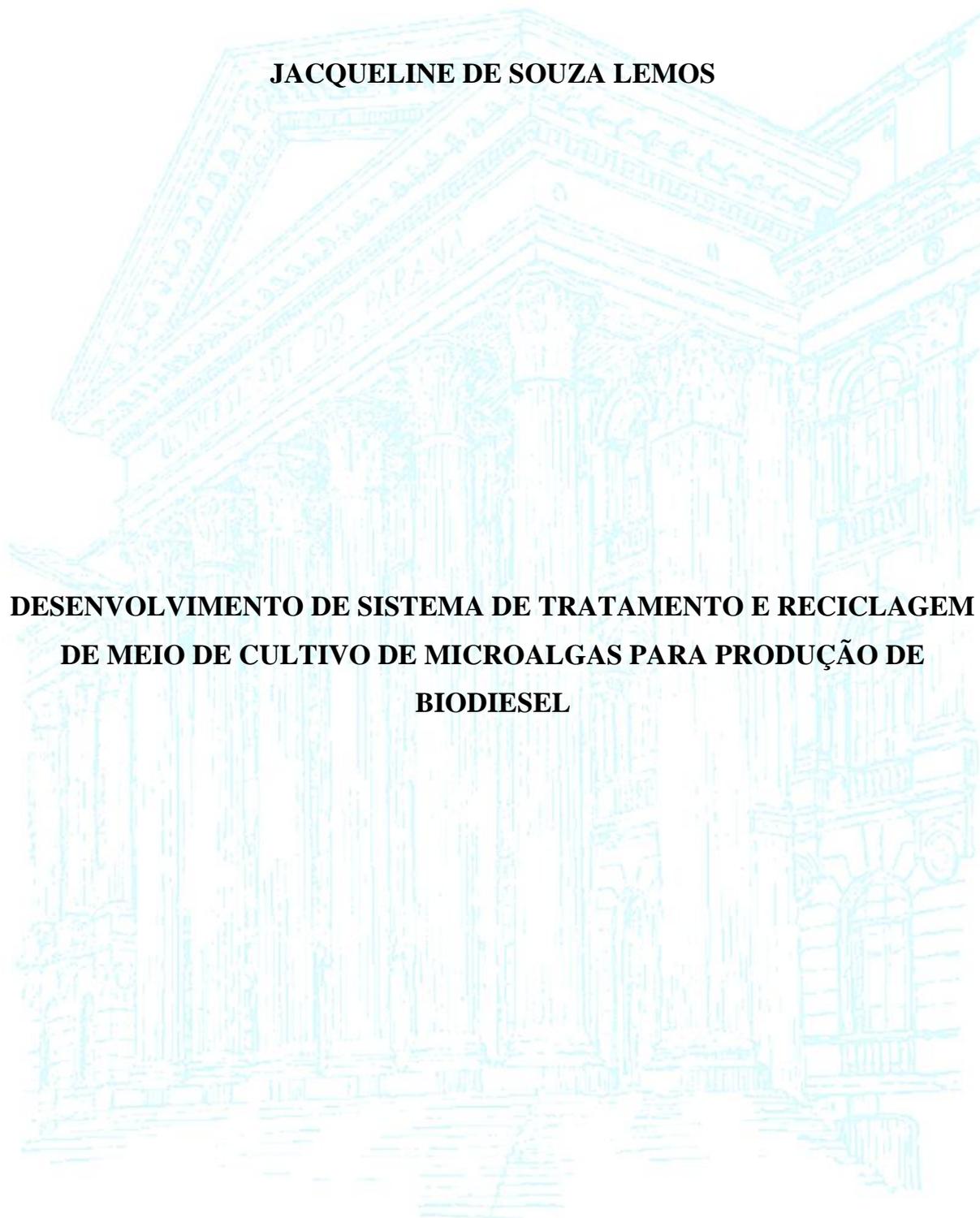


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JACQUELINE DE SOUZA LEMOS



**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE TRATAMENTO E RECICLAGEM
DE MEIO DE CULTIVO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE
BIODIESEL**

CURITIBA

2012

JACQUELINE DE SOUZA LEMOS

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE TRATAMENTO E RECICLAGEM
DE MEIO DE CULTIVO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE
BIODIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências dos Materiais.

Orientador: José Viriato Coelho Vargas
Co-orientador: André Bellin Mariano

CURITIBA

2012

Lemos, Jacqueline de Souza

Desenvolvimento de sistema de tratamento e reciclagem de meio de cultivo de microalgas para produção de biodiesel / Jacqueline de Souza Lemos. - Curitiba, 2012.

83 f. : il.; graf., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais – PIPE.

Orientador: José Viriato Coelho Vargas

Coorientador: André Bellin Mariano

1. Microalga. 2. Biodiesel. 3. Lipídios. I. Vargas, José Viriato Coelho. II. Mariano, André Bellin. III. Título.

CDD 662.88



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais – PIPE
Setor de Tecnologia

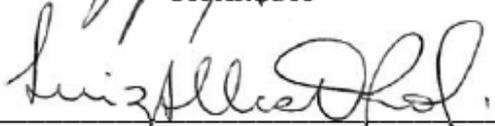
RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos 28 dias do mês de agosto de 2012, no Salão Nobre – no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pelo Prof. Dr. Dante Homero Mosca Jr., coordenador do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, a Banca Examinadora para a ducentésima trigesima defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais. Estiveram presentes no ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, foi constituída pelos professores doutores: José Viriato Coelho Vargas (UFPR), Cláudia E. Bruno Marino (UFPR), Luiz Alberto de Oliveira Rocha (UFRGS). Às 14:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **JACQUELINE DE SOUZA LEMOS** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada “**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE TRATAMENTO E RECICLAGEM DE MEIO DE CULTIVO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela APROVAÇÃO do candidato, (de acordo com a determinação dos artigos 68 e 69 da resolução 65/09 de 09.11.2009).

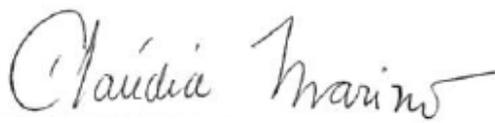
Curitiba, 28 de agosto de 2012.



Prof. Dr. José Viriato Coelho Vargas
Orientador



Prof. Dr. Luiz Alberto de Oliveira Rocha
Examinador



Prof^a. Dr^a. Cláudia E. Bruno Marino
Examinador



Jacqueline de Souza Lemos

*A todos os que de alguma forma buscam a
construção de um ambiente humano e
equilibrado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta conquista.

Como agradecer a todos, por tudo?

Como expressar minha gratidão pela ajuda, companheirismo, compreensão e apoio, dispensados por todos vocês, neste momento tão importante da minha carreira?

Não tem como colocar em palavras o que cada um, individualmente ou como membro de um grupo, fez por mim. A simples presença de vocês fez-me chegar até aqui.

À minha família, meus pais e irmãos.

Ao meu orientador, Professor José Viriato Coelho Vargas.

Ao Professor David Alexandre Mitchell.

Aos meus colegas, em especial a Aline Dutra, Anderson Cardoso Sakuma, Cassiana Batista Rocha, Keli Cristiane Correia Moraes, Maura Sugai, Robson Carlos Anoch, Viviane Martine, Wellington Balmant.

A toda a equipe técnica do NPDEAS e do LTEB.

Sem vocês este trabalho não existiria!!!

“Não se pode encontrar a paz nas cidades do homem branco. Nem um lugar onde se possa ouvir o desabrochar da folhagem na primavera ou o tinir das asas de insetos”.
Cacique Seathl – 1855

RESUMO

O uso de lipídios provenientes de microalgas para produção de biodiesel apresenta vantagens consideráveis quando comparado com as tradicionais matérias-primas, porém o custo da produção de microalgas ainda é elevado. Assim o desenvolvimento de um sistema de tratamento e reciclagem de meio de cultivo de microalgas com eficiência similar ao do meio original, permite alcançar uso racional de água, economia com nutrientes e até mesmo melhorar a produtividade de microalgas. Esse constitui uma forma de reduzir os custos de produção de biodiesel de microalgas em plantas comerciais. A microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada durante 21 dias para avaliar seu crescimento, produtividade de biomassa e lipídios totais, a fim de definir um período ideal de cultivo, que possibilite obter mais lipídios em tempo menor. A maior produtividade foi alcançada no 9º dia de cultivo. Como forma de reduzir custos e perdas no sistema foi definido que o processo de recuperação da biomassa e o tratamento do meio de cultivo ocorreriam em uma única etapa. Foi avaliado o efeito dos agentes flocculantes, hidróxido de sódio e cloreto férrico, para tratamento do meio de cultivo (recuperação da biomassa), em função da perda de lipídios. A flocculação com cloreto férrico não apresentou variação significativa na taxa de lipídios quando comparados com a recuperação da biomassa por centrifugação, enquanto que a flocculação com hidróxido de sódio apresentou perdas significativas. O meio de cultivo clarificado com FeCl_3 foi reciclado para cultivar novamente a microalga, com adição de solução de metais (25 %) e sem solução de metais (0 %). No nono dia de cultivo o experimento sem solução de metais apresentou redução do teor lipídico, ao contrário do experimento com solução de metais que não apresentou variação significativa quando comparado com o cultivo em meio fresco. Conclui-se, portanto, que a reciclagem de meio de cultivo de microalgas com eficiência similar ao do meio original é viável, reduz o consumo de água e sais metálicos, o que representa uma economia de 38% quando o meio de cultivo é reciclado uma vez.

Palavras chave: biodiesel; flocculação; microalgas; reciclagem; *Scenedesmus* sp..

ABSTRACT

The use of lipids from microalgae for the biodiesel production has considerable advantages when compared with traditional feedstocks. However the cost of producing microalgae is still high. Thus the development of a system of treatment and recycle of microalgae culture medium with similar efficiency to the original medium, allows achieving the rational use of water, reducing the quantity of nutrients used and even improving the productivity of microalgae. This can be considered as an important tool to reduce of biodiesel production from microalgae in commercial plants. The microalga *Scenedesmus* sp. was cultivated for 21 days for evaluate your growth, biomass productivity and total lipids, to define an ideal period of cultivation, which enabling to obtain more lipids in less time. The highest yield was achieved on the 9th cultivation day. In order to reduce costs and system losses it was decided to perform the biomass recovery process and culture medium treatment in single step. It was investigated the effect of flocculating agents: sodium hydroxide and ferric chloride, for the treatment of the culture medium (biomass recovery) as a function of total lipids losses. Flocculation with ferric chloride did not result in significant variation in the lipid rate when compared with the recovery of the biomass by centrifugation, while the flocculation with sodium hydroxide presented significant losses. Then the cultivation medium clarified with FeCl₃ was recycled to grow microalgae again in two ways: with and without the addition of metals solution (25%). In the ninth day of cultivation, the experiment without metals solution presented decrease in the lipid content. By the other side in the experiment with solution of metals the lipid content did not change significantly when compared with culture in fresh medium. Therefore it can be concluded that recycle the culture medium of microalgae with similar efficiency to that of the original medium is viable, reduces consumption of water and metal salts, this represents a savings of 38% when the culture medium is recycled one turn.

Keywords: biodiesel; flocculation; microalgae; recycling; *Scenedesmus* sp..

