que apesar de haver um embasamento científico para as emissões de NO_x para o B5 RHO serem maiores que o B5 REF, é mais provável que tais dados sejam flutuações decorrentes de qualquer tipo de experimento com medições, por mais controlado que estes sejam. Nota-se inclusive, que as emissões de NO_x para o B20 RHO são menores se comparadas à mistura B5 RHO. Isto, por si só já derruba a tese de que o biodiesel produzido por *Rhodospiridium toruloides* pode apresentar altas concentrações de Nitrogênio em sua composição.

FIGURA 17 - EMISSÕES DE NO_x (EM PPM) PARA B20 RHO E B20 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO

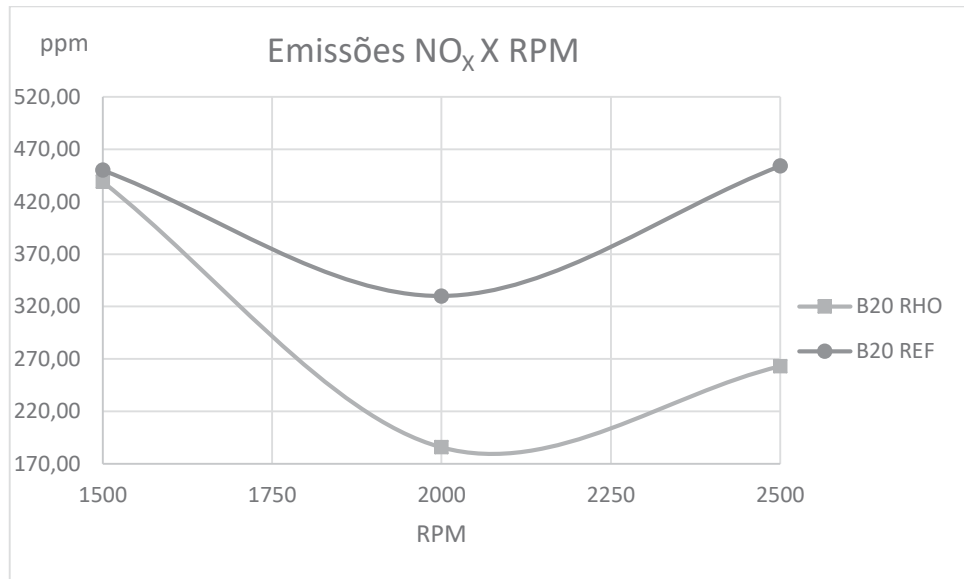
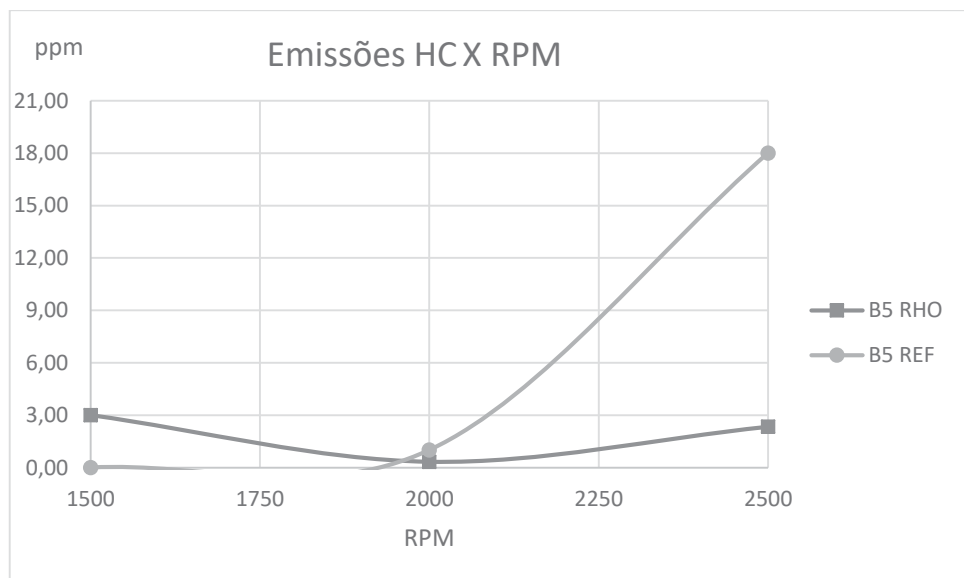
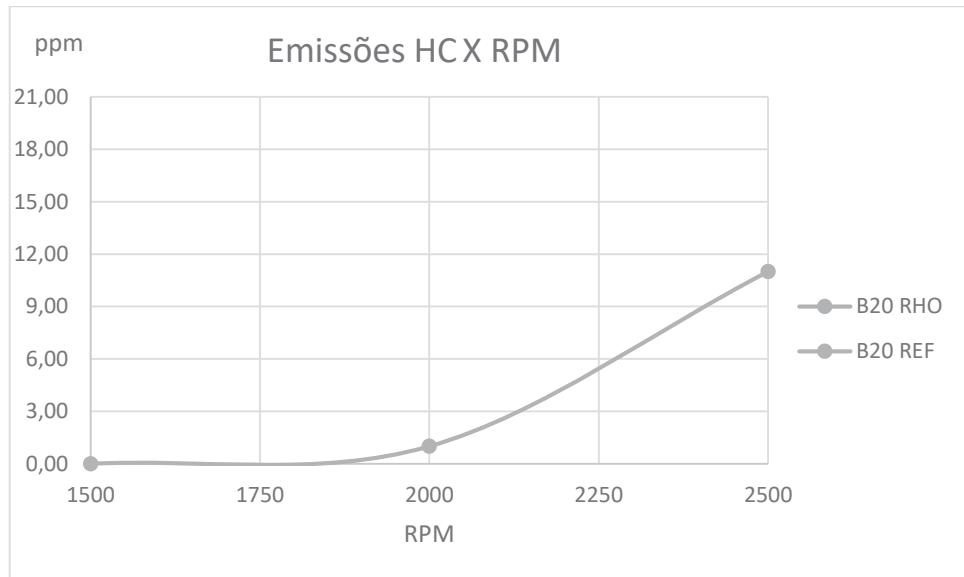


