



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0805091-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO

(21) Número do Depósito: PI 0805091-0

(22) Data do Depósito: 17/11/2008

(43) Data da Publicação do Pedido: 08/09/2010

(51) Classificação Internacional: C12P 21/00; C12P 7/64; C12N 1/12; C12R 1/89

(54) Título: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA, PROTEÍNAS E LIPÍDIOS DE MICROALGAS UTILIZANDO MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua Dr. Faivre, 405, 1º andar, Centro, Curitiba, PR, BRASIL(BR)

(72) Inventor: CARLOS RICARDO SOCCOL; IVO ALBERTO BORGHETTI; JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA; JÚLIO CESAR DE CARVALHO

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 17/11/2008, observadas as condições legais

Expedida em: 07 de Março de 2017.

Assinado digitalmente por:
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente



"PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA, PROTEÍNAS E LIPÍDIOS DE MICROALGAS UTILIZANDO MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO"

Campo da Invenção

A presente invenção trata de um processo para
5 produção de biomassa, proteínas e lipídios de microalgas, o qual
vantajosamente utiliza como meio de cultivo das ditas microalgas os
rejeitos da indústria de processamento de mandioca, notadamente a
manipueira e as águas de lavagem de raízes e fécula.

O processo da presente invenção contribui, ainda, como
10 uma solução para a redução da emissão de cargas poluentes nos
cursos de água, e desertificação do solo pelo acúmulo de sais minerais,
uma vez que pelo presente processo obtém-se uma drástica redução
dos valores de DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO
(Demanda Bioquímica de Oxigênio) presentes na manipueira, tendo em
15 vista o seu aproveitamento como substrato.

Histórico da Invenção

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à
família das *Euphorbiaceae* e tem importância econômica para os
países tropicais. Existem dois grandes grupos de mandioca, o grupo da
20 mandioca doce (aipim ou macaxeira), de uso comum doméstico, e o
grupo da mandioca brava que pode conter uma quantidade acima de
1.500 ppm de compostos cianogênicos, e preferida para a
industrialização em função da resistência a pragas.

A mandioca é uma das principais culturas alimentícias
25 mundiais, sendo a quarta mais importante nos países em
desenvolvimento e a oitava mais importante do mundo, com uma
produção anual da ordem de 215 milhões de toneladas ano (FAO –
Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura –
disponível em <<http://www.fao.org/>>, acessado em 29/09/2008), e um

crescimento anual médio da ordem de 2,8% ao ano. Os maiores produtores são Nigéria, Brasil, Tailândia, Indonésia e Congo, que respondem por mais de 50% da produção. A mandioca suporta diversas condições climáticas, mas o seu cultivo é melhor entre 16 e 38C, apresentando produtividades médias da ordem de 15 t.ha⁻¹.ano⁻¹, embora em algumas regiões a produtividade possa ser superior a 35 t.ha⁻¹.ano⁻¹.

Pela ampla área abrangida pelos cultivos, seu uso se desdobra em formas muito diversas de tecnologia, processos e, por conseguinte, de produtos, adaptados à realidade regional e ao consumidor final; no entanto, a maior parte da mandioca é processada para a produção de farinha ou de fécula.

A mandioca contém cerca de 65% de água nas raízes, com aproximadamente 35% de amido. Nas fábricas de farinha de mandioca, a prensagem da massa ralada produz cerca de 300 litros de líquido residual por tonelada de raiz e, nas fecularias, este valor aumenta para 600 litros de um efluente mais diluído, devido à adição de água durante sua produção. O líquido de prensagem das raízes de mandioca ralada e de lavagem das raízes é a *manipueira*, um líquido branco rico em matéria orgânica e cianetos, e que apresenta alto potencial poluidor.

Processamento da mandioca – produção de farinha ou de fécula

As raízes de mandioca previamente limpas (i.e., removido o excesso de terra) são pesadas. A seguir, é feita a lavagem e descasque, que podem ser simultâneos. A mandioca lavada é a seguir ralada, prensada e tostada, dando como produto a farinha de mandioca e como resíduo líquido a água de prensagem, a *manipueira*.

Na produção de fécula, as raízes descascadas são moídas através de um cilindro rotativo que funciona com alta

velocidade, conhecido como cevadeira, que causa rompimento celular e conseqüentemente liberação do amido. A separação do amido e das fibras é feita em peneiras cônicas rotativas, com lavagem com água. O resíduo fibroso é conduzido para tratamento, enquanto a

5 suspensão de amido é purificada e concentrada por centrifugação, para retirada do amido solúvel e partículas estranhas. O amido concentrado é bombeado para um filtro a vácuo ou para um desidratador centrífugo. O amido desidratado segue uma válvula rotativa que o dosa para um secador pneumático de corrente contínua

10 tipo "Flash Drier".

Nesse processo, o resíduo da centrifugação da fécula é a manipueira diluída, isto é, misturada à água de lavagem do amido.

As fibras resultantes da extração do amido são canalizadas para tratamento ou secagem (para preparo de rações).

15 Além da farinha e da fécula, outros produtos como polvilho, tapioca e farinha d'água são produzidos a partir da polpa da mandioca.

A destinação da mandioca varia em cada país, sendo usada primariamente para alimentação humana, mas também para alimentação animal e para produção de álcool. Considerando a

20 produção média brasileira de 2003-2008, da ordem de 25 milhões de toneladas/ano, com processamento industrial da maior parte da produção, gerou-se um volume de manipueira da ordem de 6 bilhões de litros de efluente concentrado.

Esse resíduo líquido é altamente poluidor, porque possui

25 uma carga de matéria orgânica alta, além de substâncias tóxicas que liberam cianetos. A Tabela 1 apresenta a composição média da manipueira não diluída:

Tabela 1 – Composição média da manipueira

Parâmetro	Unidade	Valor médio
------------------	----------------	--------------------

Parâmetro	Unidade	Valor médio
pH	-	4,1
Umidade	%	93,7
DBO 5	mg/L	55.000
DQO	mg /L	85.400
Sólidos totais (ST)	mg/L	62.800
Carboidratos solúveis	mg/L	5.100
Lipídios	mg/L	5.000
Cinzas	mg/L	10.600
Nitrogênio bruto	mg/L	4.900
Sólidos Voláteis (SV)	mg/L	52.300
Fibras	mg/L	3.000
Lignina	mg/L	3.100
Cianeto livre	mg/L	43,75
Cianeto total	mg/L	444,00
Fósforo	mg/L	160,84
Potássio	mg/L	1.863,5
Cálcio	mg/L	227,50
Magnésio	mg/L	405,00
Ferro	mg/L	15,35
Manganês	mg/L	3,7
Enxofre	mg/L	19,5
Boro	mg/L	5,00
Relação C/N		7,57
Relação C/P		34,43
Acidez volátil	mg/L	2.703,70
Alcalinidade	mg/L	1.628,00
Acidez titulável	mg/L	3,27

Fonte: Cereda, 2001, Souza e Pawlowski, 1998

Analisando a Tabela 1, nota-se que além da alta carga poluidora da manipueira, existe um teor importante de cianetos – substâncias tóxicas para animais e algumas plantas e microrganismos. Uma fração de 10% desse cianeto encontra-se na forma livre, e o
5 restante encontra-se na forma ligada a glicosídeos como a linamarina, o que impede o uso direto da manipueira como complemento de alimentação animal, por exemplo, e seu descarte em corpos hídricos.

Alternativas para a destinação da manipueira são a fertirrigação ou a biodegradação em biodigestores – mas, novamente,
10 há limitações quanto à aplicação em solos e essa destinação é antes uma forma de evitar a poluição de corpos hídricos, do que propriamente o aproveitamento dos nutrientes presentes no efluente.

O emprego de conhecimentos técnico-científicos para um melhor gerenciamento da manipueira, visando seu emprego mais
15 racional, econômico e de menor impacto ambiental é de fundamental importância.

Estado da Arte

Microalgas são organismos que contém clorofila, realizam a fotossíntese, englobam uma grande variabilidade morfológica, estrutural e metabólica, incluindo até mesmo alguns grupos
20 procarióticos. Grande parte desses organismos são encontrados na água, de forma livre, fazendo parte do fitoplâncton e são a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos, respondendo por até 50% da fixação de carbono e produção de oxigênio do planeta (OLIVEIRA,
25 A. Crescimento das diatomáceas *bacillariophyceae* *Chaetocerus* sp., *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis* em diferentes meios de cultura e em condições controladas de temperatura e salinidade. Dissertação de Mestrado em Aqüicultura, Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993).

As microalgas têm sido tradicionalmente classificadas por diversos critérios, como tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes de parede celular (TOMASSELLI, L. The microbial cell, in. RICHMOND, A. (Ed), Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, p. 3-19,2004). As microalgas formam um grupo heterogêneo de organismos que engloba todos os microrganismos fotossintetizantes, sejam eucarióticos ou procarióticos, geralmente unicelulares, gram-negativos.