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – CULTIVOS DE MICROALGAS EM TANQUES ABERTOS: A – PACIFIC NORTHWEST NATIONAL LABORATORY; B – CYANOTECH.....	23
FIGURA 02 – CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIOREATOR: A – KLÖTZE, SAXONY-ANHALT; B – NPDEAS.....	24
FIGURA 03 – REAÇÕES DE FOTOSÍNTESE.....	25
FIGURA 04 – FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO NPDEAS.....	33
FIGURA 05 – FLUXOGRAMA DE OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ESTRATÉGIAS DE TRABALHO.....	38
FIGURA 06 – A – CULTIVOS EM <i>ERLENMEYER</i> DE 2 LITROS; B – PREPARO DE CULTIVOS EM GALÃO DE 10 LITROS.....	40
FIGURA 07 – CÂMARA DE NEUBAUER.....	41
FIGURA 08 – A – CULTIVOS DE MICROALGAS; B – RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA; C – MEIO CLARIFICADO; D – MEIO CLARIFICADO SEM FILTRAR; E – MEIO CLARIFICADO FILTRADO.....	47
FIGURA 09 – DISTRIBUIÇÃO NORMAL SIMÉTRICA.....	48
FIGURA 10 – CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp.(♦: DENSIDADE CELULAR; —: AJUSTE LOGÍSTICO; ---: AJUSTE EXPONENCIAL).....	52
FIGURA 11 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA.....	54
FIGURA 12 – PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS TOTAIS NA BIOMASSA SECA (♦: LIPÍDIOS TOTAIS; —: DENSIDADE CELULAR - AJUSTE LOGÍSTICO).....	56
FIGURA 13 – PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS TOTAIS.....	57
FIGURA 14 – PRODUTIVIDADE DIÁRIA DE BIOMASSA SECA (♦: BIOMASSA SECA; —: DENSIDADE CELULAR - AJUSTE LOGÍSTICO).....	58
FIGURA 15 – PRODUTIVIDADE DIÁRIA DE LIPÍDIOS TOTAIS (♦: LIPÍDIOS TOTAIS; —: DENSIDADE CELULAR - AJUSTE LOGÍSTICO).....	59
FIGURA 16 – VARIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO INCREMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE NaOH NO MEIO CLARIFICADO (♦: ABSORBÂNCIA; ■: pH).....	60
FIGURA 17 – MEIO DE CULTIVO CLARIFICADO POR FLOCULAÇÃO: A – NaOH 4; 6 E 8 mmol.L ⁻¹ ; B – FeCl ₃ 0,1; 0,2 E 0,3 mmol.L ⁻¹	61
FIGURA 18 – VARIAÇÃO DA ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO INCREMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE FeCl ₃ NO MEIO CLARIFICADO (♦: ABSORBÂNCIA; ■: pH).....	62
FIGURA 19 – EFICIÊNCIA NA CLARIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO POR CENTRIFUGAÇÃO, FLOCULAÇÃO COM NaOH – 8 mmol.L ⁻¹ E COM FeCl ₃ – 0,2 mmol.L ⁻¹	63
FIGURA 20 – TEOR LIPÍDICO PRESENTE NA BIOMASSA RECUPERADA POR CENTRIFUGAÇÃO, FLOCULAÇÃO COM 8 mmol.L ⁻¹ DE NaOH E COM 0,2 mmol.L ⁻¹ DE FeCl ₃	64

FIGURA 21 – CURVA DE CRESCIMENTO DO CULTIVO C_2 UTILIZADO PARA COMPOR OS MEIOS DE CULTIVOS RECICLADOS T_1 E T_2 (◆: DENSIDADE CELULAR; —: AJUSTE LOGÍSTICO - C_2 ; —: AJUSTE LOGÍSTICO - C_1)	65
FIGURA 22 – CURVAS DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS COM MEIO FRESCO – T_0 E RECICLADO – T_1 (◆: T_0 ; □: T_1)	67
FIGURA 23 – CURVAS DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS COM MEIO FRESCO – T_0 E RECICLADO – T_2 (◆: T_0 ; ○: T_2)	68
FIGURA 24 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA NO 9º DIA DE CULTIVO EM MEIO FRESCO – T_0 E RECICLADO – T_1 E T_2	69
FIGURA 25 – TEOR LIPÍDICO (%) NO 9º DIA DE CULTIVO EM MEIO FRESCO – T_0 E RECICLADO – T_1 E T_2	69
FIGURA 26 – TEOR LIPÍDICO (mg.L^{-1}) NO 9º DIA DE CULTIVO EM MEIO FRESCO – T_0 E RECICLADO – T_1 E T_2	70
FIGURA 27 – CURVA DE CRESCIMENTO DO CULTIVO UTILIZADO PARA COMPOR OS MEIOS DE CULTIVOS RECICLADOS – B_1 E B_2	72
FIGURA 28 – CURVA DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS COM MEIOS RECICLADOS – B_1 E B_2 (○: B_1 ; ▲ - B_2).....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – CUSTO DA PRODUÇÃO DE COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS E DE BIODIESEL.....	19
TABELA 02 – PLANTAS OLEAGINOSAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	21
TABELA 03 – TEOR LIPÍDICO ENCONTRADO EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGA <i>Scenedesmus</i>	22
TABELA 04 – COMPOSIÇÃO DO MEIO <i>GUILLARD</i> “F/2” MODIFICADO.....	39
TABELA 05 – VARIAÇÃO DE FeCl ₃ NOS TESTES DE FLOCULAÇÃO.....	46
TABELA 06 – VARIAÇÃO DE NaOH NOS TESTES DE FLOCULAÇÃO.....	46
TABELA 07 – ANÁLISE CINÉTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp. PELOS AJUSTES DAS EQUAÇÕES LOGÍSTICA E EXPONENCIAL.....	53
TABELA 08 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA.....	54
TABELA 09 – PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS TOTAIS NA BIOMASSA SECA.....	55
TABELA 10 – PRODUTIVIDADE DIÁRIA DE BIOMASSA SECA.....	57
TABELA 11 – PRODUTIVIDADE DIÁRIA DE LIPÍDIOS TOTAIS.....	58
TABELA 12 – EFICIÊNCIA DOS PROCESSOS AVALIADOS EM RECUPERAR BIOMASSA.....	62
TABELA 13 – ANÁLISE CINÉTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA PELO AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA.....	66
TABELA 14 – CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES NOS CULTIVOS COM MEIO RECICLADO.....	67
TABELA 15 – CUSTO DO MEIO DE CULTIVO FRESCO E RECICLADO.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	– Adenosina difosfato
ATP	– Adenosina trifosfato
cel.	– células
ed.	– edição
EUA	– Estados Unidos da América
FBR	– Fotobiorreator
GIA	– Grupo Integrado de Aquicultura
LTEB	– Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise
N. de cel.	– número de células
NADP	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – reduzida
NPDEAS	– Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
sp.	– espécie

LISTA DE SÍMBOLOS

A_1	– absorbância do meio clarificado
A_2	– absorbância do cultivo
B	– biomassa seca em gramas por litros
B_1	– cultivo da microalga em meio reciclado filtrado
B_2	– cultivo da microalga em meio reciclado sem filtrar
cm	– centímetros
C	– biomassa seca em gramas
C_1	– primeiro cultivo da microalga em meio fresco
C_2	– segundo cultivo da microalga em meio fresco
°C	– graus Celsius
E	– eficiência
F_1	– massa do papel de filtro úmido
F_2	– massa do papel de filtro seco
F_3	– massa do papel de filtro com biomassa seca
g	– grama
L	– litro
L_1	– massa do <i>vial</i> vazio
L_2	– massa do <i>vial</i> com lipídios
mg	– miligrama
mL	– mililitro
mmol	– milimol
mol	– quantidade de matéria
nm	– nanometro
nmol	– nanomol
n	– número de amostras
N	– densidade celular
N_0	– densidade celular inicial
N_{max}	– densidade celular máxima
p	– teste T de <i>Student</i>
Q_{xa}	– teste Q de <i>Dixon</i> - menor valor
Q_{xb}	– teste Q de <i>Dixon</i> - maior valor
rpm	– rotação por minuto
s	– segundos
S	– desvio padrão
S_a	– desvio padrão de a
S_b	– desvio padrão de b
t	– tempo de cultivo
T_0	– cultivo em meio fresco
T_1	– cultivo em meio reciclado – 0% de solução de metais
T_2	– cultivo em meio reciclado – 25% de solução de metais
U	– umidade inicial do papel de filtro
V	– volume de meio de cultivo filtrado

- x' – média aritmética dos valores das amostras
- x'' – médias aritméticas dos resultados das equações
- x_1 – primeiro valor de um conjunto de n amostras organizadas em ordem crescente
- x_a' – média aritmética de a
- x_a – valor menor de um conjunto de n amostras
- x_{a+1} – próximo valor acima de x_a
- x_b' – média aritmética de b
- x_b – valor maior de um conjunto de n amostras organizadas em ordem crescente
- x_{b-1} – próximo valor abaixo de x_b
- x_i – valor de cada amostra
- x_n – último valor de um conjunto de n amostras organizadas em ordem crescente
- Z – propagação do erro
- μ – velocidade específica de crescimento
- μE – microeinstein
- μL – microlitro
- μmol – micromol
- $\%$ – por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 BIODIESEL.....	18
2.1.1 Matéria-prima para produção de biodiesel	19
2.1.2 Microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel	20
2.1.3 Microalgas <i>Scenedesmus</i> sp.	21
2.2 PRODUÇÃO DE MICROALGAS	22
2.2.1 Fotossíntese	25
2.2.2 Fatores que influenciam na produtividade de microalgas	26
2.2.2.1 Luminosidade	27
2.2.2.2 Temperatura.....	27
2.2.2.3 Aeração e agitação.....	28
2.2.2.4 pH	29
2.2.2.5 Nutrientes.....	29
2.2.3 Produção de microalgas no NPDEAS	32
2.2.4 Recuperação da biomassa.....	33
2.3 RECICLAGEM DO MEIO DE CULTIVO	35
3 DESAFIOS E OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.1.1 Objetivos específicos.....	38
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 MICROALGA.....	39
4.2 MEIO DE CULTIVO	39
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	40
4.4 AVALIAÇÃO DO CULTIVO	41
4.4.1 Densidade celular	41
4.4.2 Cinética de crescimento.....	41
4.4.3 Biomassa seca.....	42
4.4.4 Lipídios totais	43
4.5 TRATAMENTO DO MEIO DE CULTIVO.....	44
4.5.1 Centrifugação.....	45
4.5.2 Floculação.....	45
4.5.2.1 Floculação com solução de cloreto férrico hexahidratado	45
4.5.2.2 Floculação com solução de hidróxido de sódio.....	46
4.6 RECUPERAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO.....	46
4.6.1 Adição de nutrientes no meio de cultivo reciclado	47
4.6.2 Avaliação do pós-tratamento do meio de cultivo	47
4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 CULTIVO DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp. EM MEIO DE CULTIVO GUILLARD – “F/2” MODIFICADO	51

5.1.1 Cinética de crescimento.....	51
5.1.2 Produtividade de biomassa seca e de lipídios totais da microalga <i>Scenedesmus</i> sp.....	53
5.2 PERÍODO DE CULTIVO DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp.	57
5.3 TRATAMENTO DO MEIO DE CULTIVO.....	59
5.4 RECICLAGEM DO MEIO DE CULTIVO	65
5.4.1 Cultivo da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio fresco e reciclado	67
5.4.2 Produtividade de biomassa seca e de lipídios totais da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em meio fresco e reciclado.....	68
5.4.3 Adição de nutrientes no meio reciclado	70
5.5 AVALIAÇÃO DO PÓS-TRATAMENTO DO MEIO DE CULTIVO	71
5.6 VIABILIDADE ECONÔMICA	73
6 CONCLUSÃO.....	75
6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

O biodiesel é um combustível líquido, obtido a partir de fontes biológicas renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais, que pode ser utilizado em qualquer motor diesel sem necessidade de modificá-lo (DEMIRBAS, 2008).

O interesse em substituir os combustíveis de origens fósseis por biodiesel vem aumentando, pois este apresenta vantagens técnicas sobre o diesel como: menor ponto de fulgor, redução do lançamento de enxofre e monóxido de carbono, não contém hidrocarbonetos aromáticos e outras substâncias químicas prejudiciais à saúde e ao ambiente, é renovável e biodegradável, podendo ser obtido de forma sustentável (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2008; HUANG et al., 2010).

Quando utilizado na produção do biodiesel óleo vegetal de plantas oleaginosas, o custo da matéria-prima varia em torno de 70 - 85% do custo total da produção (MENG et al., 2009). O uso de grãos na produção de biodiesel tende a aumentar o custo da matéria-prima, devido a competição gerada com a produção de alimentos.

Entretanto os vegetais superiores podem ser substituídos por microalgas, que são organismos unicelulares microscópicos, predominantemente aquáticos, com necessidades nutricionais relativamente simples, pois possuem capacidade fotossintética (ANDRADE; COSTA, 2008). O cultivo de microalgas apresenta vantagens como, não competir com produções agrícolas de alimentos, utilizar solos inapropriados para a agricultura, ocupar uma área de produção menor, pois apresentam produtividade significativamente superior a das plantas oleaginosas, aproximadamente 89,9 % em relação à palma e 99,2 % à soja, e a sua produção pode ser realizada em fotobiorreatores compactos, o que permite obter um volume de cultivo maior para a mesma área de uma lagoa (CHISTI, 2007).

O desenvolvimento da produção de biodiesel de microalgas apresenta desafios como, aumentar a produtividade de biomassa e lipídios, reduzir o custo da produção e recuperação da biomassa, reutilizar as águas residuárias, entre outros (LOERA-QUEZADA; OLGUÍN, 2010).