FIGURA 18 - EMISSÕES DE HC (EM PPM) PARA B5 RHO E B5 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO.



A figura 18 demonstra comportamento já observado de melhores respostas do biodiesel produzido por *Rhodospiridium toruloides* frente ao biodiesel referência. Apesar de as emissões de HC do B5 REF serem baixas, elas apresentam um pico aos 2.500RPM que destoa do comportamento do B5 RHO. Este mesmo comportamento é verificado na figura 19.

FIGURA 19 - EMISSÕES DE HC (EM PPM) PARA B20 RHO E B20 REF EM FUNÇÃO DA ROTAÇÃO.



As emissões de HC do B20 RHO ficaram abaixo do limite de detecção do equipamento que é 0,33PPM.

4.0 - CONCLUSÕES

Uma das vantagens da tecnologia aqui descrita, é que ela utiliza um meio à base da cana de açúcar, uma planta extremamente robusta, que é capaz de crescer em solos áridos e sem o auxílio de defensivos e fertilizantes, diferentemente de outras plantas utilizadas na produção de biodiesel. A cana ainda é um não alimento. A produtividade média de biodiesel por hectare de soja plantado, é em média de 500 a 600L no Brasil. Com a tecnologia aqui demonstrada a produtividade de biodiesel por hectare (de cana) é de mais de 3.000L.

Outra vantagem diz respeito às adaptações a que a cepa foi submetida, visando maior robustez. Durante o processo fermentativo em reatores de 1,5L até o de 1500L, volumes consideráveis de ácido, base e até antiespumante são adicionados aos fermentadores. O próprio feed adicionado ao reator de 1500L consistiu em melaço de cana *in natura*, sem qualquer tipo de tratamento. Com a utilização da cepa relatada neste trabalho (DEBB5533) nenhum destes componentes foi esterilizado, o que representa não só um custo menor, mas como uma quebra de paradigma em processos biotecnológicos.

O processo aqui descrito inova em termos de extração de óleo, com *input* energético sensivelmente menor que os métodos atualmente utilizados neste tipo de extração. Além do custo mais baixo, fica evidente que a qualidade do óleo melhora significativamente.