10 O número de espécies de microalgas é muito grande, porém ainda desconhecido, estima-se que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes. As microalgas são fontes ilimitadas de biomoléculas de interesse farmacêutico, alimentar, assim como outras substâncias de interesse comercial (PULZ, O., GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, 65 (6), p.635-648, 2004).

20 Segundo (RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Mass Culture - CRC Press, USA,1986), a produção microalgal pode ser justificada em razão de inúmeras vantagens, dentre as quais podem ser destacadas:

- processo biológico eficiente que transforma energia solar em matéria orgânica, sendo que muitas espécies crescem mais rapidamente que as plantas terrestres, fato que possibilita maiores produtividades em biomassa;
- 25 - sua natureza unicelular assegura uma biomassa com mesma composição bioquímica, o que não ocorre nas plantas terrestres, que apresentam compostos localizados em partes específicas, tais como, nos frutos, folhas, sementes ou raízes;

- através do controle das condições ambientais de cultivo, tais como, luz, temperatura e nutrientes, muitas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios, etc. Esses compostos têm elevado valor comercial, principalmente por serem considerados oriundos naturais;

- podem crescer bem em regiões com extremas condições climáticas. Os cultivos podem ser desenvolvidos com água marinha ou de estuários, a qual não pode ser convencionalmente empregada no cultivo de plantas com valor para a agricultura, ou com águas residuárias provenientes de diversos processos de produção, tais como, agropecuária, indústria e dejetos domésticos, por exemplo;

- o ciclo de vida da maioria das microalgas se completa em poucas horas, o que favorece a seleção de cepas e o melhoramento genético das espécies.

Quanto à nutrição, para um crescimento ótimo, as microalgas têm necessidade de uma série de nutrientes. Entre os diferentes gêneros e espécies, ocorrem muitas variações relacionadas principalmente à quantidade dos nutrientes no meio. Ainda assim, estas necessidades nutricionais são dependentes de distintas condições ambientais (ABALDE J. C. A., FIDALGO J. P., TORRES E., HERRERO, C. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. La Corunã: Serviço de Publicaciones, p. 210, 1995). Os macronutrientes de que as microalgas necessitam são carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e fósforo, além de cálcio, magnésio, enxofre e potássio. Quanto aos micronutrientes, geralmente necessitam de ferro, manganês, cobre, molibdênio e cobalto, enquanto algumas microalgas necessitam também de baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura (GHILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.,

CHANLEY, M. H (Eds) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, p.29-60,1975).

Os elementos nutritivos mais importantes são o carbono, nitrogênio, fosfatos, sais de magnésio, potássio e cálcio. Elementos em concentrações menores como manganês e cobalto são indispensáveis em uma série de atividades metabólicas importantes. As fontes mais importantes de carbono são os carboidratos. O nitrogênio encontra-se no material protéico e nos produtos de sua degradação, sendo fornecido através de sais amoniacais.

O primeiro cultivo unialgal foi realizado por Beijerinck em 1890 com *Chlorella vulgaris* (COLLA L., RUIZ W. A., COSTA J. A. V., Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas. Vetor, 12, p.61 - 78, 2002). O cultivo em grande escala realmente começou a ser foco de pesquisa em Stanford, na Califórnia, de 1948 a 1950, com a finalidade de utilização de técnicas laboratoriais para o cultivo em escala comercial (RICHMOND A., Handbook of microalgal mass culture. Boston: CRC, 1990, e BOROWITZKA M. A., Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, 70, p.313 - 321, 1999). Durante a segunda Guerra Mundial a *Chlorella* sp. também havia sido investigada por pesquisadores alemães devido ao potencial em duplicar sua biomassa algumas vezes por dia em laboratório com iluminação adequada, sendo que a mesma proporcionaria uma estocagem de fontes de alimentos, principalmente de proteínas. A primeira planta piloto de *Chlorella* sp. foi construída e operada em 1951 na cidade de Cambridge, nos Estados Unidos. Nos anos 80 cerca de 46 fábricas de microalgas na Ásia produziam mais de 1000 kg de microalgas por mês e em 1996 e de acordo com BOROWITZKA (1999) cerca de 2000 toneladas de *Chlorella* sp. foram produzidas comercialmente somente no Japão.

A *Chlorella* sp. é uma microalga eucariótica esférica com diâmetro variando entre 5-10 µm, pertencente a divisão *Chlorophyta* e ordem *Chlorococcales* (MORAIS M. G., Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Rio Grande, 2006). A produção comercial desta microalga é dirigida ao consumidor de alimentos saudáveis e o custo de produção é de aproximadamente US\$ 10-15 por quilograma em peso seco. É uma alga rica em nutrientes: contém aproximadamente 60% de proteínas – mais que a soja, a carne bovina e o trigo; 13% de carboidratos, 9% de lipídios e 5% de clorofila; mais de 20 tipos de vitaminas e sais minerais, com destaque para beta caroteno (vitamina A) e vitamina B12, contendo 15 vezes mais clorofila que espinafre, 20 vezes mais vitamina E que o leite e 5 vezes mais vitamina B que o arroz integral. A eficiência protéica da *chlorella* é alta, e esse microrganismo pode ser usado como alimento, por ser considerado GRAS (reconhecido como seguro, pela US-FDA, Food and Drug Administration, USA).

As microalgas ainda não são bem estudadas pelo ponto de vista biotecnológico. Na verdade, entre as dezenas de milhares de espécies que acredita se existir, apenas alguns milhares são mantidas em coleções, algumas centenas são investigadas pelo teor químico e apenas um punhado são utilizadas em escala industrial.

O cultivo de algas tem beneficiado também o seqüestro de carbono, pois as mesmas realizam a fotossíntese ao capturarem o CO₂ da atmosfera, beneficiando enormemente o mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL). O que falta ainda é uma metodologia aprovada pelos os órgãos regularizadores para quantificar a captação de CO₂ pelas microalgas.

De um modo geral, as algas necessitam, para seu crescimento, de luz, água, sais minerais e de certa quantidade de dióxido de carbono (CO₂).

Partindo desse conhecimento, e a através de longos estudos e experimentos, o Depositante verificou que a utilização da manipueira proveniente do processamento da mandioca em fecularias e farinheiras, com ou sem suplementação com CO₂, apresenta grande potencial para produção de biomassa algal, de diversos gêneros e espécies, notadamente de *Chlorella sp.*, para aplicação na alimentação humana e animal, bem como para produção de outras moléculas de interesse comercial.

Descrição Resumida da Invenção

As microalgas, quando cultivadas em meios adequados, podem duplicar sua biomassa rapidamente. São, também capazes de consumir fontes complexas de carbono, como carboidratos e ácidos. Estas características, aliadas à simplicidade das técnicas de cultivo, tornam o cultivo de microalgas em manipueira o objeto principal de interesse da presente invenção.

Portanto, a presente invenção tem como objetivo específico prover um processo para a produção de biomassa, proteínas e lipídios de microalgas, utilizando a manipueira gerada no processamento da mandioca, como meio ou substrato de cultivo.

Mais especificamente, a presente invenção tem como objetivo prover um processo de produção de biomassa de microalgas a partir das águas residuais do processamento de mandioca, dita manipueira, gerada na prensagem da mandioca ralada e na lavagem das fibras e centrifugação da fécula.

Mais especificamente ainda, a presente invenção tem como objetivo prover um processo de produção de microalgas a partir

da manipueira, gerada na prensagem da mandioca ralada e na lavagem das fibras e centrifugação da fécula, as ditas microalgas sendo selecionadas dentre um ou mais dos gêneros (espécies) do grupo compreendendo *Amphidinium* sp. e outros membros da classe

5 *Dinophyta*, *Chlorachnion* sp. e outros organismos da classe *Chlorachniophyta*, *Botryococcus* sp., *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Chlorochytrium* sp., *Chlorococcum* sp., *Chloromonas* sp., *Choricystis* sp., *Coccolobos* sp., *Coelastrum* sp., *Cystomonas* sp., *Dactylococcus* sp., *Desmodesmus* sp., *Dictyococcus* sp., *Dunaliella* sp., *Haematococcus*

10 sp., *Microspora* sp., *Pediastrum* sp., *Pseudochlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Tetracystis* sp., *Tetradismus* sp., *Tetraselmis* sp., *Tetraspora* sp., *Volvox* sp., e outros membros da classe *Chlorophyceae*, *Micromonas* sp. e outros membros da classe *Prasinophyceae* sp., *Actinastrum* sp., *Desmococcus* sp., *Muriella* sp., *Nannochloris* sp., *Oocystis* sp. e