Para produzir o meio de cultivo é gasto aproximadamente 35%, do valor total do custo da produção de biomassa microalgal (GRIMA et al. 2003). Como os meios de cultivos das microalgas em plantas comerciais são líquidos o volume de água consumido é elevado, na ordem de 2 litros por grama de biomassa (RIBEIRO et al. 2012), uma forma de reduzir os custos de produção de microalgas é desenvolver um sistema de reciclagem do meio de cultivo das microalgas, que permite, além da redução de gastos com água, recuperar os nutrientes que não foram consumidos no cultivo anterior (RODOLFI et al., 2003; KIM et al., 2011).

O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável – NPDEAS da UFPR, busca sua sustentabilidade energética através da produção de biodiesel de microalgas, cultivadas em fotobiorreator compacto, com volume de cultivo de 10 m³ (RIBEIRO et al., 2009).

Assim, esta pesquisa buscou desenvolver um sistema de tratamento e reciclagem de meio de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp., cujo meio reciclado apresente eficiência similar a do meio original, permitindo alcançar uso racional de água, economia com nutrientes e manter ou melhorar a produtividade de microalgas em fotobiorreator compacto voltado à produção de biodiesel.

1.1 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação se encontra organizada em 6 seções. A seção 1 apresenta a introdução e organização do trabalho, a seção 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre os temas abrangidos nesta pesquisa, a seção 3 apresenta os desafios e objetivos que se pretendem alcançar com esta pesquisa, na seção 4 é apresentada a metodologia utilizada para alcançar os objetivos da pesquisa, na seção 5 são apresentados os resultados e discussões alcançados nesta pesquisa e na seção 6 são apresentadas a conclusão da pesquisa e as considerações para futuros trabalhos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIODIESEL

O nome biodiesel foi dado ao transesterificado de óleo vegetal para descrever a sua utilização como combustível para motores a diesel e sua natureza renovável. É uma alternativa ecológica de combustível líquido que pode ser utilizado em qualquer motor diesel sem necessidade de modificá-lo (DEMIRBAS, 2008).

A Lei Federal N. 11.097 de 13 de janeiro de 2005 define biodiesel como: *biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.*

Quimicamente o biodiesel é definido como os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa derivados de biolipídios renováveis. É produzido tipicamente, através da reação de um ácido graxo derivado de fontes biológicas, óleos vegetais processados ou não e gorduras animais, com metanol ou etanol, na presença de um catalisador para produção de ésteres metílicos ou etílicos (biodiesel) e glicerina (DEMIRBAS, 2008).

O biodiesel foi inserido na matriz energética brasileira a partir da publicação da lei federal 11.097 de 13 de janeiro de 2005, que também fixa um percentual mínimo obrigatório, 5%, em volume, de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional.

A substituição de energias provenientes de combustíveis fósseis por biodiesel apresenta vantagens técnicas como, possui menor ponto de fulgor, redução do lançamento de enxofre e monóxido de carbono, não contém hidrocarbonetos aromáticos e outras substâncias químicas prejudiciais à saúde e ao ambiente, é renovável, biodegradável, podendo ser obtido de forma sustentável (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2008; HUANG *et al.*, 2010).

A viabilidade econômica da produção de biodiesel está fundamentada no preço do petróleo, pois é um potencial substituto do diesel. O aumento do preço do

barril de petróleo, que tem ocorrido nos últimos anos, torna mais viável a produção de biodiesel (LOERA–QUEZADA; OLGUÍN, 2010).

Apesar de apresentar um potencial econômico, quando se considera o aumento do preço dos combustíveis fósseis e que estes tendem a crescer por não serem renováveis (HUANG et al., 2010), atualmente o custo da produção de biodiesel é elevado quando comparado com a produção do diesel e de outros combustíveis de origem fósseis (tabela 01). Assim o interesse em pesquisas que exploram a redução do custo da produção do biodiesel tem sido grande, principalmente em relação a métodos de reduzir o custo da matéria-prima que será utilizada na produção dos ácidos graxos (MENG et al., 2009).

TABELA 01 – CUSTO DA PRODUÇÃO DE COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS E DE BIODIESEL

Combustível	Preço.L⁻¹	Fonte
Diesel (B5)	R\$ 1,69	MME, 2012b
Biodiesel ^a	R\$ 2,47	MME, 2012a
Biodiesel de microalga	R\$ 3,14	Hundt; Reddy, 2011
Gasolina	R\$ 2,44	MME, 2012b
GLP (P - 13)	R\$ 1,50	MME, 2012b

NOTA – ^a80,1% de óleo de soja; 14,4% de gordura bovina e 3,8% de óleo de algodão.

2.1.1 Matéria-prima para produção de biodiesel

Os ácidos graxos utilizados na produção de biodiesel podem ser provenientes de matérias-primas como, plantas oleaginosas, soja, milho, canola, palma, girassol, mamona, entre outras, óleos vegetais residuais, gorduras e sebos animais.

A utilização de plantas como matéria-prima da produção de biodiesel apresenta limitações como o uso de grandes extensões de terra fértil que gera conflito com a produção de alimentos, a rotatividade do plantio em função das estações climáticas, entre outras (LOERA–QUEZADA; OLGUÍN, 2010).

Quando utilizado óleo vegetal para a produção do biodiesel, o custo da matéria-prima varia em torno de 70 - 85% do custo total da produção do biodiesel

(MENG et al., 2009). Assim, a escolha da matéria-prima se torna um fator crítico no planejamento da produção do biodiesel.

2.1.2 Microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel

Microalgas são organismos microscópicos, unicelulares e podem ser encontrados tanto na água (mar, rio, lagos) como no solo. São autotróficos, sintetizam matéria orgânica a partir de compostos inorgânicos, através da fotossíntese, utilizando como fonte de energia a luz solar. O termo microalga é totalmente desprovido de valor taxonômico e pode se referir a organismos com características morfológicas completamente diferentes (DERNER et al., 2006).

Dentre os organismos fotossintetizantes encontrados no ambiente, os que possuem mais rápido crescimento celular são as algas, chegam a consumir cerca de duas toneladas de CO₂ para produzirem uma tonelada de biomassa (MALLICK et al., 2012).

Entre os produtos metabólicos das microalgas se encontram proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e lipídios (MALLICK et al., 2012; SPOLAORE et al., 2006).

As microalgas podem ser utilizadas como matéria-prima da produção de biodiesel, apresentando vantagens como: uniformidade do organismo, ao contrário das plantas que apresentam folhas, caule, frutos, sementes e raízes que deverão ser separados antes da extração dos ácidos graxos. O próprio cultivo requer menor investimento monetário na produção, utilização de solos inapropriados para a agropecuária, quando cultivadas em fotobiorreator compacto, permite reduzir as áreas de cultivos e também participar da captura do dióxido de carbono proveniente de uma fonte poluidora (HUNDT; REDDY, 2011; CHISTI, 2007).

A quantidade de lipídios armazenada pelas microalgas é significativamente superior a das plantas oleaginosas (tabela 02), o que permite reduzir a área de investimento e redução de custos como matéria-prima.

A biomassa residual da extração de lipídios de microalgas pode ser destinada a outros processos produtivos (de fármacos, cosméticos, alimentos, entre outros) para

obter outros produtos com alto valor agregado, assim como gerar biogás em biodigestor (CHISTI, 2007).

Os maiores desafios no desenvolvimento do processo de produção de biodiesel de microalgas estão em alcançar (LOERA-QUEZADA; OLGUÍN, 2010):

- Selecionar as melhores cepas, em termos de máximo teor de lipídio e máxima produtividade, melhor perfil de lipídios e adaptabilidade ao tipo de meio e as condições ambientais;
- Desenvolver estratégias de cultivo adequadas que permitam alcançar máxima produtividade de lipídios e de biomassa;
- Utilizar as águas residuais, evitando contaminações;
- Desenvolver reatores mais adequados ou uma combinação deles, para máxima produção de biomassa e um custo mínimo;
- Reduzir o custo da colheita;
- Desenvolver o processo de extração de lipídios e sua conversão em biodiesel a um custo mínimo.

TABELA 02 – PLANTAS OLEAGINOSAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Cultura	Rendimento de óleo (L.ha ⁻¹)	Área necessária (Mha) ^a
Milho	172	1540
Soja	446	592
Canola	1190	223
Coco	2689	99
Óleo de palma	5950	45
Microalga ^b	136.900	2
Microalga ^c	58.700	4,5

NOTA – ^a Para atender 50% de todos os combustíveis necessários aos transportes no EUA.; ^b 70% óleo (por massa) em biomassa; ^c 30% óleo (por massa) em biomassa.

FONTE: ALTERADO DE CHISTI, (2007)

2.1.3 Microalgas *Scenedesmus* sp.

As microalgas *Scenedesmus* sp. são clorofiladas unicelulares e uninucleadas, pertencentes à família Scenedesmaceae, gênero *Scenedesmus*. Possuem forma

elipsoidal e as colônias são planas (série linear) com as células agrupadas em número de 4; 8, raramente 16 ou 32 (STANKIEWICZ et al., 1981).

A multiplicação das *Scenedesmus* é por autoesporulação, cada célula produz um cenóbio (colônia de organismos cujo número de células é geneticamente fixo) completo, o cenóbio-filho pode permanecer unido pelos fragmentos geleificados à membrana materna (LOURENÇO, 2006; STANKIEWICZ et al., 1981).

A tabela 03 apresenta valores do teor lipídico encontrado em algumas espécies de microalgas *Scenedesmus*, estes servem de referência, porém não podem ser tomados como base de pesquisa para outras espécies pertencentes a mesmo gênero, pois ocorrem variações significativas do conteúdo lipídico de uma espécie para outra.

TABELA 03 – TEOR LIPÍDICO ENCONTRADO EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGA *Scenedesmus*

Microalga	Teor Lipídico (%)		Fonte
	Controle	Otimizado	
<i>Scenedesmus obliquus</i> ^a	13,0	58,3	Mandal e Mallick, 2009
	9,4	11,8	Mandal e Mallick, 2009
	14,1	-	Francisco <i>et al.</i> , 2011
<i>Scenedesmus rubescens</i> ^b	-	73,0	Matsunaga, 2009
<i>Scenedesmus quadricauda</i> ^a	18,4	-	Rodolfi et al., 2009
<i>Scenedesmus</i> sp. F&M-M19 ^a	19,6	-	
<i>Scenedesmus</i> sp. DM ^a	21,1	-	

NOTA: ^a microalga de água doce; ^b microalga marinha; Controle: meio de cultivo padrão da espécie; Otimizado: meio de cultivo com variação na taxa de nutrientes.

2.2 PRODUÇÃO DE MICROALGAS

A produção de microalgas pode ser realizada para manutenção de coleções, pesquisas científicas ou para fins comerciais. No primeiro e segundo caso, os cultivos serão realizados em ambientes climatizados que permitem maior controle dos fatores que influenciam no crescimento celular, com volumes pequenos (10 mL – 10 L). Em plantas comerciais, o volume é superior a mil litros, ainda nesse caso é aconselhado

manter uma sala de cultivo para manutenção e controle das cepas de interesse (LOURENÇO, 2006).

Apesar de documentos que relatam o uso de microalgas e cianobactérias como fonte alternativa de alimento pelos chineses a cerca de 2000 anos atrás, somente nos últimos 50 anos tem ocorrido a exploração comercial de algas. Inicialmente votada para produção de biomassa como fonte de proteínas, a análise sistemática de algas para os compostos bioativos e de produtos farmacêuticos (HARWOOD; GUSCHINA, 2009).

Existem várias formas de cultivar microalgas, a primeira e mais básica é simplesmente uma lagoa rasa (figura 01), onde são adicionados nutrientes permitindo o crescimento de algas. Apesar de ser um sistema de baixo custo apresenta dificuldades na eficiência do controle de crescimento (HUNDT; REDDY, 2011).



FIGURA 01 – CULTIVOS DE MICROALGAS EM TANQUES ABERTOS: A – PACIFIC NORTHWEST NATIONAL LABORATORY; B – CYANOTECH
 FONTE: (A) PACIFIC NORTHWEST NATIONAL LABORATORY (2011); (B) CYANOTECH (2012)

O segundo sistema é o tanque pista, também é uma lagoa aberta, mas é um circuito especificamente concebido. Um tanque pista é constituído por circuitos e canais de recirculação, tem aproximadamente 0,3 cm de profundidade e é dotado de pás que permite a homogeneização e circulação do cultivo (CHISTI, 2007; HUNDT; REDDY, 2011).

O cultivo de microalgas em tanques abertos é realizado há algumas décadas para a produção de microalgas como *Spirulina (arthrospira)*, *Dunaliella* e *Chlorella* (LOERA-QUEZADA; OLGUÍN, 2010).