Outra inovação frente aos trabalhos publicados neste segmento diz respeito à metodologia de conversão do óleo em biodiesel, onde a hidroesterificação é capaz de converter praticamente qualquer tipo de matéria graxa em ésteres, e ofertou bons resultados em termos de coeficiente de conversão. Os resíduos gerados por esta tecnologia são purificados de maneira muito mais fácil que frente às rotas convencionais.

Os testes em motores evidenciam que o biodiesel produzido pela tecnologia aqui demonstrada é capaz de reduzir não somente as emissões de CO₂ frente ao biodiesel existente no mercado e amplamente utilizado, como todos os demais poluentes avaliados.

Esses resultados expressam um grande potencial e viabilidade na produção de biomassa microbiana oleaginosa a partir de um meio de cultura de baixo custo a partir de derivados da cana de açúcar, processo de extração desse bioóleo, bem como aplicação de uma metodologia inovadora para produção de biodiesel com elevados rendimentos de esterificação e transesterificação.

5.0 - TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO:


ARTIGO PUBLICADO

New Method for the Extraction of Single-Cell Oils from Wet Oleaginous Microbial Biomass: Efficiency, Oil Characterisation and Energy Assessment

Authors

[Authors and affiliations](#)

C. J. Dalmas Neto, E. B. Sydney, E. S. Candeo, E. B. S. de Souza, D. Camargo, A. C. N. Sydney, J. C. de Carvalho, L. A. J. Letti,

A. Pandey, C. R. Soccol 

Original Paper

First Online: 31 May 2019



Downloads

Abstract

Culture medium composition and an efficient lipid extraction process have the largest impact on the cost of industrial production of microbial single-cell oil (SCO). In this study, SCO from the yeast *Rhodospiridium thoruloides* grown in sugarcane medium was successfully produced in a 1 m³ bioreactor. Biomass was concentrated by sedimentation and the acid-hydrolysed cells were

ARTIGO PUBLICADO



Download PDF

Share

Export



Bioresource Technology

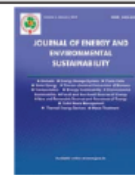
Volume 223, January 2017, Pages 259-268



Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study

Carlos Ricardo Soccol ^a , Carlos José Dalmas Neto ^{a, b}, Vanete Thomaz Soccol ^a, Eduardo Bittencourt Sydney ^c, Eduardo Scopel Ferreira da Costa ^a, Adriane Bianchi Pedroni Medeiros ^a, Luciana Porto de Souza Vandenberghe ^a

Show more



Biomass and Hydrocarbon Production by *Botryococcus braunii* Using Supplemented Secondary Treated Wastewater

Maria Alejandra Cruz Salazar^a, Adenise Lorence Woiciechowski^a, Jesus David Coral Medina^a, Arion Zandoná Filho^b, Carlos José Dalmas Neto^a, Satinder Kaur Brar^c, Carlos Ricardo Soccol^{a*}.

a: Federal University of Parana. Department of Biotechnology and Bioprocess Engineering. CEP 81531-970, Curitiba-PR, Brazil.

b: Federal University of Parana. Department of Chemical Engineering, Curitiba-PR, Brazil.

c: Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), Eau, Terre et Environnement, Québec-Canada

ARTICLE INFO

Received : 01 May 2017

Revised : 30 May 2017

Accepted : 31 May 2017

Keywords:

B. braunii; biomass production; hydrocarbon production; secondary treated wastewater.

ABSTRACT

The treatment of wastewater has been traditionally done by physical, chemical and biological process. A sequence of experiments was carried out to determine the best concentration of secondary treated wastewater that could be used as growth medium for *B. braunii*. It was found that 50% (v/v) of treated wastewater and 50% (v/v) of modified BG₁₁ medium was adequate for microalgae growth. Different concentrations of three salts : sodium nitrate, ferric citrate and dipotassium phosphate were tested using central composite design (DCCR), and dipotassium phosphate was found to be statistically significant at 0.12 g·l⁻¹ of this salt. Optimization of CO₂ concentration and light intensity showed that 70 μmol·m⁻²·s⁻¹ of light intensity produced biomass concentration of 1.77 g·l⁻¹ with 21.6% of hydrocarbons. The qualitative and quantitative identification of hydrocarbon constituents generated was performed by external standard in gas chromatography. Calibration curves were composed of hydrocarbons from 5 at 32 carbons chain.