15 outros membros da classe *Trebouxiophyceae*, *Chlorocystis* sp., *Cladophoropsis* sp., *Halochlorococcum* sp. e outros membros da classe *Ulvophyceae*, *Chroomonas* sp. e outros membros da classe *Cryptophyceae*, *Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp., *Aphanocapsa* sp., *Arthrospira* sp., *Calothrix* sp., *Chroococcus* sp., *Crinalium* sp.,

20 *Fischerella* sp., *Fremyella* sp., *Limnothrix* sp., *Lyngbya* sp., *Microcoleus* sp., *Microcystis* sp., *Nodularia* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp., *Spirulina* sp., *Synechococcus* sp., *Synechocystis* sp. e outros membros da divisão *Cyanobacteria*, *Euglena* sp. e outros membros da classe *Euglenophyceae*, *Cyanophora* sp. e outros membros da divisão

25 *Glaucophyta*, *Isochrysis* sp., *Pavlova* sp. e outros membros da divisão *Haptophyta*, *Cyclotella* sp., *Phaeodactylum* sp., *Skeletonema* sp., *Thalassiosira* sp. e outros membros da classe *Bacillariophyceae*, *Chromulina* sp. e outros membros da classe *Chrysophyceae*, *Nannochloropsis* sp., *Phaeobotrys* sp., *Heterosigma* sp., *Botrydium* sp.,

Heterococcus sp., *Xanthonema* sp. e outros membros da divisão *Heterokontophyta*, *Cyanidium* sp., *Dixoniella* sp., *Galdieria* sp., *Porphyra* sp., *Porphyridium* sp., *Rhodospira* sp. e outros membros da classe *Rhodophyceae*; *Chloechaete* sp., *Arthrodesmus* sp., *Cosmarium* sp.,
5 *Desmidium* sp., *Euastrum* sp., *Spirogyra* sp., *Zygnema* sp. e outros membros da divisão *Charophyta*. Não obstante, a presente invenção pode compreender outros gêneros (espécies) de microalgas além dos aqui relacionados.

Um objetivo especialmente contemplado pela presente
10 invenção é o uso da microalga *Chlorella minutissima* DEB&B 013, em processo de produção de biomassa, proteínas e lipídios a partir da manipueira, gerada como resíduo do processamento de mandioca para produção de farinha ou fécula.

Portanto, resumidamente, a presente invenção tem por
15 objetivos a reciclagem e utilização da manipueira como meio de cultivo para produção de biomassa algal rica em proteínas, lipídios e demais produtos de interesse comercial, notadamente biomassa de *Chlorella*, e promover a redução dos níveis de DQO e DBO da manipueira descartada no processo de produção de farinha ou fécula
20 de mandioca.

Citação das Figuras

As figuras em anexo servirão para proporcionar um
melhor entendimento dos objetivos e processo da presente invenção. Algumas delas se referem ao cultivo da microalga *Chlorella* sp., porém
25 deve ser entendido que o processo não é exclusivo nem limitado ao cultivo dessa microalga, podendo evidentemente ser utilizado para outros gêneros e espécies.

A Figura 1 ilustra um fluxograma mostrando as principais etapas de um processo típico de processamento de mandioca para a

produção de farinha e/ou fécula, e mostrando também em que etapas forma-se o resíduo manipueira.

A Figura 2 ilustra um fluxograma mostrando as principais etapas do processo de cultivo de *Chlorella sp.*, em manipueira, segundo a presente invenção, destacando a redução de DBO e DQO da manipueira, com ciclos de sobrenadante.

A Figura 3 ilustra um modelo esquemático dos fotobiorreatores do tipo coluna utilizados nos experimentos do processo da invenção. Nessa figura, representa-se: 1 – um banco de lâmpadas fluorescentes, 2 – cilindro de CO₂, 3 – linha de CO₂, 4 – bomba de ar, 5 – linha de ar, 6 – misturador de gases, 7 – linha de ar ou ar enriquecido com CO₂, 8 – fotobiorreator com meio de cultivo à base de manipueira, 9 – hipoclorito de sódio para tratamento de gases de exaustão.

A Figura 4 ilustra um modelo de estufa com suas respectivas dimensões com foto período utilizada nos experimentos com fotobiorreatores tubulares, segundo a presente invenção. Nessa figura, representa-se: 1 – reatores elétricos, 2 – temporizador e controlador digital, 3 – tomadas elétricas, 4 – bateria de lâmpadas fluorescentes.

A Figura 5 ilustra um arranjo dos fotobiorreatores nas prateleiras da estufa com fotoperíodo durante os experimentos para teste da manipueira com diferentes proporções ar/CO₂, segundo a presente invenção. Nessa figura, representa-se: 1 – um banco de lâmpadas fluorescentes, 2 – cilindro de CO₂, 3 – linha de CO₂, 4 – bomba de ar, 5 – linha de ar, 6 – misturador de gases, 7 – linha de ar ou ar enriquecido com CO₂, 8 – filtros e reguladores de vazão de gás, 9 – fotobiorreatores com meio de cultivo à base de manipueira.

A Figura 6 é um gráfico ilustrando a evolução do crescimento em termos de biomassa de *Chlorella sp.* produzida, em

cultivo de manipueira (0 a 80% de diluição) e sua comparação com o meio MBM.

Descrição Detalhada da Invenção

Estudos realizados pelo Depositante mostraram que a manipueira contém praticamente todos os elementos minerais, bem como inúmeros compostos orgânicos necessários ao crescimento de vários gêneros e espécies de microalgas.

Assim, o processo de produção de biomassa, proteínas e lipídios de microalgas, de acordo com a presente invenção, vantajosamente utiliza a manipueira, produzida como resíduos no processo de mandioca para a produção de derivados, notadamente, farinha e fécula de mandioca.

A manipueira utilizada nos estudos e experimentos do processo da presente invenção foi cedida pela Empresa Podium Alimentos – Comercial Agrícola Anhumai Ltda – Paranavaí- PR- Brasil, a qual denominaremos a seguir como "Manipueira-Podium". A **Tabela 2** apresenta a composição típica da "Manipueira-Podium".

Tabela 2 - Comparação da Manipueira - Podium.

DESCRIÇÃO	UNIDADE	MANIPUEIRA
DBO	mg/l	2.400
DQO	mg/l	6.180
pH		4,4
Fonte de Carbono	mg/l	Não realizada
Fonte de Nitrogênio	mg/l	N Kjeldahl - 143,08 Nitrato - 11,07
Fonte de Fósforo	mg/l	19,26
Fonte de Potássio	mg/l	1.463,39
Fonte de Sulfato	mg/l	nc
Fonte de Cálcio	mg/l	nc

DESCRIÇÃO	UNIDADE	MANIPUEIRA
Fonte de Magnésio	mg/l	nc
Fonte de Manganês	mg/l	nc
Fonte de Ferro	mg/l	nc
Fonte de Sódio	mg/l	nc
Fonte de Cloreto	mg/l	nc
Matéria Orgânica	mg/l	nc
Cianeto (quantitativo)	mg/l	61,91
Fonte de Zinco	mg/l	3,56

Fonte: Análise físico-química da água de lavagem da mandioca cedida pela empresa Podium Alimentos – Comercial Agrícola Anhumai Ltda. de Paranavaí e também realizada pelo CEPPA – UFPR, em agosto de 2007.

O processo segundo a presente invenção compreende a
 5 produção em larga escala de biomassa algal utilizando a manipueira proveniente do processamento da mandioca na fabricação de farinha e fécula.

A apresenta um fluxograma simplificado das operações unitárias mais importantes de uma indústria de processamento de
 10 mandioca para produção de farinha ou fécula. A manipueira gerada na prensagem da mandioca ralada ou na lavagem das fibras e da fécula é conduzida por bombeamento através de tubulações e/ou pelo uso da gravidade e/ou canaletas, ou ainda pelo emprego de caminhões cisterna, até planta de produção de microalgas.

15 Na unidade de produção de microalgas, ilustrada na Figura 2, a manipueira poderá ser transferida diretamente aos tanques de cultura ou então armazenada em recipientes adequados, de preferência vedados para evitar contaminação externa, podendo sofrer um pré-tratamento que tem função preservativa, de natureza
 20 física, química e/ou biológica.

Os estudos realizados pelo Depositante demonstraram que a manipueira, além de água, possui concentrações importantes de sais minerais, em especial potássio, fósforo, enxofre, cálcio, magnésio entre outros. Observou-se, igualmente, que os componentes orgânicos
5 tais como açúcares residuais, proteínas solúveis, etc., presentes na manipueira, tornam a mesma um excelente substrato para o cultivo de vários grupos (espécies) de algas.