O terceiro sistema é denominado fotobiorreator (figura 02), é um sistema fechado onde o meio de cultivo e as algas circulam através de uma matriz de tubos transparentes expondo-os à luz. É adicionada continuamente uma fonte de dióxido de carbono, o ideal é utilizar as emissões gasosas de uma indústria, essa é fundamental para o desenvolvimento das algas e também contribui com a mistura, ajudando a reduzir as incrustações dos tubos. Embora sua construção e operação requeiram grandes investimentos, 95% mais caro que uma lagoa, vem se tornando popular, (HUNDT; REDDY, 2011; LOERA-QUEZADA; OLGUÍN, 2010).



A



B

FIGURA 02 – CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIORREATOR: A – KLÖTZE, SAXONY-ANHALT; B – NPDEAS

FONTE: (A) UMWELT BUNDES AMT (2010); (B) O AUTOR (2012)

Nos sistemas abertos, lagoa e tanque pista, a temperatura varia conforme as condições do ambiente, o arrefecimento só é possível por evaporação, perdas por evaporação podem ser significativas, em consequência disto a eficiência na absorção do CO₂ é muito menor que em um fotobiorreator. Também a ocorrência de contaminações, por bactérias, fungos, protozoários, entre outros, que afetam a

produtividade é maior. Os tanques pistas são mais baratos do que os fotobiorreatores, porque o custo de construção e operação são menores, porém, a produtividade de biomassa é menor (CHISTI, 2007).

Independente do sistema em que são cultivadas as microalgas, a produtividade está relacionada à sua taxa fotossintética. Assim, o aumento da produção de biomassa está ligado a capacidade do sistema, além de fornecer os elementos necessários à fotossíntese, de maximizar a exposição da microalga a estes.

2.2.1 Fotossíntese

A fotossíntese (equação 1), ocorre por meio de um conjunto de reações (figura 03), que podem ser agrupadas em duas etapas interligadas: fotoquímica - dependente de luz, e química - independente de luz, mas dependente dos produtos formados na etapa fotoquímica (LOPES, 2004).

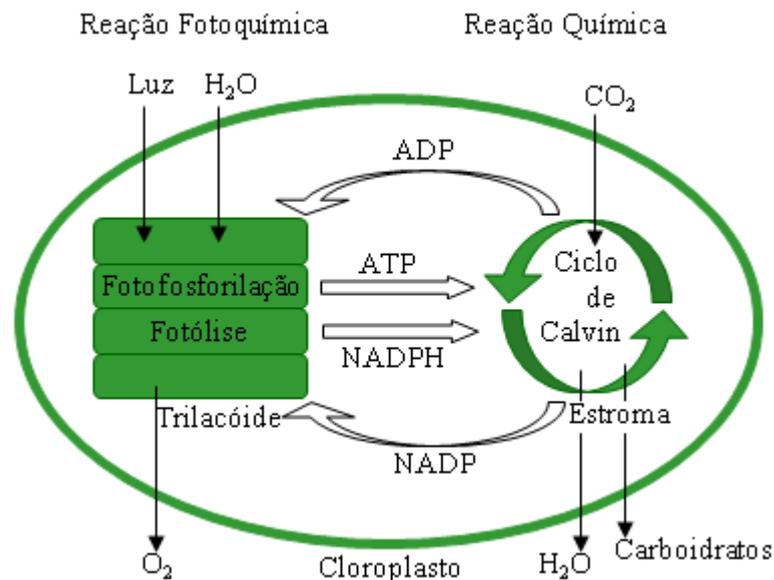
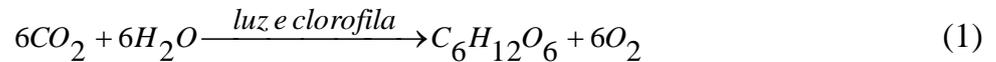


FIGURA 03 – REAÇÕES DE FOTOSSÍNTESE
 FONTE: MODIFICADO DE LOPES (2004)

O aparelho fotossintético das células são os cloroplastos, que são compostos internamente de tilacóides e estroma (cyanobacterias não possuem cloroplastos). Os

tilacóides contêm pigmentos, os principais são clorofila e carotenóides, que absorvem luz, transferem elétrons e enzimas na etapa fotoquímica. Nesta etapa ocorrem reações de fotólise da água e fotofosforilação, que interagem para formar ATP e NADPH, que atuam como fontes de energia para a fixação do dióxido de carbono na fase química (HALL; RAO, 1980).

O ciclo redutivo de pentose fosfato, ciclo de Calvin, é a via metabólica da fixação do CO₂ e que conduz a incorporação do carbono em hexoses. O carbono se reduz para níveis de carboidratos e os produtos intermediários que participam da redução do carbono são pentoses fosforiladas (ANDREO; VALLEJOS, 1984).

O rendimento da fotossíntese, em uma célula, depende de fatores internos e externos. Os principais fatores internos são a estrutura da célula, teor de clorofila, acúmulo de produtos fotossintéticos dentro dos cloroplastos, a influência de enzimas protoplasmáticas e a presença de constituintes minerais. Os fatores externos são a luminosidade nas células, a temperatura, concentrações de dióxido de carbono e oxigênio (HALL; RAO, 1980).

2.2.2 Fatores que influenciam na produtividade de microalgas

Independente do sistema utilizado para produzir microalgas e sua escala, diversos fatores influenciam na produtividade das microalgas. Estes fatores são os mesmos que limitam o rendimento da fotossíntese e desses os que podem ser controlados são a variação de temperatura, luminosidade, aeração e a concentração de nutrientes no meio.

Para os sistemas abertos, tipo lagoas, como representam o ambiente natural, são controlados apenas a concentração de nutrientes e a aeração. Porém, em laboratórios e fotobiorreatores, a temperatura e luminosidade também podem ser controladas.

A alteração desses fatores pode alterar a taxa de crescimento das microalgas ou até mesmo levar à morte das células. Variações significativas da quantidade de nutrientes podem afetar o teor de lipídios nas células e de outras substâncias metabólicas de interesse (HALL; RAO, 1980; PENTEADO, 2010).

2.2.2.1 Luminosidade

A iluminação é um dos fatores que requer atenção especial para o êxito dos cultivos. A condição ótima para o crescimento das microalgas dependerá da intensidade da luz, do comprimento de onda e duração aos quais as células estão expostas. Em cultivos de pequena escala, recomenda-se o uso de luz artificial, uma vez que pode ser controlada de acordo com as necessidades das culturas. As lâmpadas mais comumente utilizadas são fluorescentes do tipo luz do dia, por simular comprimentos de ondas de 350 a 700 nm, necessários para a fotossíntese. Para manutenção das cepas em tubos de ensaio (15 mL) utiliza-se densidade de fluxo fótonico de $20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, enquanto que para cultivos de rotinas (250 mL) de 60 a $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ são suficientes (LOURENÇO 2006).

O fotoperíodo que se utiliza normalmente é de 10:14 ou 12:12 horas de luz : escuro, embora a maioria das espécies cresçam bem sob uma iluminação contínua, manter um cultivo com fotoperíodo favorece a sincronização do cultivo, o que é recomendado para estudos fisiológicos e a divisão celular de muitas espécies ocorre em períodos de escuros (SCHMIDT, 2007).

O aumento significativo da luminosidade, de 34 para $80 \mu\text{mol f\u00f3tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, permite aumentar a taxa de crescimento em cultivos de microalgas, quando combinado com o aumento da temperatura, porém quando a temperatura é mantida baixa ($\pm 14 \text{ }^\circ\text{C}$) o aumento da luminosidade tem o efeito inverso, fotoinibição (SANDNES, 2005).

2.2.2.2 Temperatura

Um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos é a temperatura. Há perigo em se fazer generalizações da temperatura, pois esta varia de espécie para espécie, ainda que pertencentes à mesma região. Temperaturas constantes são desejáveis, pois proporcionam mais estabilidade nos experimentos e nas operações de rotinas, permitindo maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies. Para salas de cultivos, temperaturas constantes são alcançadas por meio de

sistemas de refrigeração, porém, para grandes sistemas a dificuldade de se manter a temperatura constante é maior (LOURENÇO, 2006).

Para manter as cepas é recomendado manter a temperatura em torno de 18 – 22 °C, também pode utilizar temperaturas menores para diminuir a frequência de renovação dos cultivos. Para fins de reprodução dos cultivos, se mantém temperaturas mais altas para acelerar a taxa de crescimento, a qual depende dos limites de tolerância de cada espécie. Para as salas utilizadas para manter as cepas, é necessário levar em consideração que o sistema de iluminação também produz calor, portanto, deve-se considerar a necessidade de um sistema confiável de controle térmico, como sistema adicional de segurança (SCHMIDT, 2007).

Ao variar a temperatura dos cultivos de microalga *Nannochloropsis oceanica* de 14,5 a 35,7 °C, Sandnes (2005) obteve aumento da taxa de crescimento em relação à temperatura, com um pico entre 25 – 29 °C. Para as temperaturas acima de 30 °C os cultivos apresentaram reduções drásticas e alguns não cresceram em temperaturas acima de 35 °C.

2.2.2.3 Aeração e agitação

A aeração está diretamente ligada à demanda de carbono, pois na formulação de quase todos os meios de cultivo não há adição de fonte de carbono. A aeração também promove a agitação dos cultivos, permitindo a homogeneização, mesmo para espécies móveis pode haver a decantação e acúmulo das células junto ao fundo (LOURENÇO, 2006).

O ar é adicionado ao cultivo por agitação manual diária, para volumes de até 500 mL, para volumes maiores a aeração pode ser promovida por injeção de gás carbônico (CO₂) ou com compressor de ar industrial. Quando utilizado ar atmosférico comprimido, recomenda-se utilizar filtros antes do ar ser injetado nos cultivos, a fim de diminuir a carga de bactéria e outras partículas, evitando a contaminação do cultivo. Existem diferentes tipos de filtros comerciais, assim como pode ser construído de forma segura, barata e simples utilizando um tubo de PVC, preenchendo de algodão as extremidades e o centro de carvão ativado (SCHMIDT, 2007).

O uso de CO₂ deve ser controlado para se tornar eficaz e não acarretar perdas desnecessárias. Em cultivos de microalgas marinhas e de água doce, com diferentes concentrações de CO₂, observa-se o aumento do crescimento em relação ao do CO₂ até determinada taxa, a partir da qual os cultivos não apresentam mais variações até a inibição do crescimento (CHIU et al., 2009; WIDJAJA et al., 2009).

2.2.2.4 pH

O pH afeta diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos, estes podem cristalizar e precipitar dependendo do pH do cultivo. Assim, o pH deve ser quase neutro para que os componentes do meio possam ser efetivamente absorvidos pelas microalgas (SCHMIDT, 2007; LOURENÇO, 2006).

O crescimento da microalga envolve o consumo do CO₂ dissolvido no meio, acarretando a elevação do pH (> 10). Assim como o aumento da disponibilidade de CO₂ pode reduzir o pH (<5) e conseqüentemente inibir o crescimento de algumas espécies de microalgas (PIRES et al., 2012).

O uso de tampões permite uma variação discreta no pH (0,3), entretanto para sistemas de produção de microalgas de grande escala o uso de tampões aumenta o custo da produção. Uma forma de regular as variações de pH é a aeração dos cultivos, com bombeamento de ar atmosférico (0,03% de CO₂) ou com ar enriquecido de CO₂, em concentração ideal para a espécie cultivada (LOURENÇO, 2006).

2.2.2.5 Nutrientes

O crescimento das microalgas e a quantidade de lipídios produzidos pelas células estão ligados à quantidade de nutrientes disponível no meio de cultivo.

Existem vários estudos sobre cultivos de microalgas em meios com as mais variadas características, principalmente em relação à privação de determinados nutrientes e seus efeitos no aparato fotossintético. Porém em relação à característica do meio e a produção de lipídios, a literatura torna-se limitada, assim as informações que seguem são generalizadas para todas as microalgas (PENTEADO, 2010).

O carbono, por ser o componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídios, entre outros), é o elemento necessário em maiores concentrações para as algas, a proporção do consumo de carbono, nitrogênio e fósforo é de 106:16:1, para algas marinhas. Dependendo da velocidade de crescimento das microalgas, pode ocorrer um rápido consumo do carbono disponível, tornando-se um fator limitante da multiplicação celular, além da significativa elevação do pH do cultivo para valores superiores a 9, caso o meio de cultivo não seja tamponado (LOURENÇO, 2006).

O fornecimento de concentrações elevadas de CO₂ nos cultivos de microalgas permite aumentar a transferência de massa de CO₂ para o meio, porém, a redução do pH decorrente do aumento da disponibilidade de CO₂ no meio, pode inibir o crescimento de algumas espécies de microalgas (PIRES et al., 2012).