Get Access

Share

Export





Bioresource Technology

Volume 292, November 2019, 121955



Microalgal biorefineries: Integrated use of liquid and gaseous effluents from bioethanol industry for efficient biomass production

Eduardo Bittencourt Sydney ^a, Carlos José Dalmas Neto ^b, Júlio Cesar de Carvalho ^b, Luciana Porto de Souza Vandenberghe ^b, Alessandra Cristine Novak Sydney ^a, Luiz Alberto Junior Letti ^b, Susan Grace Karp ^b, Vanete Thomaz Soccol ^b, Adenise Lorenci Woiciechowski ^b, Adriane Bianchi Pedroni Medeiros ^b, Carlos Ricardo Soccol ^b  

 Show more

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121955>

Get rights and content



Biofuels from Algae (Second Edition)

Sustainable Platform for Fuels, Chemicals and Remediation

Biomass, Biofuels, Biochemicals

2019, Pages 461-473



Chapter 18 - Production of biofuels from algae biomass by fast pyrolysis

Carlos José Dalmas Neto, Luiz Alberto Junior Letti, Susan Grace Karp, Francisco Menino Destéfani Vítola, Carlos Ricardo Soccol

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00018-4>

[Get rights and content](#)

Abstract

This chapter describes a patented technology for biofuel production through **fast pyrolysis** from lipid-rich microalgae. A non-GMO strain was cultured in open ponds, in a medium containing vinasse from an ethanol distillery, and


CAPÍTULO PUBLICADO

[Green Fuels Technology](#) pp 387-406 | [Cite as](#)

Microbial Oil for Biodiesel Production

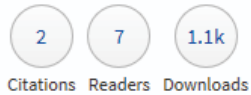
Authors

[Authors and affiliations](#)

Carlos José Dalmas Neto, Eduardo Bittencourt Sydney, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Carlos Ricardo Soccol 

Chapter

First Online: 11 August 2016



Part of the [Green Energy and Technology](#) book series (GREEN)

Abstract


Even if there is no consensus in the scientific community that climatic changes are related to the burning of fossil fuels, the extraction and use of fossil fuels is causing an imbalance of trade balances in several countries. Besides, there is the monopolization of economic power in the hands of a few countries. In this context, the diversification of energy matrixes around the world

CAPÍTULO PUBLICADO

[Green Fuels Technology](#) pp 255-289 | [Cite as](#)

Bioethanol Wastes: Economic Valorization

Authors [Authors and affiliations](#)

Eduardo Bittencourt Sydney , Carlos José Dalmas Neto, Alessandra Cristine Novak, Adriane Bianchi Pedroni Medeiros, Régis Nouaille, Christian Larroche, Carlos Ricardo Soccol

Chapter

First Online: 11 August 2016

 1  10  1.1k
Citations Readers Downloads

Part of the [Green Energy and Technology](#) book series (GREEN)

Abstract

The valorization of solid, liquid, and gaseous wastes from industrial activities is important to achieve positive economic and environmental balances. The ethanol industry is one of the biggest examples of biorefineries around the world, generating enormous amounts of wastes and