Os rendimentos em termos de biomassa que foram obtidos são compatíveis aos meios clássicos descritos na literatura
10 internacional. Constatou-se, também, que a manipueira poderá ser utilizada no cultivo de algas para produção de biomassa protéica da maneira como é descartada pelas indústrias, podendo, caso necessário, ser diluída em água, acrescida ou não de outras substâncias químicas, tendo por finalidade ajustar seu pH e/ou complementar
15 determinados macronutrientes e/ou micronutrientes. Em determinados casos, a manipueira poderá ser filtrada e/ou clarificada utilizando-se carvão ativado, leito de areia com diferentes granulometrias, ou agentes flocculantes, dependendo da concentração de sólidos em suspensão nos diferentes tipos de manipueira. Observou-se, igualmente,
20 que a pasteurização e/ou esterilização da manipueira não proporciona diferença significativa na produção de biomassa, sendo, portanto, uma operação unitária dispensável, embora possa ser empregada quando se fizer necessário.

O inóculo para a produção de biomassa é propagado a
25 partir de cultivos em escala de laboratorial, passando por reatores em escala crescente de volume, até a formação de uma biomassa algal suficiente para início do cultivo em tanques de produção. Os tanques para a propagação dos inóculos poderão ser de diferentes formatos e/ou tamanhos, abertos ou fechados, aerados ou não, agitados ou

não, contínuos, semicontínuos ou descontínuos, alimentados ou não; horizontais ou verticais, do tipo raceway, de placas ou tubulares, ovais, circulares, retangulares, quadrados, etc.

A produção de microalgas em meio de cultivo a base de
manipueira, tal como preconizado na presente invenção, pode ser
5 realizada de acordo com o fluxograma ilustrado na Figura 2. Os cultivos
em ar aberto compreendem o uso de tanques naturais ou artificiais,
com volume que podem variar entre algumas dezenas de litros até
vários milhões de litros. Esses tanques ocupam grandes áreas, podendo
10 até mesmo atingir, em média, 10.000 m² no caso de um único tanque.
Não é recomendável utilizar tanques profundos, de um modo geral não
devem ultrapassar 0,5 m de coluna de água para não dificultar a
penetração da luz, o que reduz o processo da fotossíntese. Os tanques
utilizados na produção de algas a partir da manipueira poderão ser
15 horizontais ou verticais, do tipo raceway, de placas ou tubulares, ovais,
circulares, retangulares ou quadrados, contínuos, semicontínuos ou
descontínuos, alimentados ou não, agitados ou não. Quando utilizado,
o sistema mais comum de agitação emprega pás, que são agitadas
mecanicamente e são distribuídas em espaços regulares por toda a
20 superfície do tanque, ou então localizadas nas extremidades ou no
centro do tanque.

Concomitantemente com a agitação por pás, pode se
efetuar injeção de ar, comprimido ou não. Esse ar poderá ser filtrado ou
não. Os reatores poderão ser fechados, através do uso de uma
25 cobertura removível, porém, por questões óbvias, essa cobertura
deverá ser construída de um material transparente ou translúcido à luz,
natural ou artificial.

A separação ou colheita da biomassa algal produzida
poderá ser realizada de maneira contínua, semicontínua ou

descontínua, manual ou mecânica, floculada ou não, utilizando centrifugas, filtros, filtros prensa, peneiras, decantadores ou ciclones. A biomassa poderá ser extrusada ou não, seca naturalmente ou em secadores de leito fixo ou móvel, ou por atomização (spray-drier) ou tambor rotatório.

A produção de proteínas e lipídios de microalgas a partir de manipueira, de acordo com a presente invenção, compreende as seguintes etapas básicas (Figura 2):

- (i) adequação da manipueira por adição de água e álcali até que se atinja um valor de pH em torno de 6,0 -11,0;
- (ii) transferência da manipueira pré-ajustada para um tanque de inoculação;
- (iii) adição de microalga ao tanque de inoculação até que se atinja uma concentração em torno de 0,2g/L de biomassa inicial no meio de cultivo a base de manipueira;
- (iv) transferência da manipueira inoculada para um tanque de cultivo de biomassa algal;
- (v) injeção de ar contendo de 0,03-100% de dióxido de carbono ao tanque de cultivo de biomassa algal;
- (vi) manutenção da biomassa algal a uma temperatura média entre 25-35°C, sob intensidade luminosa natural;
- (vii) transferência da biomassa algal para uma unidade de separação, onde será gerada uma fração de biomassa algal e uma fração de sobrenadante aquoso;
- (viii) reciclagem da fração de sobrenadante aquoso para o tanque de inoculação.

Opcionalmente, o processo inclui uma etapa (ix) de repetição das etapas (iii)-(viii) até que se atinja um valor de DQO na ordem de 15 mg/L O₂ e uma DBO menor que aproximadamente 5 mg/L

O₂ na fração de sobrenadante aquoso produzido na etapa (vii). Ainda, opcionalmente, o processo pode incluir três ou mais ciclos de processamento de uma mesma carga de manipueira.

Conforme acima descrito, no processo da presente invenção, o primeiro sobrenadante gerado na etapa (vii) é inoculado para servir como substrato para um segundo ciclo de produção de biomassa algal, permitindo assim o estabelecimento de um procedimento otimizado de cultivo para a microalga, com integral aproveitamento de toda a matéria orgânica e inorgânica presente na manipueira. O tempo de cultivo algal no tanque é normalmente de cerca de 10-15 dias, porém tempos maiores ou menores poderão ser empregados, dependendo das condições de processo, da origem e qualidade da manipueira, da microalga e outros fatores.

Após o cultivo e a primeira separação de biomassa (primeiro ciclo), o sobrenadante geralmente apresenta um pH próximo ao inicial, não havendo necessidade de sua correção, pois ainda está na faixa ideal para o cultivo de microalga. Os sobrenadantes aquosos recirculados podem também ser misturados com manipueira pura nos diferentes estágios, como forma de enriquecer em termos de compostos orgânicos e minerais antes da inoculação com biomassa ativa de microalga para a condução de um novo ciclo ou batelada.

Vantajosamente, o fluxo de ar de alimentação do tanque de cultivo de biomassa algal é enriquecido com cerca de 0,5-15% de CO₂, o qual pode ser de alta pureza, de cilindros de gás comprimido, ou mesmo proveniente de processos industriais de fermentação ou combustão, sem ou com a presença de outros gases como N₂ e O₂. Um percentual de dióxido de carbono preferido na presente invenção é de cerca de 0,04%.

Mais vantajosamente, ainda, à medida que se completa cada ciclo e após a remoção da biomassa algal, os sobrenadantes aquosos são novamente re-inoculados com biomassa ativa de microalga de forma que a concentração inicial nos tanques de biomassa algal se situe na ordem de 0,2 g/L de biomassa no meio de cultivo a base de manipueira. Da mesma forma, prefere-se que a intensidade luminosa nos tanques de biomassa algal esteja na ordem de 0,02 a 2 mmol fótons.m⁻².s⁻¹, 12/12h dia.

Além de não passar por processos de esterilização, a reciclagem do sobrenadante aquoso garante o êxito econômico e ambiental do processo segundo a presente invenção, pois propicia um aproveitamento integral dos elementos orgânicos e inorgânicos presentes na manipueira para produção de biomassa algal.

Ademais, obtém-se o tratamento biológico da manipueira utilizando as microalgas, com conseqüente redução das altas taxas de DQO e DBO presentes nesse rejeito das indústrias de processamento de mandioca. Esse tratamento biológico revela-se mais significativo após a realização de três ou mais ciclos de processamento de uma mesma carga de manipueira, de acordo com o processo da presente invenção.

O processo segundo a presente invenção contribui, igualmente, com a legislação ambiental vigente, pois se trata de uma tecnologia ecologicamente correta e sustentável, e tem como produto final uma biomassa algal rica em proteínas e lipídios, além de promover a liberação de oxigênio ao meio ambiente. Desta forma, o processo da presente invenção é extremamente importante em termos de redução do impacto ambiental gerado pelas indústrias de processamento de mandioca.

Estudos em laboratório mostraram que concentrações moderadas de manipueira permitem melhor crescimento da biomassa, de forma que com a cultura em ciclos, a produção máxima de biomassa é limitada no primeiro ciclo, aumenta nos dois ciclos seguintes e decai no quarto ciclo. Isto ocorre em função de que ao mesmo tempo em que o efeito inibidor das altas concentrações de manipueira vai diminuindo ao longo dos ciclos, também os micronutrientes e macronutrientes presentes no sobrenadante reciclado vão se exaurindo na medida em que a biomassa algal vai sendo produzida. Assim, para se manter os ciclos com taxas equivalentes de produtividade em termos de biomassa algal, se faz necessário suplementar o sobrenadante com uma fração de manipueira fresca para compensar a quantidade de micronutrientes e macronutrientes perdidos nos ciclos anteriores. Porém, nos casos em que o principal objetivo seja se obter uma redução da carga poluente da manipueira, tais reposições podem ser dispensadas.