O aumento da quantidade de carbono em até 2% de CO₂ no cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata* permite o aumento da biomassa e dos lipídios, em concentrações superiores as taxas metabólicas das células começam a ser inibidas (CHIU et al., 2009)

O nitrogênio apresenta grande importância para o desenvolvimento das microalgas por ser constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário. As concentrações de proteínas, carotenóides e clorofila nas células tendem a variar em relação à concentração de nitrogênio, quando há disponibilidade de nitrogênio no cultivo ocorre o aumento das concentrações de proteínas, carotenóides e clorofila, porém, conforme se limita o nitrogênio do meio, reduzem-se as quantidades dessas substâncias (LOURENÇO, 2006; ÖRDÖG et al., 2011).

A escassez de nitrogênio no meio de cultivo pode aumentar o conteúdo lipídico de uma microalga (SANTOS et al., 2003). Devido ao fato que a depleção de nitrogênio direciona o metabolismo das microalgas antes voltado à multiplicação celular para a produção de componentes de reserva, como os ácidos graxos saturados, preparando a célula para um período de privação nutricional (ALONSO et al, 2000; XU et al., 2012). Além de permitir o aumento do teor lipídico das células, a depleção de nitrogênio altera gradualmente a composição dos lipídios, de ácidos graxos para triglicerídeos (WIDJAJA et al., 2009).

O fósforo tem importantes funções na célula, participa de todos os processos de trocas energéticas e na constituição de moléculas estruturais. Os principais componentes estruturais que apresentam fósforo em microalgas são ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas. A assimilação do fósforo é dependente de luz, possivelmente em razão da acumulação de energia em ATP. Semelhante ao nitrogênio, o fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes do crescimento celular, porém as microalgas são capazes de absorverem grandes quantidades de fósforo, 8-16 vezes a mais que a cota mínima do elemento, o que permite o crescimento mesmo em períodos de privações (LOURENÇO, 2006).

A variação de fósforo (10; 50; 250 e 500 mg.L⁻¹) no meio de cultivo da microalga *Arthrospira platensis* não afeta o teor lipídico das células. Porém, o teor de carboidratos apresenta um aumento de até 60% para concentrações de 10 mgL⁻¹ de fósforo, para as outras concentrações não ocorreram variações significativas (MARKOU et al., 2012).

A deficiência de fósforo no meio, afeta o perfil lipídico da célula com mais intensidade do que afeta a quantidade de lipídios produzidos por biomassa seca. Como o fósforo faz parte dos fosfolipídios, uma limitação deste nutriente direciona o metabolismo da microalga para a produção de triglicerídeos saturados e lipídios neutros, e ainda causa uma diminuição de ácidos graxos polinsaturados (SIRON et al., 1989).

O ferro é extremamente importante para algas por participar de inúmeras funções como, vias biossintéticas da clorofila e dos citocromos, respiração – transporte respiratório de elétrons, fotossíntese – transporte fotossintético de elétrons, redução de nitrato e de nitrito, redução de sulfato, fixação de nitrogênio molecular (N₂), detoxicação de espécies reativas de oxigênio e, além destes, é cofator de diversas enzimas (LOURENÇO, 2006).

A limitação de ferro no meio pode limitar o crescimento, e alterar a concentração de clorofila. Em cultivos da microalga *Cylindrotheca closterium* com concentração de 10 nmol.L⁻¹ de ferro o crescimento celular foi reduzido em 60%, em relação aos cultivos com 20 nmol.L⁻¹ e 11,7 μmol.L⁻¹ de ferro, para estas concentrações não ocorre variações significativas. Entretanto a taxa de clorofila *a* nas

células apresentou variações significativas, proporcionais a variação do ferro no meio (PANKOWSKI; MCMINN, 2009).

A concentração de ferro do ambiente apresenta relação direta com o conteúdo lipídico de microalga, a suplementação de ferro no início do cultivo aumenta o crescimento celular e estimula a produção de lipídios neutros, até 56,6% quando comparado com um cultivo sem suplementação de ferro (LIU et al., 2008).

Os micronutrientes, sobretudo os metálicos de forma genérica, tem como principal função participar das estruturas e de atividades enzimáticas como síntese de ácidos graxos, fixação do nitrogênio, respiração e fotossíntese (LOURENÇO, 2006).

2.2.3 Produção de microalgas no NPDEAS

O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) busca sua sustentabilidade energética a partir da produção de biodiesel gerado com biolipídios provenientes de microalgas. O processo produtivo idealizado, conforme apresentado na figura 04, inicia-se com a produção de microalgas em um fotobiorreator (FBR) compacto, após o período de cultivo vêm etapas de colheita, recuperação da biomassa, secagem, extração de lipídios e estes seguem para a produção do biodiesel.

Os fotobiorreatores são construídos com tubos de PVC transparentes, cada unidade possui volume aproximado de 10 m³, a aeração do cultivo é realizada por compressores de ar industriais, sem adição de CO₂ (RIBEIRO et al., 2009).

As unidades de cultivos são inoculadas com meio de cultivo semidefinidos e microalgas *Scenedesmus* sp. (MELLO et al., 2010; SOARES, 2010).

A recuperação da biomassa é realizada por floculação com NaOH e sedimentação (GHIDINI et al., 2009; MORAES, 2011). O meio de cultivo clarificado, efluente do cultivo de microalgas, retorna ao início do processo como parte do novo meio de cultivo.

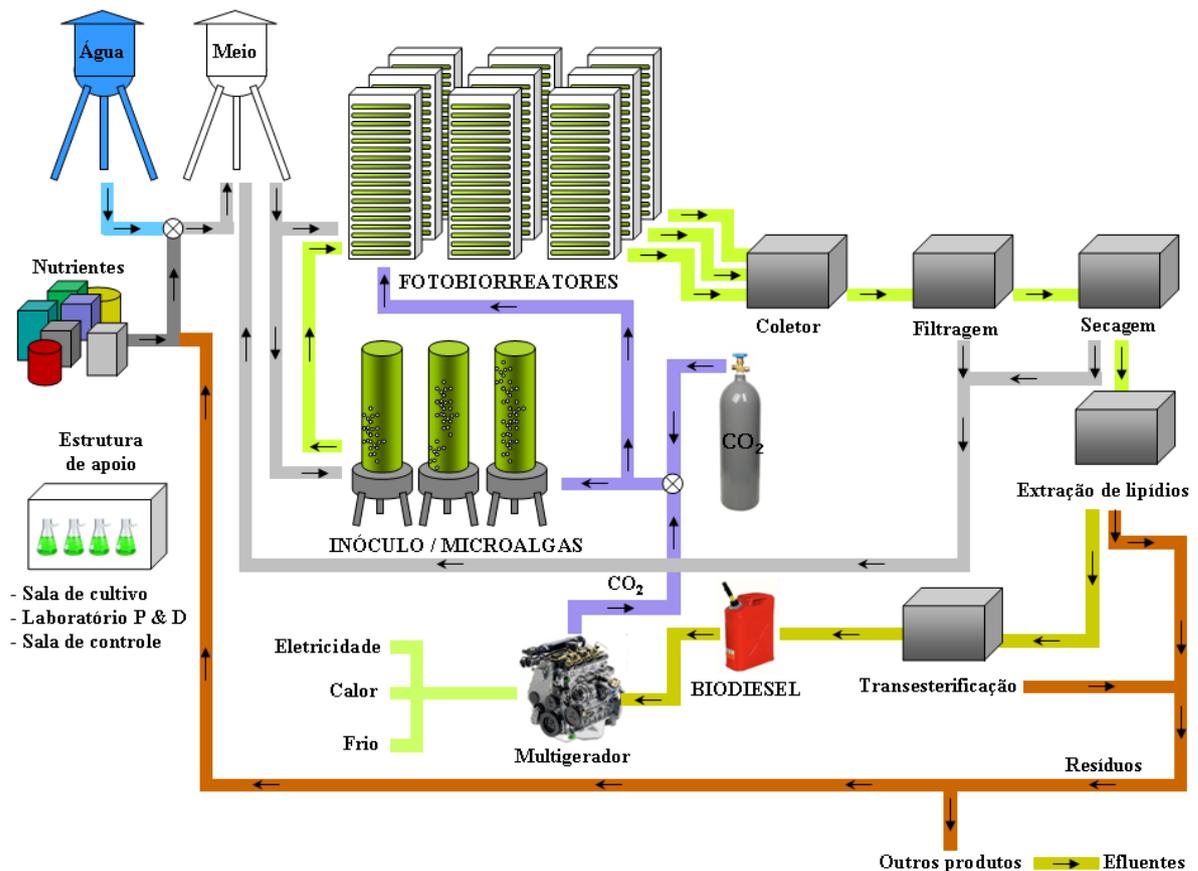


FIGURA 04 – FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO NPDEAS
 FONTE: ALTERADO DE SATYANARAYANA et al. (2010)

2.2.4 Recuperação da biomassa

Dentre as etapas que envolvem o processo de produção de microalgas, a separação das células do meio de cultivo, devido a densidade das células ser semelhante a da água, à diluição dos cultivos, tamanho das microalgas (3-30 μm de diâmetro) e volume, pode representar um problema significativo. O custo da recuperação de biomassa pode representar de 20 - 30% do total da produção de biomassa (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2012; GRIMA, et al, 2003).

A recuperação da biomassa consiste na remoção das microalgas do meio de cultivo, podendo ser realizada por sistemas físicos. Os sistemas físicos tradicionais são a centrifugação, filtração e sedimentação, nos quais há um gasto energético ou tempo considerável.

A centrifugação consiste na colisão, agregação e sedimentação da biomassa por uma força centrípeta. Como as células estão expostas a elevadas forças gravitacionais e de cisalhamento, sua estrutura pode ser danificada (PIRES et al., 2012). Porém, como pode ocorrer sem a adição de produtos químicos, conservam-se as propriedades originais das células.

Para processar elevados volumes de cultivos de microalgas, a centrifugação direta pode não ser viável, em razão do elevado gasto energético, assim, produtos finais de baixo valor agregado, podem tornar essa prática economicamente insustentável (LEE et al., 2009).

Na filtração ocorre o adensamento da biomassa em membranas filtrantes, por meio de forças mecânicas. Em um sistema de grande escala, filtros de pressão ou vácuo são satisfatórios para recuperar algas que apresentem células grandes ou filamentosas, como a *Coelastrum proboscideum* e *Spirulina platensis*, porém falham ao recuperar células pequenas como das microalgas *Scenedesmus*, *Dunaliella* e *Chlorella*, que produzem um rápido entupimento da membrana filtrante, e não há técnica viável de filtração para esses casos (GRIMA et al., 2003).

O processo de sedimentação consiste na decantação das células por forças gravitacionais, de forma natural, quando mantidas em repouso. A sedimentação de microalga é lenta e conseqüentemente com eficiência reduzida.

Durante o cultivo de microalgas pode ocorrer sedimentação das células devido ao agrupamento destas em colônias, a mudança das características do meio que levam a autofloculação, entre outros. Estes fatores ocorrem de formas imprevisíveis e indeterminadas, não permitindo a sua utilização como forma de aumentar a taxa de sedimentação.

Estes sistemas podem estar associados a um sistema de floculação com a finalidade de aumentar a taxa de remoção das partículas sólidas, reduzir o tempo e o gasto energético. A floculação é realizada para aumentar o tamanho efetivo das partículas e aumentar a taxa de sedimentação, assim como da centrifugação e filtração (GRIMA et al., 2003). É um processo viável para recuperar a biomassa, porém, dependendo das características químicas do agente floculante, este pode danificar as células, levando a perdas de substâncias celulares de interesse (LEE et al., 2009).

Um processo de floculação / sedimentação permite recuperar altas taxas de microalgas dos cultivos em poucos minutos. Horiuchi et al. (2003) recuperou 92% das células do cultivo de microalga *Dunaliella tertiolecta* em 6 min e Wu et al. (2012) mais de 90% dos cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., *Chlorococum* sp., *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum* em 10,5 min por floculação com NaOH. Estudo com combinação de coagulantes catiônicos, cloreto de cálcio (10 mmol.L⁻¹) e cloreto férrico (0,26 mmol.L⁻¹), apresentou uma eficiência de 90% na recuperação da biomassa de *Scenedesmus* sp. em 2,5 min (KIM et al., 2011).

2.3 RECICLAGEM DO MEIO DE CULTIVO

Do valor total do custo da produção de biomassa, aproximadamente 35% é gasto para produzir o meio de cultivo (GRIMA et al., 2003). Uma das formas de se reduzir o custo da produção de microalga é através da reciclagem do meio de cultivo (RODOLFI et al., 2003; KIM et al., 2011), que permite, além da redução de gastos com água, obter incrementos de biomassa por meio da recuperação dos nutrientes que não foram consumidos no cultivo anterior.