6.0 - REFERÊNCIAS

1. Parente ES. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Unigráfica. Fortaleza 2003.
2. Naime R. Crise de Energia. Disponível em <http://www.canalvg.com.br/index.php/canalvg/descricao/geral/75/Crise+de+Energia.html> 2014. Acessado em 29/03/2019.
3. Ministério de minas e energia. Relatório Síntese | ano base 2017 | Balanço Energético Nacional 2018 Empresa de Pesquisa Energética - EPE Rio de Janeiro, RJ Maio de 2018J
4. Rodrigues SA, Batistela GC. Uma revisão sobre a disponibilidade hídrica brasileira para geração de energia elétrica. Geoambiente On-line. 2013(21).
5. Dalmas Neto CJ. Desenvolvimento de bioprocessos para produção de biocombustíveis à partir da pirólise rápida de microalgas Curitiba: Universidade Positivo; 2012.
6. Pandey A, Lee D-J, Chisti Y, Soccol CR. Biofuels from algae: Newnes; 2013.
7. Instituto Humanita Unisinos, Aumenta a concentração de CO₂ na atmosfera em 2018. disponível em <http://www.ihu.unisinos.br/78-noticias/586628-aumenta-a-concentracao-de-co2-na-atmosfera-em-2018>. Acessado em 12/02/2019
8. Cássia Albino J, Creste S, Figueira A. Cana de açúcar. KL3.82.
9. União das Indústrias da Cana de Açúcar, Setor sucroenergético no Brasil. Uma visão para 2030. Disponível em http://www.mme.gov.br/documents/10584/7948692/UNICA-CEISE_Sector+Sucroenergético+no+Brasil_Uma+Visão+para+2030.pdf/80da9580-60c7-4f53-afaf-030ad01f3ebf;jsessionid=AC802B166C93389BED1AB445EAB7CD10.srv155SETOR SUCROENERGÉTICO NO BRASIL UMA VISÃO PARA 2030. Acessado em 29/06/2019
10. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT). Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> 2014. Acessado em 04/04/2019.
11. C.A. L. Globo Rural 2014. Disponível em <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2014/12/usina-em-alagoas-comeca-produzir-o-etanol-de-segunda-geracao.html>. Acessado em 29/06/2019
12. Rossilo-Calle F; Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira: UNICAMP; 2005.
13. CONAB - Acompanhamento da safra brasileira de cana, volume 4 - Safra 2017/18, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-73, agosto 2017.


14. CONAB - Acompanhamento da safra brasileira de cana, volume 4 - Safra 2017/18, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-73, agosto 2017.
15. Oacdd. Produtividade de cana (ton/ha). In: 01 G, editor. Microsoft Excel2015.
16. Presidência da República - Casa Civil - Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei 11.097 Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm. Acessado em 19/03/2019
17. Diniz Freitas D, Santos Thomé O, Bordeaux-Rego R. Avaliação do impacto da variação da concentração de biodiesel no diesel para a rentabilidade do negócio no mercado brasileiro. Relatórios de pesquisa em engenharia de produção v.13, n.4, pp. 42-53 2013.
18. ANP. Disponível em <https://aprobio.com.br/2019/05/27/soja-volta-a-ganhar-espaco-na-producao-de-biodiesel-em-abril/>. Acessado em 11/05/2019
19. Portal biosistemas brasil. Disponível em <http://www.usp.br/portaliobiosistemas/?p=1787>. Acessado em 14/09/2018.
20. Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. Bioresource Technology. 2004;95(3):287-91.
21. Pometto A, Shetty K, Paliyath G, Levin RE. Food biotechnology: CRC Press; 2014
22. Soccol C. R; , Dalmas Neto C. J; Soccol V. T; Sydney E. B; Costa E.S.F; Medeiros A.B.P; Vandenberghe L.P.S; Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study, Bioresource Technology, Volume 223, 2017, Pages 259-268.
23. Kalscheuer R, Stölting T, Steinbüchel A. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. Microbiology. 2006;152(9):2529-36.
24. Brasilagro. Disponível em <https://www.brasilagro.com.br/conteudo/biorrefinarias-entram-no-foco-de-dsm-e-amyris.html>. Acessado em 26/03/2019
25. Alonso J, Barredo JL, Díez B, Mellado E, Salto F, Garcia JL, Cortes E. D-amino-acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) ATCC 26217/1998. Microbiology. 1998 144 (Pt 4).
26. Somogy, M. A New Reagent for Determination of Sugars. A new Sugar Reagent, May p. 61 — 68, 1945.
27. V. L. Singleton, Joseph A. Rossi. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am J Enol Vitic. January 1965 16: 144-158; published ahead of print January 01, 1965