Para avaliação do crescimento algal nas diferentes condições experimentais estudadas foram recolhidas amostras (em duplicata) a cada dois dias para análise por peso seco. A biomassa foi filtrada à vácuo em papel filtro de 0,45 μm e em seguida lavada com água destilada e seca por 24 horas em estufa a 100°C. Os dados encontram-se compilados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 – Biomassa algal produzida nos diferentes ciclos de reutilização dos sobrenadantes da manipueira.

Tempo de Cultivo (dias)	Condição Sobrenadante	X (g/L) Ar + 10% CO ₂
0	Início	0,200
10	1º Ciclo	1,370
20	2º Ciclo	1,843
30	3º Ciclo	2,712

Tempo de Cultivo (dias)	Condição Sobrenadante	X (g/L) Ar + 10% CO₂
40	4º Ciclo	1,521

Constata-se, na tabela acima, que no passar dos ciclos, os micronutrientes e macronutrientes são consumidos. Observou-se também uma redução nos valores de DQO e DBO após o primeiro e o segundo ciclo de cultivo, chegando a taxas muito próximas de zero após conclusão do quarto ciclo, conforme ilustrado na Tabela 4 a seguir. As análises de DBO e DQO foram realizadas segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. 1998, Hach Company e WTW.

10 **Tabela 4 – Redução dos níveis de DQO e DBO ao longo dos ciclos de reciclagem dos sobrenadantes de manipueira.**

Condição	Tempo (dias)	DQO (mg/L O₂)	DBO (mg/L O₂)
Início	0	6250	2400
1º Ciclo	10	4115	1290
2º Ciclo	20	905	351
3º Ciclo	30	97	31
4º Ciclo	40	15	<5

A presente invenção será adicionalmente descrita por meio dos Exemplos a seguir que, de uma forma não limitativa de seu escopo, representa uma realização preferida.

Microalga *Chlorella minutissima* DEB&B 013

15 A *Chlorella minutissima* DEB&B 013, selecionada a partir do Banco de Culturas da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, foi a microalga contemplada para os estudos específicos do processo da presente invenção, embora outras microalgas, sozinhas ou em suas misturas, possam ser igualmente
20 empregadas para a produção de biomassa, proteínas e lipídios a partir

da manipueira produzida em indústrias de processamento de mandioca.

A *Chlorella minutissima* DEB&B 013 apresenta crescimento elevado em faixas de temperaturas variando de 15 a 45°C, em pH ligeiramente alcalino. Essas características fisiológicas da *Chlorella minutissima* DEB&B 013 propiciam grande potencial para o seu cultivo em manipueira, pois esse resíduo, quando descartado nas farinheiras e fecularias, apresenta altas cargas orgânicas e de sais minerais.

Além disso, as faixas de temperaturas consideradas ótimas para o cultivo de *Chlorella minutissima* DEB&B 013 são próximas às médias de temperaturas das regiões, no Brasil, onde é cultivada a mandioca, justamente onde se encontram instaladas as indústrias de processamento. Com isso, praticamente elimina-se a necessidade de aquecimento dos tanques de produção algal, também chamados de fotobiorreatores.

A *Chlorella*, assim como outras microalgas, necessita além de uma fonte de carbono, também de uma fonte de nitrogênio, fósforo e outros micronutrientes. Embora a *Chlorella* possa crescer fotoautotroficamente, a captação de CO₂ do ar depende do pH do meio de cultivo. Quanto maior o pH do meio, mais facilmente o CO₂ da atmosfera migra para seu interior e se converte em CO₃²⁻. Porém, em pH acima de 11, não ocorre bom crescimento de *Chlorella*, provavelmente devido ao efeito da grande alcalinidade sobre os processos metabólicos. O gás carbônico presente na atmosfera dissolve-se no meio de cultivo, fazendo parte do equilíbrio:



De forma a suprir carbono extra para processos autotróficos, muitos dos meios de cultivo de microalgas apresentam em sua composição carbonatos e bicarbonatos, capazes de fornecer os

íons CO_3^{2-} e HCO_3^- . Em alguns meios é feita a suplementação de carbono com acetato ou monossacarídeos como glicose.

Na produção de microalgas, os maiores impactos em termos financeiros são, primeiramente, mão de obra e a seguir são os custos com os meios de cultivo. Assim, as possibilidades de reduzir os custos dos meios de cultivo de microalgas são significativamente desejáveis. A **Tabela 5** ilustra a quantidade de sais, em gramas, necessária para a produção de 1000L de meios MBM (Meio Bristol Modificado) e MC (Meio Chlorella), ambos meios típicos para cultivo de microalgas.

Tabela 5 - Comparação dos Meios MBM, MC e Manipueira.

DESCRIÇÃO	MBM (média)	MC (média)
DBO	Nc	Nc
DQO	Nc	Nc
pH	6,5 – 7,5	6,5 – 7,5
Fonte de Nitrogênio	0,25	0,25
Fonte de Fósforo	0,25	0,175
Fonte de Potássio	0,25	0,425
Fonte de Sulfato	0,396	0,396
Fonte de Cálcio	0,01	Nc
Fonte de Magnésio	0,075	0,075
Fonte de Manganês	1,81	1,81
Fonte de Ferro	0,02	0,02
Fonte de Sódio	0,025	Nc
Fonte de Cloreto	1,845	1,81
Fonte de Zinco	0,222	0,222

Fonte: WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. J. Gen. Appl. Microbiol. 6, p.1 - 4. 1960.

Exemplo 1: Adaptação da microalga à manipueira

Estudos prévios de adaptação da *Chlorella minutissima* DEB&B 013 em misturas crescentes (5,10, 20, 40, 60, 80, 100%) de manipueira ao meio de cultura MBM foram avaliadas. Esse mesmo procedimento poderá ser aplicado caso se justifique para outros

5 gêneros e/ou espécies de microalgas quando cultivadas em manipueira, inclusive pelo emprego de outros meios que não o MBM, porém mais específicos para cada grupo algal. Essa adaptação foi realizada em provetas de 2L, contendo 1500 mL de meio ou em outro sistema semelhante de cultivo. Sendo que o meio contendo 5%

10 manipueira + 95 % meio MBM foi utilizado para inocular o meio contendo 10% manipueira, e assim sucessivamente, até o cultivo final em manipueira pura da cultura previamente adaptada.

Os frascos foram transferidos para uma sala climatizada de 3,5 m X 2,5 m X 2,5m, com temperatura controlada na faixa de 30 °C

15 (± 2 °C), através de uso de um condicionador de ar split, Marca Cònsul Ambiente (12.000 BTU/h). Nessa sala foram instaladas duas estufas com fotoperíodos para controle de tempo ciclomático digital marca Full Gauge modelo PROGS I com alimentação direta de 220 VCA, contendo doze lâmpadas fluorescentes 20 Watts luz do dia, com dois

20 reatores eletrônicos e uma tomada auxiliar de quatro pontos por prateleira, sistema de funcionamento automático e manual e estrutura em aço revestido em fórmica branca para melhorar a iluminação, conforme ilustrado na Figura 5. A iluminância dos fotobiorreatores foi de 1.500 Lux fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, por

25 um período de 12 horas, alternados com 12 horas de ambiente escuro. O tempo de cultura foi de 14 dias para todos os experimentos.

Cada estufa possui três prateleiras com fotoperíodo comportando, cada uma, seis fotobiorreatores. O arranjo desses fotobiorreatores está representado esquematicamente na Figura 5.

O volume das culturas foi mantido constante pela reposição diária de água destilada para compensar as perdas por evaporação.

Os cultivos foram aerados com ar comprimido, a uma vazão de 1800NmL/min, e incubados por um período de 15 dias, nos quais foram mantidos constantes os seguintes parâmetros preferenciais: temperatura 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), aeração de 1800NmL/min, 1500 Lux de intensidade de irradiação luminosa por períodos de 12 horas alternados com 12 horas no escuro. A intensidade de luz no interior da incubadora foi avaliada diariamente, neste caso utilizando luxímetro digital Minipa MLM 101. Para acompanhamento do crescimento algal foram tiradas amostras a cada dois dias para análise por peso seco. A biomassa algal formada após 15 dias de cultura foi filtrada a vácuo em papel filtro Milipore com 0.45 μm de porosidade, seguida de lavagem com água destilada e secagem por 24 horas em estufa a 100°C. Os resultados contidos na Tabela 6 a seguir representa a média de 3 determinações para cada uma das condições estudadas.