A reciclagem do meio de cultivo das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., *Chlorococum* sp., *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum*, clarificado com NaOH, neutralizado com ácido nítrico ou clorídrico e suplementado com nutrientes, teve produtividade de biomassa semelhante a do meio fresco, exceto para os cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* que após dez dias a biomassa começou a reduzir (WU et al., 2012).

Kim et al. (2011) cultivaram uma microalga *Scenedesmus* sp. em meio reciclado, filtrado, adicionando 10% de inóculo e meio fresco nas seguintes proporções: 0; 20% e 50%, para os cultivos com adição de meio fresco o acúmulo de biomassa foi maior que nos cultivos com apenas meio fresco.

A fim de avaliar a tolerância da microalga *Dunaliella tertiolecta* a alcalinidade, Horiuchi et al. (2003) adicionou ao meio de cultivo clarificado, com hidróxido de sódio (NaOH) e neutralizado com ácido clorídrico (HCl), 10% de meio fresco, sem adicionar inóculo ao novo cultivo, obteve um aumento progressivo da

densidade celular, no último dia de cultivo com meio reciclado a taxa de biomassa seca foi superior a do cultivo com meio fresco.

A prática de reuso de efluente não é tão imediata como pode parecer, pois para entrar novamente no processo produtivo a água deve apresentar características físicas, químicas e biológicas adequadas ao seu uso. Uma das principais limitações dos processos de reuso é a concentração de determinadas substâncias e contaminantes específicos, gerados durante o processo de tratamento, que aumentam à medida que a água é reciclada, reduzindo o potencial do reuso e pode comprometer a atividade que adota esta prática (MIERZWA; HESPANHOL, 2005).

Cultivos de *Nannochloropsis* sp. em meio reciclado apresentaram decréscimo de biomassa quando comparados com os cultivos em meio fresco, devido a liberação de substâncias autoinibidoras pelas células residuais, da microalga, no meio clarificado (RODOLFI et al. 2003).

Pesquisas sobre reciclagem do meio de cultivo de microalgas *Scenedesmus* sp. cultivadas em meio definido BG11 tem sido publicadas (KIM et al., 2011; WU, et al., 2012), porém, como as microalgas *Scenedesmus* cultivadas nestes trabalhos e no NPDEAS não tem a espécie identificada, o meio e as condições dos cultivos são diferentes é necessário avaliar a possibilidade e condições de reciclagem do meio da mesma, para que este sistema possa ser adotado nos cultivos de microalgas dos fotobiorreatores do NPDEAS.

3 DESAFIOS E OBJETIVOS

O uso de microalgas como matéria-prima da produção de biodiesel, apesar das vantagens que apresenta em relação às plantas oleaginosas, para se tornar um sistema economicamente competitivo, entre outros, é necessário melhorar o sistema de cultivo das microalgas com o intuito de aumentar a produção e reduzir seus custos.

Como a produção de microalgas é um típico sistema de aquicultura, dependente de volumes considerável de água, após o período de cultivo das microalgas e recuperação da biomassa obtém-se um grande volume de água residuária (meio clarificado).

O descarte do meio clarificado, proveniente da produção de microalgas, implica em perdas econômicas, além da própria água, também de nutrientes que não foram consumidos pelas microalgas, assim como do tratamento preliminar da água do meio. Portanto, faz-se necessário estabelecer mecanismos eficientes para alcançar o seu uso racional e minimizar as perdas econômicas e operacionais envolvidas no processo de descarte do meio de cultivo.

Assim o desenvolvimento de um sistema de reciclagem do meio de cultivo, como forma de reduzir perdas econômicas relevantes da produção de microalgas, se apresenta como um desafio a ser vencido em relação à produção de matéria-prima para produção de biodiesel de microalgas.

3.1 OBJETIVO GERAL

Através dessa pesquisa busca-se desenvolver um sistema de tratamento e reciclagem de meio de cultivo de microalgas, cujo meio reciclado apresente eficiência similar a do meio original, permitindo alcançar uso racional de água, economia com nutrientes e manter ou melhorar a produtividade de microalgas em fotobiorreator compacto voltado à produção de biodiesel.

3.1.1 Objetivos específicos

- Cultivar a microalga *Scenedesmus* sp. em meio de cultivo *Guillard* – “F/2” modificado;
- Definir o período de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp.;
- Definir o sistema de tratamento do meio de cultivo;
- Definir a quantidade de nutrientes a ser adicionada nos cultivos com meio de cultivo reciclado;
- Avaliar o pós-tratamento do meio de cultivo.

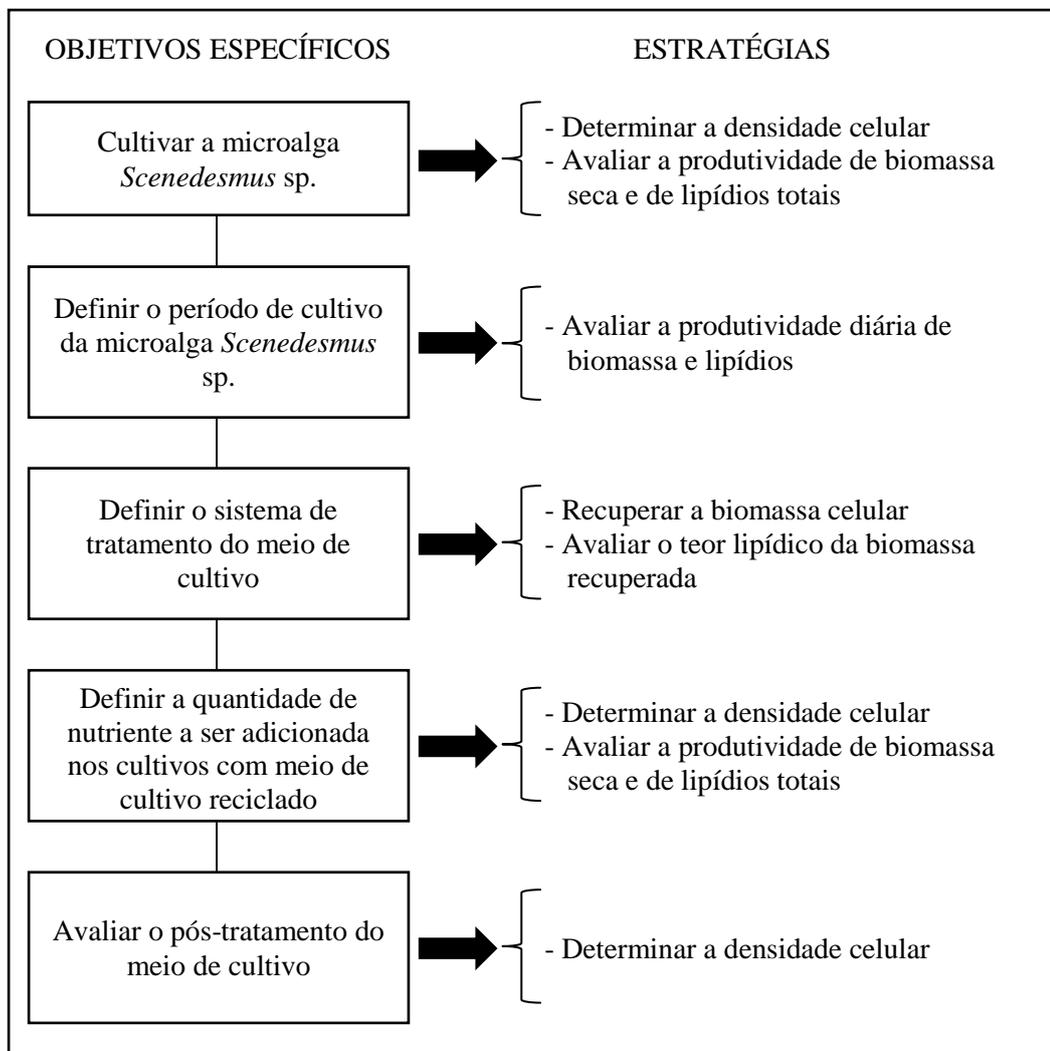


FIGURA 05 – FLUXOGRAMA DE OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ESTRATÉGIAS DE TRABALHO

4 METODOLOGIA

4.1 MICROALGA

A microalga *Scenedesmus* sp. utilizada para realizar os experimentos descritos neste trabalho foi cedida pelo Grupo Integrado de Aquicultura da Universidade Federal do Paraná (GIA – UFPR) e foram mantidas em ambiente climatizado (sala de cultivo) no NPDEAS. Microalga, meio de cultivo e condições de cultivo foram definidos de forma a dar continuidade as pesquisas desenvolvidas pelo NPDEAS (MELLO et al., 2010; PENTEADO, 2010; SOARES, 2010; MORAIS, 2011).

4.2 MEIO DE CULTIVO

A microalga foi cultivada em meio *Guillard "F/2"* modificado de Lourenço (2006), conforme apresenta a tabela 04, com concentração de 1 mL.L⁻¹ de água.

TABELA 04 – COMPOSIÇÃO DO MEIO *GUILLARD "F/2"* MODIFICADO

Solução	Reagentes	Concentração da solução estoque (g.L ⁻¹)	Concentração no meio de cultivo (g.L ⁻¹)
Nitrato	NaNO ₃	75,0000	7,5.10 ⁻²
Fosfato	NaH ₂ PO ₄ . 7H ₂ O	9,6500	9,65.10 ⁻³
Metais	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,0220	2,2.10 ⁻⁵
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,1800	1,8.10 ⁻⁴
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,0063	6,3.10 ⁻⁶
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0098	9,8.10 ⁻⁶
	Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,0100	1,0.10 ⁻⁵
	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ . 2H ₂ O	4,3600	4,36.10 ⁻³
	FeCl ₃ . 6H ₂ O	3,1500	3,15.10 ⁻³

FONTE: MODIFICADO DE LOURENÇO (2006)

A água utilizada nos cultivos, proveniente da rede de abastecimento pública, foi tratada com 11,25 µL.L⁻¹ de hipoclorito de sódio (10 – 12% de cloro ativo), tempo de contato de 10 minutos (SAÚDE, 2011), para descontaminação e o cloro ativo foi

neutralizado com $31,25 \mu\text{L.L}^{-1}$ de solução de tiosulfato de sódio com concentração de 1 mol.L^{-1} , a eficiência da neutralização foi avaliada com o kit comercial Clorotest (ácido clorídrico / ortotoluidina). Em seguida procedia-se com o preparo do meio.

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos foram realizados em balão de *Erlenmeyer* de 2 L (figura 06 A) e galões de 10 L (figura 06 B), com volume útil variando entre 25 e 90% da capacidade teórica do recipiente. Os cultivos foram inoculados com 90% (v:v) de meio de cultivo e 10% de inóculo.



FIGURA 06 – A – CULTIVOS EM *ERLENMEYER* DE 2 LITROS; B – PREPARO DE CULTIVOS EM GALÃO DE 10 LITROS

O preparo do inóculo seguiu o procedimento descrito na seção 4.2, e foram mantidos em balão de *Erlenmeyer* de 2 L até o quinto dia de cultivo, quando se procedia com a inoculação dos experimentos.

Os cultivos foram mantidos com agitação constante, por meio de aeração com fluxo de ar atmosférico, com volume de aproximadamente $0,05 \text{ L.s}^{-1}$ por litro de cultivo, proveniente de um compressor de ar e distribuído por mangueiras de silicone conectadas a pipetas colocadas dentro de cada um dos recipientes. A temperatura foi mantida a $17 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e a iluminação em aproximadamente $111,5 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas fluorescente, sem fotoper\u00edodo, fornecendo assim, condi\u00e7\u00f5es para desenvolvimento r\u00e1pido dos cultivos.

4.4 AVALIAÇÃO DO CULTIVO

Os cultivos foram avaliados diariamente a partir da determinação da densidade celular. Para realizar as análises de biomassa seca e dos lipídios totais, a primeira amostra foi coletada no terceiro dia da fase de crescimento exponencial e depois a cada dois dias. Com base nos valores obtidos nas análises de biomassa seca e lipídios totais foi avaliada a produtividade da microalga. Esta foi utilizada para determinação do tempo ideal dos cultivos.

4.4.1 Densidade celular

A densidade celular (N. de cel. \cdot mL⁻¹), realizada em triplicata, foi obtida a partir da contagem diária das células de cada controle por microscopia óptica (aumento de 400X) com auxílio de hemocitômetros, câmara de Neubauer (figura 07), durante o desenvolvimento dos cultivos (VEGA E VOLTOLINA, 2007a). Os resultados da densidade celular foram utilizados para descrever a cinética de crescimento da microalga.