28. Sánchez-Moreno C, Larrauri J.A, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998
29. Zhou, W., Li, Y., Zhang, Y., Zhao, Z.: Energy efficiency evaluation of lipid production by oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides*. *J. Therm. Anal. Calorim.* 108, 119–126 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1659-6>
30. Bonturi, N., Matsakas, L., Nilsson, R., Christakopoulos, P., Miranda, E., Berglund, K., et al. Single cell oil producing yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodosporidium toruloides*: selection of extraction strategies and biodiesel property prediction. *Energies* 8:5040–5052 (2015). <http://www.mdpi.com/1996-1073/8/6/5040/>
31. Dalmas Neto, C.J., Sydney, E.B., Candeo, E.S. et al. New Method for the Extraction of Single-Cell Oils from Wet Oleaginous Microbial Biomass: Efficiency, Oil Characterisation and Energy Assessment Waste Biomass Valor (2019)

ANEXO 01

Algumas patentes geradas durante o desenvolvimento da tecnologia:

(Uso exclusivo do INPI)

DEPÓSITO Pedido de Patente ou de Certificado de Adição	 PI0705520-0 <small>Espaço reservado para etiqueta (número e data de impressão)</small>
---	---

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: **OURO FINO PARTICIPAÇÕES E EMPRENDIMENTOS S/A.**
- 1.2 Qualificação: **prestadora de serviços** 1.3 CNPJ/CPF: **07.065.512/0001-85**
- 1.4 Endereço completo: **Av. Independência, 3320 - Sala 24 – Alto da Boa Vista
14025-230 RIBEIRÃO PRETO – SP**
- 1.5 Telefone: **(11) 3104-4971**
FAX: **(11) 3106-4380** continua em folha anexa

2. Natureza:

- 2.1 Invenção 2.1.1. Certificado de Adição 2.2 Modelo de Utilidade


Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

“PROCESSO TECNOLÓGICO INTEGRADO PARA PRODUÇÃO DE LÍPIDIOS E BIODIESEL POR ALGAS UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS VINHAÇA E/OU CO₂, RESÍDUOS DAS DESTILARIAS DE ÁLCOOL (ETANOL)”.

continua em folha anexa

(Uso exclusivo do INPI)

DEPÓSITO Pedido de Patente ou de Certificado de Adição	 PI0705520-0 <small>Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)</small>
---	--

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: **OURO FINO PARTICIPAÇÕES E EMPRENDIMENTOS S/A.**

1.2 Qualificação: **prestadora de serviços** 1.3 CNPJ/CPF: **07.065.512/0001-85**

1.4 Endereço completo: **Av. Independência, 3320 - Sala 24 – Alto da Boa Vista
14025-230 RIBEIRÃO PRETO – SP**

1.5 Telefone: **(11) 3104-4971**

FAX: **(11) 3106-4380**

continua em folha anexa

2. Natureza:

2.1 Invenção 2.1.1. Certificado de Adição 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

“PROCESSO TECNOLÓGICO INTEGRADO PARA PRODUÇÃO DE LÍPIDIOS E BIODIESEL POR ALGAS UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS VINHAÇA E/OU CO₂, RESÍDUOS DAS DESTILARIAS DE ÁLCOOL (ETANOL)”.

continua em folha anexa

DEPÓSITOPedido de Patente ou de
Certificado de Adição**PI0706144-7**

depósito / /

e data de depósito)

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):1.1 Nome: **OURO FINO PARTICIPAÇÕES E EMPREENDIMENTOS S/A .**1.2 Qualificação: **prestadora de serviços** 1.3 CGC/CPF: **07.065.512/0001-85**1.4 Endereço completo: **Av. Independência, 3.320 – Sala 24 – Alto da Boa Vista
14025-230 RIBEIRÃO PRETO – SP**1.5 Telefone: **(11) 3104-4971**FAX: **(11) 3106-4380** continua em folha

anexa

2. Natureza: 2.1 Invenção 2.1.1. Certificado de Adição 2.2 Modelo de UtilidadeEscreva , obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada:**3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):****“PROCESSO TECNOLÓGICO PARA RECICLAGEM DA VINHAÇA E CO²
PROVENIENTE DA QUEIMA DO BAGAÇO EM DESTILARIAS DE ÁLCOOL E
USINAS DE AÇUCAR ATRAVÉS DO CULTIVO ALGAL”** continua em folha anexa