Tabela 6 – Adaptação de *Chlorella minutissima* DEB&B 013 em diferentes concentrações de manipueira

Meio MBM (%)	Manipueira (%)	Biomassa Algal Inicial (g/L)	Biomassa Algal Final (g/L)	Δ Biomassa Algal (g/L)
100	0	0,225	1,905	1,680
95	5	0,211	2,780	2,569
80	20	0,199	2,162	1,963
60	40	0,139	1,390	1,251
40	60	0,128	1,467	1,339
20	80	0,284	1,523	1,239
0	100	0,117	1,340	1,223

Esse processo de adaptação prévia das microalgas à manipueira possibilita obtenção de resultados mais expressivos em termos de produtividade média diária de biomassa (da ordem de 0,2 g.L⁻¹.dia⁻¹) quando comparado com um processo no qual a microalga não passa por essa adaptação prévia (produtividade da ordem de 0,7 g.L⁻¹.dia⁻¹).

A Tabela 7 mostra que no cultivo de *Chlorella minutissima* em manipueira houve produção significativa de proteínas e lipídios:

Tabela 7 - Teor de lipídios e de proteínas no final do cultivo do Tratamento I.

% manipueira	Teor de proteínas	Teor de lipídios
0% (100% MEIO SINTÉTICO)	48,1	8,68
20	46,3	8,72
40	41,5	8,41
60	39	8,74
80	39,5	8,62
100	38	8,91

Exemplo 2: Adaptação da microalga à manipueira com variação da taxa de inoculação

Embora haja crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em manipueira concentrada e até mesmo pura, pode ser vantajoso realizar preparações diluídas da manipueira para cultivo, no qual a produção de biomassa e a produtividade são mais altas, em um único ciclo. Os resultados a seguir (**Tabela 8**) mostram como se pode definir a taxa de inoculação adequada para o cultivo de *Chlorella minutissima*:

Tabela 8 – Produção e composição da biomassa de *Chlorella minutissima* com diferentes taxas de inoculação em manipueira diluída com meio MBM

% manipueira	% inóculo	Biomassa máxima, g/L	% proteínas	% lipídios
5	5	1,950	39	9,32
5	10	2,042	35	8,42
5	20	2,790	29	7,59
10	5	1,845	41	9,45
10	10	1,985	43	6,58
10	20	1,687	44	6,70
20	5	1,796	38	6,54
20	10	2,536	36	5,87
20	20	2,211	40	6,24

Exemplo 3: Adaptação da microalga à manipueira diluída com água

É possível e vantajoso produzir biomassa de *Chlorella* em meio diluído com água, de forma que não seja necessário adicionar sais ao meio de cultivo. Os resultados a seguir (**Tabela 9**) mostram como se pode cultivar a *Chlorella minutissima* em manipueira diluída com água, apenas:

Tabela 9 – Produção e composição da biomassa de *Chlorella minutissima* com diferentes taxas de inoculação em manipueira diluída com água

% manipueira	% inóculo	Biomassa máxima, g/L	% proteínas	% lipídios
5	5	1,447	37,83	7,4
5	10	2,111	36,15	6,9
5	20	1,802	39,9	7,2
10	5	1,435	41,2	8,3
10	10	2,167	35,6	6,54
10	20	2,538	54,8	7,21
20	5	2,192	55	7,51
20	10	1,804	54,9	6,84

% manipueira	% inóculo	Biomassa máxima, g/L	% proteínas	% lipídios
20	20	2,302	54,3	6,67

Para a manipueira diluída a 20%, a DBO e a DQO residuais foram de 1200 e de 3416, uma redução de 91% para a DBO e de 80% para a DQO, um eficiente tratamento do efluente.

Exemplo 4: Cultivo da microalga *Chlorella minutissima* em manipueira diluída, com adição de gás carbônico a 10%

5

Embora haja crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meios de cultivo sem a adição de CO₂, pode ser vantajoso adicionar ao cultivo gás carbônico extra, proveniente de cilindros em forma purificada, ou proveniente de processos industriais como fermentação ou queima. Quando *Chlorella minutissima* é cultivada em manipueira a 20%, com a adição de 10% de CO₂ ao ar que é adicionado a 1vvm, a produção e composição da biomassa obtida após 15 dias é a ilustrada na **Tabela 10**:

10

Tabela 10 – Produção e composição da biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada em manipueira diluída a 20%, com adição de 10% de CO₂

15

Parâmetro	Unidade	Valor
Biomassa final	g/L	3,1
Proteínas	%	42,9
Lipídios	%	8,2
Carotenóides	mg/g de biomassa	6,9

Como se pode observar, a microalga pode ser favoravelmente cultivada aproveitando CO₂ como co-substrato, junto à manipueira.

20

Exemplo 5: Cultivo da microalga *Chlorella minutissima* para produção de lipídios visando transformação em biodiesel

É possível controlar as condições de cultivo da microalga *Chlorella minutíssima* de forma a garantir o acúmulo de lipídios que podem ser extraídos e transesterificados. No presente Exemplo, 100L de manipueira diluída a 20% foram cultivados por 10 dias, ao final dos quais o meio foi diluído até que a concentração fosse $\frac{1}{4}$ da concentração após 10 dias, e incubado por mais 5 dias sob aeração e iluminação padrão. Após o cultivo, o meio foi filtrado, rendendo 1,12kg de biomassa com 11% de lipídios. Essa biomassa foi seca em estufa a 80°C por 24h, e extraída com 10L de n-hexano em um reator. Após evaporação do n-hexano, obteve-se 105g de uma fração lipídica que foi esterificada em refluxo com 104g de etanol previamente tratado com 4g de sódio. Após 1h de refluxo, a mistura foi resfriada e decantada, separando-se a fase superior, que foi lavada e destilada, fornecendo 95g de biodiesel. Esse biodiesel teve o seu perfil de ésteres graxos determinado, por cromatografia gasosa, e é apresentada na **Tabela 11**:

Tabela 11 – Perfil de ésteres etílicos obtido em cultura de *Chlorella minutíssima* cultivada em manipueira a 20%

Ácido graxo correspondente	Porcentagem
C14:0	2,352
C16:0	6,63
C16:1	1,375
C17:1	0
C18:1 trans-	0,459
C18:1 cis-	9,456
C18:2 trans-	2,365
C18:2 cis-	14,388
C18:3 gama	17,655
C18:3	1,5805

Ácido graxo correspondente	Porcentagem
C20:0	3,645
C20:1	0,76
C22:0	3,136
C20:5	2,8785
C24:0	1,1155

Como se pode observar, há cerca de 49% de ácidos graxos insaturados, que são importantes por terem ponto de ebulição inferior aos saturados. Além disso, caso o óleo seja usado como alimento (e não esterificado em biodiesel) em termos de valor nutricional, 39% dos ácidos são poliinsaturados, o que é benéfico comparado a gorduras saturadas.

Exemplo 6: Cultivo da microalga *Spirulina platensis* para produção de proteínas e ficocianina

Em outro exemplo de aplicação, a microalga *Spirulina platensis* foi cultivada em manipueira a 20%, com pH inicial ajustado a 11 com NaOH, com concentração inicial de células de 0,1g/L e aeração de 1VVM por 15 dias. Após o cultivo, foram obtidos 2,6g/L de biomassa com a composição listada a seguir (**Tabela 12**):

Tabela 12– Produção e composição da biomassa de *Spirulina platensis* cultivada em manipueira diluída a 20%

Parâmetro	Unidade	Valor
Biomassa final	g/L	2,58
Proteínas	%	55,3
Lipídios	%	8,6
Carboidratos	%	22,0
Ficocianina	mg/g de biomassa	23,0

Verifica-se que há bom crescimento da microalga, com importante produção do pigmento C-ficocianina.

Exemplo 7: Cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* para produção de astaxantina

5 Em outro exemplo de aplicação, a microalga *Haematococcus pluvialis* foi cultivada em manipueira a 20%, com pH inicial ajustado a 8 com NaOH, com concentração inicial de células de 0,1g/L e aeração de 1VVM por 15 dias. Após esse período, foi induzida a carotenogênese por mais 5 dias, obtendo-se 1,4g/L de biomassa com a
10 composição listada a seguir (Tabela 13):

Tabela 13– Produção e composição da biomassa de *Spirulina platensis* cultivada em manipueira diluída a 20%

Parâmetro	Unidade	Valor
Biomassa final	g/L	1,4
Proteínas	%	24
Lipídios	%	12
Carboidratos	%	40
Astaxantina	mg/g de biomassa	25