FIGURA 07 – CÂMARA DE NEUBAUER

4.4.2 Cinética de crescimento

As equações logística (2) e exponencial (3) foram comparadas entre si, buscando a equação que melhor descrevesse o perfil de crescimento da microalga, para construção das curvas de cinética de crescimento. Os dados experimentais de densidade celular foram ajustados à equação logística por regressão não linear

utilizando o algoritmo de *Marquardt* do *software* TK Solver 5.0 e à equação exponencial por regressão linear utilizando o *software* Excel.

Equação logística

$$N = \frac{N_{\max}}{\left[1 + \left(\frac{N_{\max}}{N_0 - 1} \right) \cdot e^{(-\mu \cdot t)} \right]} \quad (2)$$

onde:

N – densidade celular (N. de cel..mL⁻¹);

N_0 – densidade celular inicial (N. de cel..mL⁻¹);

N_{\max} – densidade celular máxima (N. de cel..mL⁻¹);

μ – velocidade específica de crescimento (dia⁻¹);

t – tempo de cultivo (dias);

Equação exponencial

$$N = N_0 \cdot e^{(\mu \cdot t)} \quad (3)$$

4.4.3 Biomassa seca

A determinação da biomassa seca, gramas por litro de meio de cultivo (g.L⁻¹), foi realizada em triplicata por filtração a vácuo, com base na metodologia de Penteadó (2010). Três alíquotas de 15 mL do cultivo de microalgas foram filtradas, em papel de filtro quantitativo, com porosidade média de 8 µm, com auxílio de bomba à vácuo. Os filtros com as amostras de biomassa foram levados à estufa com temperatura de 60 °C até massa constante e tiveram suas massas quantificadas em balança analítica.

Para deduzir a umidade inicial dos filtros, três filtros tiveram suas massas quantificadas e foram levados à estufa nas condições anteriores até massa constante.

Determinação da umidade do papel de filtro em gramas (g):

$$U (g) = (F_2 - F_1) \quad (4)$$

onde:

F_1 – massa do papel de filtro úmido (g);

F_2 – massa do papel de filtro seco (g);

Determinação da biomassa seca em gramas por litros (g.L^{-1}):

$$B (\text{g.L}^{-1}) = \frac{(F_3 - F_1 - U)}{V} \quad (5)$$

onde:

F_3 – massa do papel de filtro com biomassa seca (g);

V – volume de meio de cultivo filtrado (L);

U – umidade inicial do papel de filtro (g);

4.4.4 Lipídios totais

A determinação de lipídios totais, em miligramas por litro de cultivo (mg.L^{-1}), foi realizada em triplicata com base na metodologia *Bligh & Dyer* adaptada de Rodriguez et al., (2007), que consiste na utilização de uma mistura monofásica de clorofórmio, metanol e água.

Foram separadas amostras de 5 mg de biomassa liofilizada da microalga em tubos de fundo cônico (tipo *Falcon*) de 15 mL. Adicionou-se às amostras 3 mL de solução de clorofórmio: metanol (2:1, v:v) e 10 μL de solução de butil-hidroxitolueno – BHT (1% em metanol). As amostras foram sonicadas por 3 ciclos de 15 minutos cada e em seguida incubadas por 24 horas a 4 °C protegidas da luz (embrulhadas em papel alumínio), para evitar a foto-oxidação.

As amostras foram sonicadas por 3 ciclos de 15 minutos e centrifugadas a 5000 rpm por 20 min. a 5 °C, a fase líquida foi recuperada e reservada (tubo 2). Adicionou-se 1,5 mL de solução clorofórmio: metanol à biomassa sedimentada e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores, a fase líquida foi recuperada e transferida ao reservado (tubo 2).

Adicionou-se 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio a fase líquida reservada (tubo 2), as amostras foram agitadas e centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. a 5 °C. A fase inferior foi recuperada e reservada em um *vial* (tubo 3) com massa previamente quantificada. A fase aquosa (tubo 2) foi lavada com 1 mL de clorofórmio, agitada e centrifugada nas mesmas condições anteriores, a fase inferior foi transferida ao *vial*. O *vial* foi levado à capela de exaustão, para o solvente evaporar. A seguir o *vial* teve sua massa novamente quantificada.

Determinação dos lipídios totais em mg.L^{-1} :

$$\text{Lipídios (mg.L}^{-1}\text{)} = \frac{(L_2 - L_1) \cdot B}{C} \cdot 1000 \quad (6)$$

onde:

L_1 – massa do *vial* vazio (g);

L_2 – massa do *vial* com lipídios (g);

C – biomassa seca (g);

Determinação dos lipídios totais em %:

$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{(L_2 - L_1) \cdot 100}{C} \quad (7)$$

4.5 TRATAMENTO DO MEIO DE CULTIVO

Foi definido que o processo de tratamento do meio de cultivo e o processo de recuperação da biomassa ocorreriam em uma única etapa. A recuperação da biomassa deverá ter eficiência tal que o meio clarificado não necessite de mais tratamento, além de filtração. Para recuperar as células da microalga *Scenedesmus* sp. do meio de cultivo utilizou-se o procedimento padrão de sedimentação precedida de floculação química.

Foram realizados experimentos com dois floculantes, hidróxido de sódio (NaOH) por ser utilizado nas pesquisas do NPDEAS e cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) por ser um dos constituintes do meio de cultivo utilizado nesse trabalho.

Para definir a concentração ideal de floculante para recuperar a biomassa, foram comparados os valores de absorvância do meio clarificado das amostras floculadas com o valor obtido no clarificado das amostras centrifugadas.

A eficiência, porcentagem de remoção das células, de cada um dos processos foi calculada por meio da equação 8.

Determinação da eficiência em porcentagem (%):

$$E(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_2}\right) \cdot 100 \quad (8)$$

onde:

A_1 – absorvância do meio clarificado;

A_2 – absorvância do cultivo;

A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro, reprodutibilidade de $\pm 0,05$ nm e precisão de $\pm 0,1$ nm, com comprimento de onda de 540 nm, em cubetas de poliestireno cristal com caminho óptico de 10 mm.

Para definir o floculante mais eficaz para tratar o meio de cultivo foram realizadas análises de lipídios totais, conforme descrito na seção 4.4.4, da biomassa recuperada com cada um dos floculantes e comparados com o valor encontrado na biomassa recuperada por centrifugação.

As metodologias, descritas a seguir, foram comparadas entre si e com o procedimento padrão de centrifugação, apenas uma foi escolhida para aplicação de rotina neste trabalho.

4.5.1 Centrifugação

A recuperação do meio de cultivo por centrifugação foi adaptado da metodologia descrita por Soares (2010), amostras de cultivo de microalga foram centrifugadas a 7000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Os testes foram realizados em duplicatas.

4.5.2 Floculação

Para definir a metodologia de recuperação do meio de cultivo por floculação foram realizados testes em duplicatas, com dois coagulantes distintos, mantendo fixo o tempo e as condições de agitação nas seguintes faixas: agitação rápida de 500 rpm por 5 segundos, agitação lenta de 250 rpm por 5 minutos e sedimentação de 10 minutos. As concentrações dos coagulantes foram variadas até encontrar a melhor coagulação.

4.5.2.1 Floculação com solução de cloreto férrico hexahidratado

Inicialmente uma amostra de 250 mL do cultivo de microalgas foi floculada com solução de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) com concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ seguindo as condições descritas na seção 4.5.2, com volume de solução

suficiente para obter uma solução final (cultivo + floculante) de $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ (SOARES, 2010). A partir de observação visual definiu-se que o volume de FeCl_3 deveria ser reduzido, assim, outros dois volumes foram testados, como apresenta a tabela 04.

TABELA 05 – VARIACÃO DE FeCl_3 NOS TESTES DE FLOCULAÇÃO

Floculante	Volume – mL	Concentração - mmol.L^{-1}
FeCl_3	0,75	0,3
	0,50	0,2
	0,25	0,1

4.5.2.2 Floculação com solução de hidróxido de sódio

Foi adicionado em uma amostra de cultivo, gradualmente, solução de NaOH com concentração de 1 mol.L^{-1} até se verificar uma elevação significativa do pH da solução, a partir deste foram calculados os demais volumes a serem testados, conforme mostra a tabela 05. Definidos os valores, amostras de 250 mL de cultivo de microalgas foram floculadas seguindo as condições descritas na seção 4.5.2.

TABELA 06 – VARIACÃO DE NaOH NOS TESTES DE FLOCULAÇÃO

Floculante	Volume – mL	Concentração – mmol.L^{-1}
NaOH	1,0	4
	1,5	6
	2,0	8

4.6 RECUPERAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

A microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada durante o período de cultivo, o cultivo foi floculado, conforme procedimento padrão definido para este trabalho. O meio clarificado foi filtrado em filtro a vácuo com membrana filtrante de celulose, de porosidade média de $8 \mu\text{m}$. A figura 08 mostra as etapas do tratamento do meio de cultivo.



FIGURA 08 – A – CULTIVOS DE MICROALGAS; B – RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA; C – MEIO CLARIFICADO; D – MEIO CLARIFICADO SEM FILTRAR; E – MEIO CLARIFICADO FILTRADO

4.6.1 Adição de nutrientes no meio de cultivo reciclado

A quantidade de nutrientes necessária para recuperar o meio de cultivo foi definida a partir de informações gerais sobre nutrição de microalgas e dados experimentais. Assim, foi adicionada solução de nitrato e fosfato nas mesmas concentrações que no meio fresco (100%) e realizado um experimento, em triplicatas, com cultivos (T) com diferentes concentrações da solução de metais:

- T₁: cultivo sem adição (0%) da solução de metais;
- T₂: cultivo com adição de 25% da solução de metais.

4.6.2 Avaliação do pós-tratamento do meio de cultivo

Foi definido na seção 4.6 que o meio de cultivo clarificado para compor o novo meio de cultivo passaria por filtração (pós-tratamento). Entretanto, as células presentes no meio clarificado podem ser utilizadas como inóculo do novo meio de cultivo. Assim, a necessidade de aplicar o pós-tratamento ao meio de cultivo foi definida a partir de dados experimentais. Para tanto, foi realizado um experimento com dois controles (B) em triplicatas:

- B₁: cultivo da microalga em meio reciclado filtrado (conforme seção 4.6);
- B₂: cultivo da microalga em meio reciclado sem filtrar.

Os cultivos foram preparados com as concentrações de nutrientes definidos a partir do experimento da seção 4.6.1 e acrescentando volume de inóculo equivalente a 10% do volume final (conforme definido na seção 4.3)

4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os valores de densidade celular, pH e absorvância, apresentados neste trabalho, são médias dos resultados das amostras de cada experimento, acompanhadas dos erros (desvio padrão) das amostras:

$$x' \pm 2S \quad (9)$$

onde:

x' – média aritmética dos valores das amostras;

S – desvio padrão;

Os desvios padrões foram multiplicados por dois para que o nível de significância dos erros abrangessem 95% dos valores das amostras, conforme mostra a figura 09.

Desvio padrão (S):

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^x (x_i - x')^2}{n - 1}} \quad (10)$$

onde:

x_i – valor de cada amostra;

n – número de amostras;

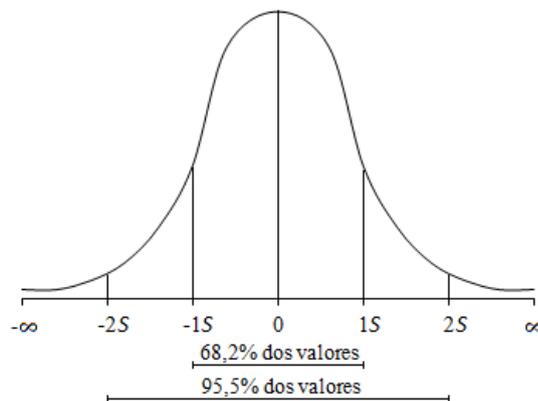


FIGURA 09 – DISTRIBUIÇÃO NORMAL SIMÉTRICA
 FONTE: MODIFICADO DE RODRIGUES (2008)

Os valores de biomassa e lipídios apresentados neste trabalho são médias dos resultados das equações, acompanhadas dos erros (propagação dos erros):

$$x'' \pm Z \quad (11)$$

onde:

x'' – média aritmética dos resultados das equações (de cada amostra);

Z – propagação do erro;

Propagação do erro (Z):

$$Z = \sqrt{x''^2 \cdot \left(\left(\frac{S_a}{x'_a} \right)^2 + \left(\frac{S_b}{x'_b} \right)^2 \right)} \quad (12)$$

onde:

S_a – desvio padrão de a ;

S_b – desvio padrão de b ;

x'_a – média aritmética de a ;

x'_b – média aritmética de b ;

Para comparar se duas amostras apresentavam diferenças significativas entre si, foi utilizado o teste T de *Student*, com auxílio do *software* Excel, com nível de significância de 5%. Considerando os testes bilaterais e variações distintas das amostras (heterocedástico).