15 Verifica-se que há bom crescimento da microalga, com importante produção do pigmento antioxidante astaxantina.

Ressalta-se, ainda que os técnicos no assunto reconhecerão que valores superiores e/ou inferiores a esses poderão ser obtidos quando a *Chlorella minutissima* DEB&B 013 e/ou outros gêneros e/ou espécies de microalgas forem cultivadas em níveis diferentes de
20 CO₂ ou com a aditivação da manipueira por sais e outras substâncias não testados nesses Exemplos. Igualmente, ocorre com o meio de produção de biomassa algal, ou seja, os resultados obtidos foram para a amostra de "Manipueira-Podium" e, evidentemente, resultados

superiores e/ou inferiores aos apresentados nos Exemplos poderão ser alcançados, na medida em que forem utilizadas novas amostras de manipueira procedentes de diferentes unidades de processamento de mandioca localizadas em diferentes regiões, variedades diferentes de
5 mandioca, assim como pelo emprego de diferentes modelos de reatores e escala de cultivo, se de produção laboratorial, de bancada, piloto ou industrial.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produção de biomassa, proteínas e lipídeos a partir de microalgas, **caracterizado por** compreender o uso de manipueira como substrato de crescimento durante a fase de cultivo da microalga.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que os cultivos de microalgas podem ser aerados.
3. Processo, de acordo com as reivindicações 1 e 4, **caracterizado pelo** fato de que o ar pode ser substituído por CO₂.
4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da microalga empregada no dito processo ser selecionada preferencialmente de um dos gêneros *Chlorella*, *Spirulina* e *Haematococcus*.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de compreender as seguintes etapas:
 - i. Adequação da manipueira por adição de água e álcali até que se atinja um valor de pH entre 6,0 e 11,0;
 - ii. Transferência da manipueira pré-ajustada para um tanque de inoculação;
 - iii. Adição de microalga ao tanque de inoculação até que se atinja uma concentração em torno de 0,2 g/L de biomassa inicial no meio de cultivo a base de manipueira;
 - iv. Transferência de ar contendo dióxido de carbono de alta pureza ao tanque de cultivo de biomassa algal;
 - v. Manutenção da biomassa algal a uma temperatura entre 15 e 45° C, sob intensidade luminosa natural;

- vi. Transferência da biomassa algal para uma unidade de separação, onde será gerada uma fração de biomassa algal e uma fração de sobrenadante aquoso;
- vii. Reciclagem da fração de sobrenadante aquoso para o tanque de inoculação;

6. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que na etapa (v) o percentual de dióxido de carbono no fluxo de ar variar de 0,5 a 15%.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que a adição de água na etapa (i) é realizada em proporção da ordem de 80% (v/v).

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que após ser completado cada ciclo, e após a remoção da biomassa algal, os sobrenadantes serem novamente re-inoculados com biomassa ativa de microalga de forma que a concentração inicial nos tanques de biomassa algal se situe em torno de 0,2 g/L no meio de cultivo a base de manipueira.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que a manipueira seja mantida em pH na orde dem 6,0 a 11,0 e diluída com uma quantidade de água em torno de 5 a 95% (v/v) durante cada um dos ciclos.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que a intensidade luminosa nos tanques de produção de biomassa algal esteja na ordem de 0,02 a 2 mmol fótons.m⁻².s⁻¹, 12/12 horas por dia.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** fato de que o período de iluminação nos tanques de produção de biomassa algal seja de 24 horas, com iluminação durante 30 a 100% desse período.

12. Processo, de acordo com as reivindicações 7 a 13, **caracterizado pelo** fato de compreender as seguintes etapas:

- i. Adequação da manipueira por adição de água e álcali até que se atinja um valor de pH em torno de 6,0 a 11,0;
- ii. Transferência da manipueira pré-ajustada para um tanque de inoculação;
- iii. Adição de microalga ao tanque de inoculação até que se atinja uma concentração em torno de 0,2 g/L de biomassa inicial no meio de cultivo a base de manipueira;
- iv. Transferência da manipueira inoculada para um tanque de cultivo de biomassa algal;
- v. Injeção de ar contendo dióxido de carbono de alta pureza ao tanque de cultivo de biomassa algal;
- vi. Manutenção da biomassa algal a uma temperatura média entre 15 e 45 °C, sob intensidade luminosa natural;
- vii. Transferência da biomassa algal para uma unidade de separação, onde será gerada uma fração de biomassa algal e uma fração de sobrenadante aquoso;
- viii. Reciclagem da fração de sobrenadante aquoso para o tanque de inoculação; e
- ix. Uma etapa opcional que consiste na repetição das etapas (iii) a (viii) até que se atinja um valor de DQO (Demanda Química de Oxigênio) na ordem de 15 mg/L O₂ e uma DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) menos que aproximadamente 5 mg/L de O₂ na fração de sobrenadante aquoso produzido na etapa (vii).

13. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de compreender pelo menos três ciclos de processamento de uma mesma carga de manipueira.

14. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 7 e 14, **caracterizado pelo** fato de que a biomassa de microalga obtida pelo dito processo ser empregado para uso como alimento, ou na produção de proteínas, ou na produção de lipídeos, ou na produção de carotenóides, ou na produção de astaxantina, ou na produção de biodiesel, ou na produção de óleo combustível.

Figura 1

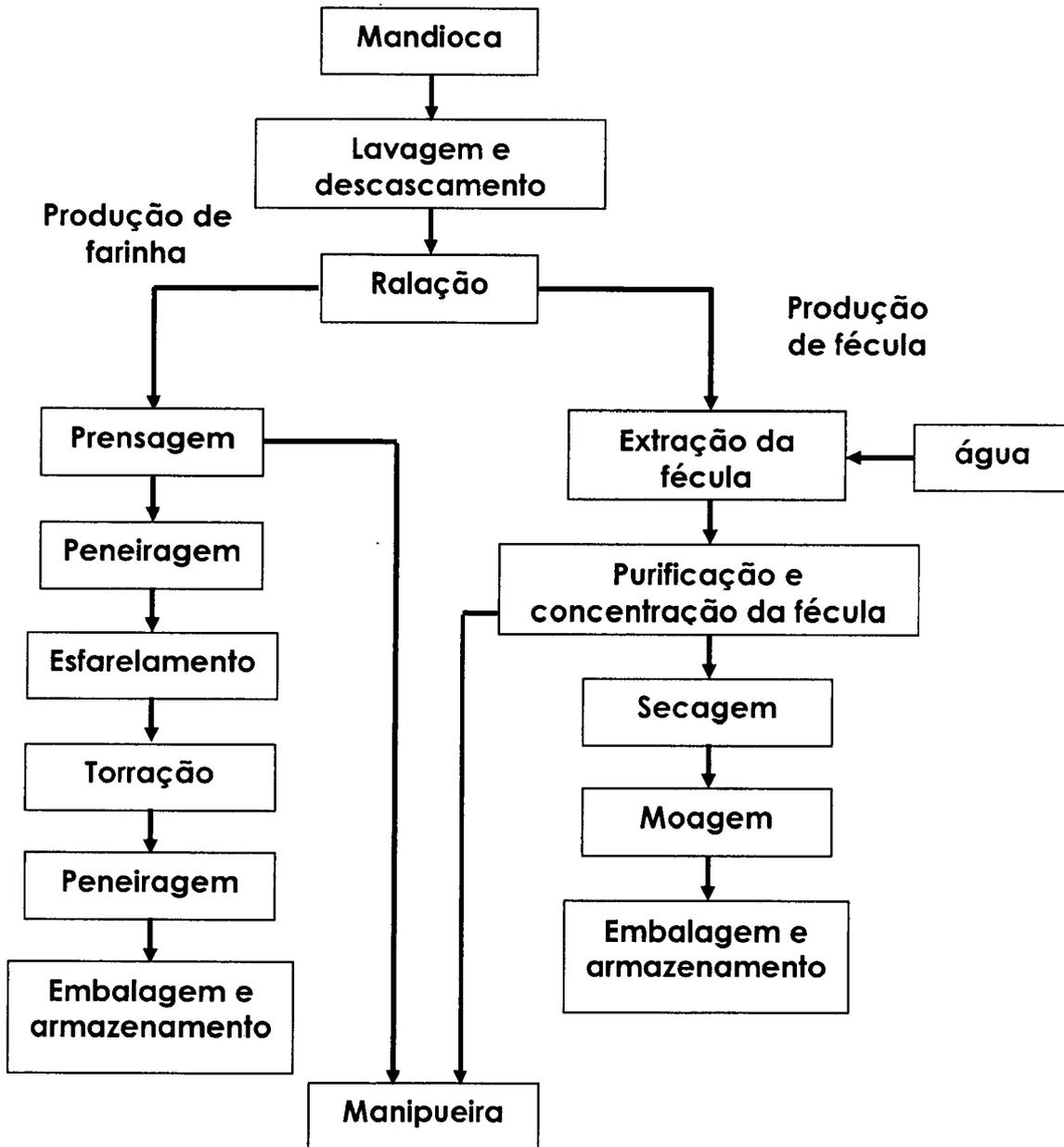


Figura 2

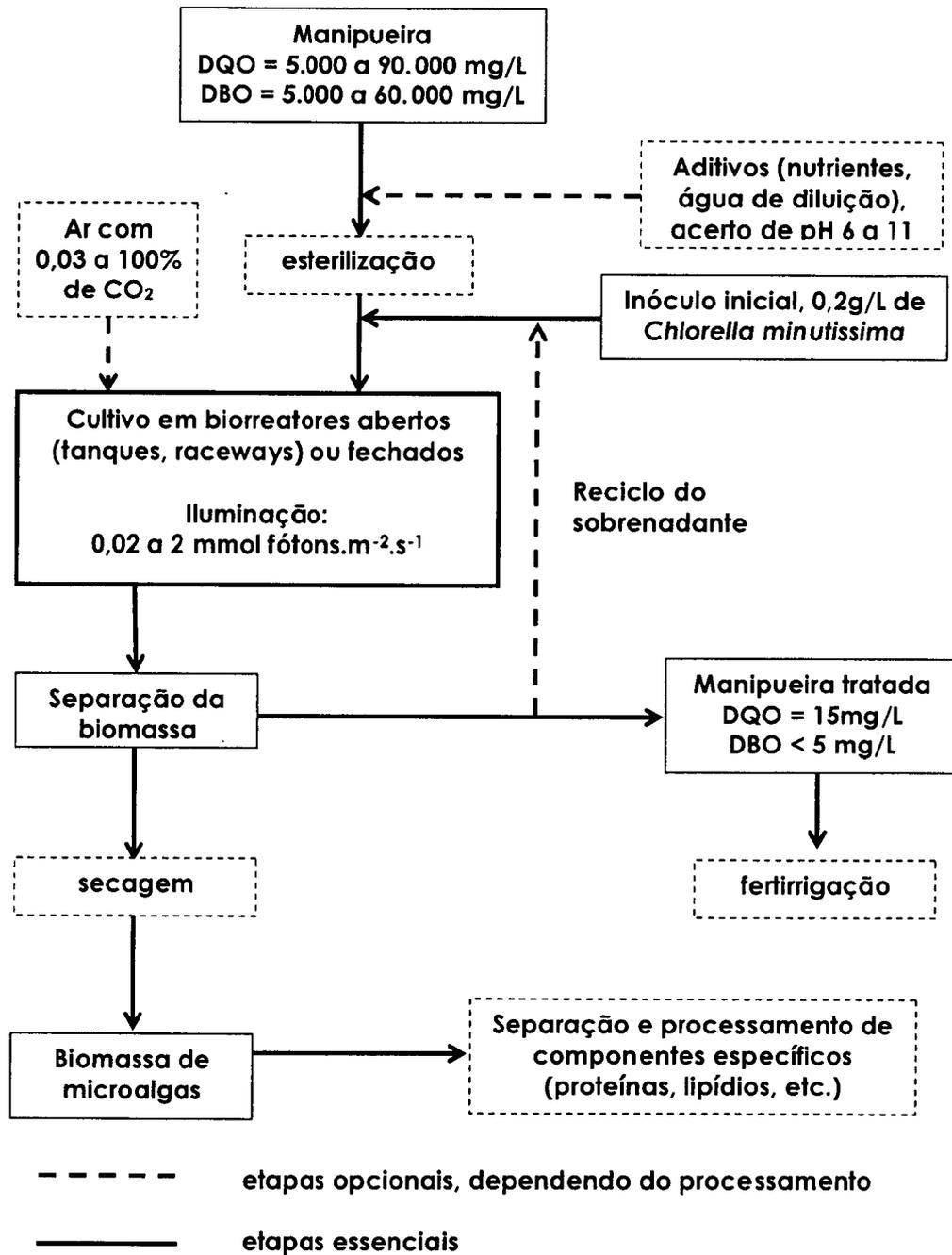


Figura 3

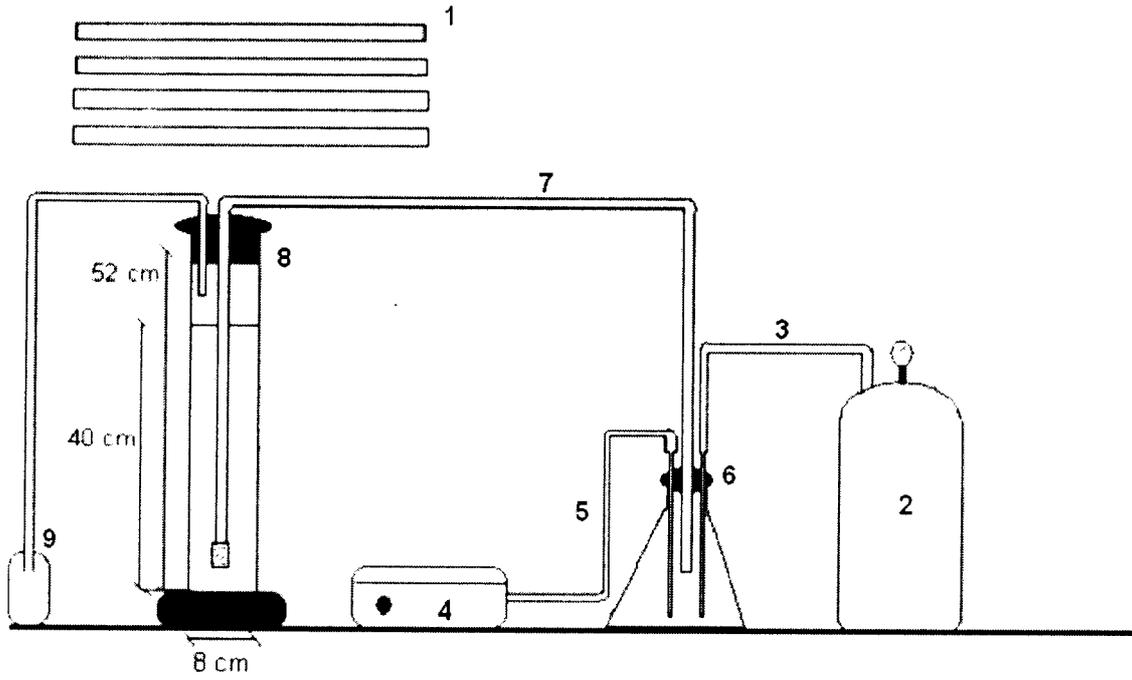


Figura 4

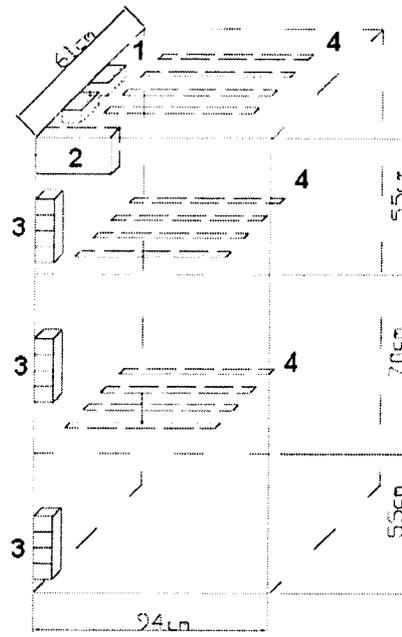


Figura 5

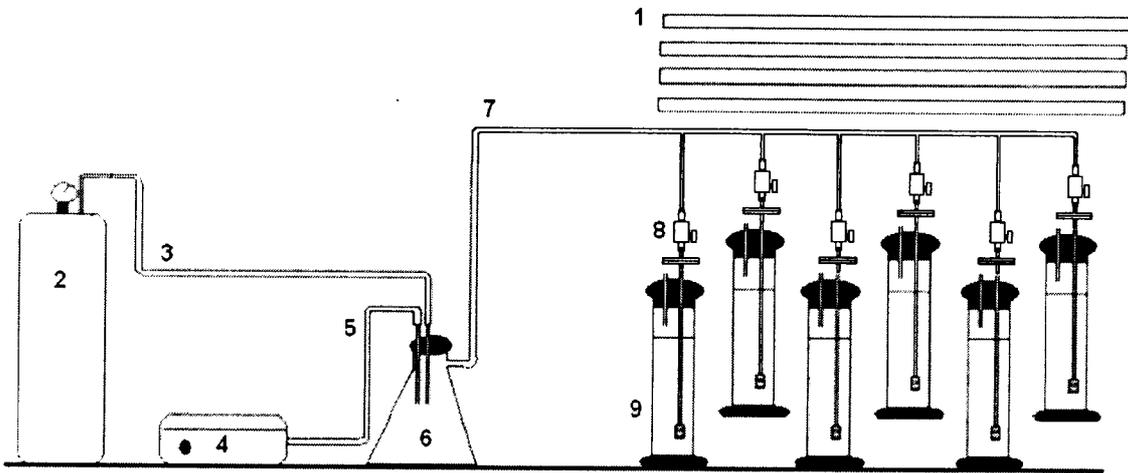


Figura 6