Nível descritível do teste – p :

– $p > 0,05$ não houve diferença significativa entre a média das amostras;

– $p < 0,05$ houve diferença significativa entre a média das amostras

Para rejeitar um resultado de amostragem foi aplicado o teste Q de *Dixon* com nível de confiança de 90%.

Rejeitar o valor menor:

$$Q_{xa} = \frac{x_{a+1} - x_a}{x_n - x_1} \quad (13)$$

onde:

x_1 – primeiro valor de um conjunto de n amostras organizadas em ordem crescente;

x_n – último valor de um conjunto de n amostras organizadas em ordem crescente;

x_a – valor menor de um conjunto de n amostras ;

x_{a+1} – próximo valor acima de x_a ;

Rejeitar o valor maior:

$$Q_{xb} = \frac{x_b - x_{b-1}}{x_n - x_1} \quad (14)$$

onde:

x_b – valor maior de um conjunto de n amostras organizadas em ordem crescente;

x_{b-1} – próximo valor abaixo de x_b ;

– Se $Q_{cal} > Q_{Tab\%}$, o valor é considerado disperso e pode ser rejeitado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada durante vinte um dias, nesse período foram realizadas análises de biomassa seca e lipídios totais, a fim de definir a produtividade de biomassa seca e lipídios totais e delimitar um período ideal para os próximos cultivos realizados.

Para reduzir custos e perdas durante o processo de reciclagem, foi definido que o processo de recuperação da biomassa e o tratamento do meio de cultivo seria um único processo. Esta etapa é identificada como tratamento do meio de cultivo e teve eficiência tal que permitisse recuperar as células presentes no meio e que o mesmo seja utilizado para compor um novo meio de cultivo, sem que haja necessidade de um pós-tratamento.

Em seguida a microalga foi cultivada em meio totalmente reciclado, adicionando nutrientes e inóculo, a fim de verificar se a microalga *Scenedesmus* sp. poderia ser cultivada em meio reciclado sem que ocorressem perdas de biomassa e lipídios.

5.1 CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. EM MEIO DE CULTIVO GUILLARD – “F/2” MODIFICADO

5.1.1 Cinética de crescimento

A fim de definir a cinética de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp., esta foi cultivada em meio *Guillard* – “F/2” modificado, durante 21 dias. O crescimento celular, em cada controle, foi avaliado a partir da determinação da densidade celular em função do tempo, pois permite obter resultados imediatos sobre a evolução dos cultivos, definir a velocidade de crescimento, densidade celular mínima e máxima da espécie.

A figura 10 representa a cinética de crescimento da microalga, com os ajustes logístico e exponencial, calculados a partir das equações apresentadas na seção 4.4.2. O crescimento foi exponencial apenas nos quatro primeiros dias e para todo o período

de cultivo, 21 dias, os dados se ajustaram bem à equação logística. Assim, este foi aplicado como ajuste padrão para as demais curvas de crescimento celular apresentadas nesse trabalho.

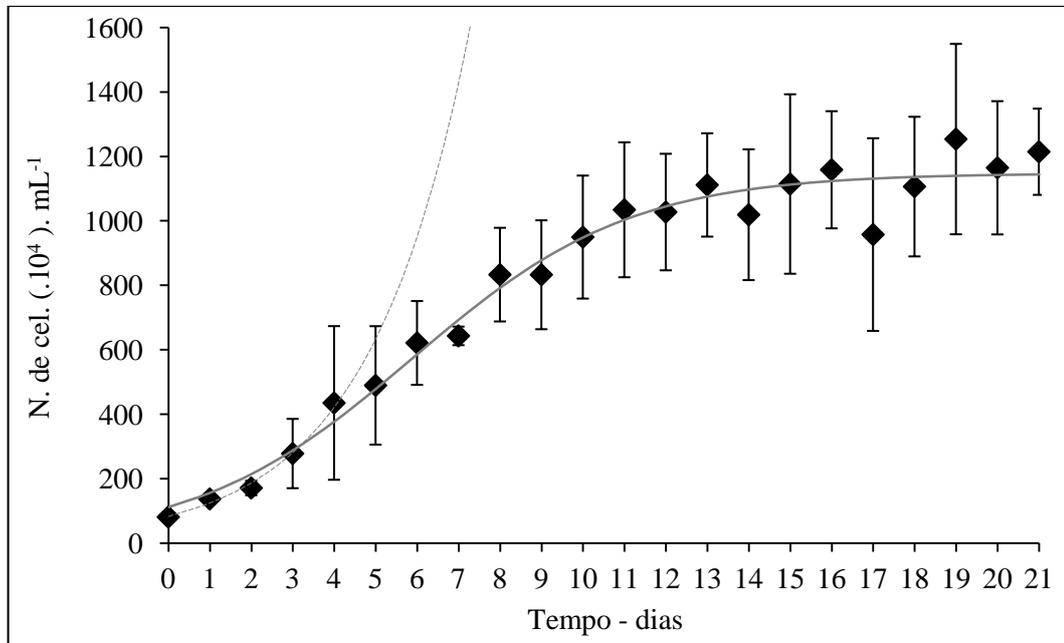


FIGURA 10 – CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. (♦: DENSIDADE CELULAR; —: AJUSTE LOGÍSTICO; ---: AJUSTE EXPONENCIAL)

É possível reconhecer as diferentes fases do cultivo na curva de crescimento, com as quais se define a continuidade deste. Na primeira fase do cultivo, fase *lag* ou de adaptação, o comportamento inicial depende das condições das células do inóculo, alterações nas condições do ambiente e do meio e destas o êxito do novo cultivo (VEGA; VOLTOLINA, 2007a). A curva representada na figura 10 não apresentou esta fase, indicando que as condições do cultivo foram ideais ao desenvolvimento celular.

Do início ao quarto dia, o cultivo se encontrava na fase exponencial, como não há fatores limitantes, a concentração celular aumenta rapidamente, neste período a velocidade de crescimento tem seu valor máximo ($\mu = 0,4068.\text{dia}^{-1}$ para a microalga *Scenedesmus* sp.). Do quarto ao oitavo dia o cultivo esteve na fase de desaceleração, nesta fase começam a reduzir as divisões celulares ($\mu = 0,1573.\text{dia}^{-1}$) em função da disponibilidade reduzida de nutrientes e de fatores limitantes do crescimento. Do oitavo ao vigésimo primeiro dia, o cultivo esteve na fase estacionária, nesta fase as condições de cultivo são limitantes e a taxa de natalidade é igual à mortalidade ($\mu =$

0,0251.dia⁻¹), este comportamento ocorre em função da baixa concentração de nutrientes, aumento do pH, excesso de oxigênio ou pouca iluminação devido a alta concentração de biomassa (efeito de autossombreamento).

A tabela 07 apresenta a densidade celular inicial (N_0), máxima (N_{max}) e a velocidade de crescimento (μ_{max}) da microalga *Scenedesmus* sp.. Ao comparar estes dados com o de outras microalgas encontradas na literatura, nota-se que a *Scenedesmus* sp. tem velocidade de crescimento reduzida e pouca produtividade celular. Entretanto, uma baixa densidade celular não indica que a microalga possua baixa produtividade de lipídios (SOARES, 2011), portanto há a necessidade de verificar a produção de biomassa e lipídios da microalga *Scenedesmus* sp. para definir a sua produtividade máxima.

TABELA 07 – ANÁLISE CINÉTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. PELOS AJUSTES DAS EQUAÇÕES LOGÍSTICA E EXPONENCIAL

Parâmetros	Equação Logística	Equação Exponencial
N_0 (cel..10 ⁴ .mL ⁻¹)	124,0972	82,9966
N_{max} (cel..10 ⁴ .mL ⁻¹)	1148,1326	-
μ_{max} (dia ⁻¹)	0,3792	0,4068
Intervalo (dia)	0 – 21	0 – 4

5.1.2 Produtividade de biomassa seca e de lipídios totais da microalga *Scenedesmus* sp.

Devido a falta de informações sobre o desenvolvimento celular da microalga cultivada neste trabalho, tornou-se indispensável realizar análises de produtividade de biomassa seca e conteúdo lipídico, para determinar a produtividade da microalga. Foram coletadas amostras dos cultivos, a cada dois dias, para realizar as análises de biomassa seca e lipídios totais, com o intuito de definir o período ideal de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp..

A figura 11 apresenta a produtividade de biomassa seca em g.L⁻¹ calculada a cada dois dias do período de cultivo, essa foi crescente até o 18º dia e decresceu do 18º para o 21º.

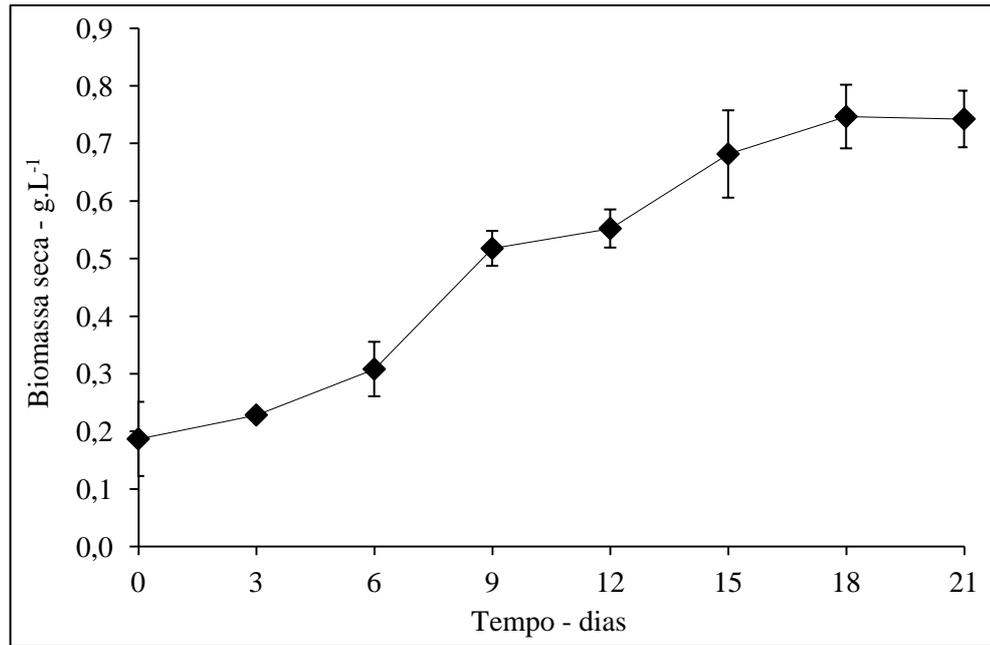


FIGURA 11 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA

A maior produtividade de biomassa seca foi observada no 18º dia do cultivo (destacado na tabela 08), com $0,75 \text{ g.L}^{-1}$. Para o mesmo período de cultivo utilizado por Mello et al. (2010), a produção da biomassa encontrada neste trabalho foi superior em 21%.

TABELA 08 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA

Dia	Biomassa seca (g.L^{-1})	Erro
0	0,19	$\pm 0,064$
3	0,23	$\pm 0,004$
6	0,31	$\pm 0,047$
9	0,52	$\pm 0,030$
12	0,55	$\pm 0,033$
15	0,68	$\pm 0,076$
18	0,75	$\pm 0,055$
21	0,74	$\pm 0,049$

A redução da biomassa no 21º indica limitação das condições de cultivo, nutrientes, aeração e luminosidade. Como a biomassa está relacionada ao conteúdo celular das microalgas, composição e teor lipídico (VEGAb; VOLTOLINA, 2007), quando a disponibilidade de nutrientes do meio torna-se limitante, as microalgas

passam a consumir as energias armazenadas, reduzindo a massa celular do cultivo (biomassa), assim, dar continuidade ao cultivo implica em perdas do conteúdo metabólico das células.

As microalgas pertencentes ao gênero *Scenedesmus*, de acordo com a literatura, podem apresentar teores lipídicos variados, algumas espécies quando cultivadas em meio de cultivo otimizado alcançam teor lipídicos na ordem de 70%. Assim torna-se necessária uma avaliação das taxas de lipídios produzidos pela microalga utilizada neste trabalho.

Durante o período de cultivo ocorre uma variação significativa do conteúdo lipídico nas células da microalga, do início ao 18º dia aproximadamente triplica o teor lipídico (tabela 09).

TABELA 09 – PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS TOTAIS NA BIOMASSA SECA

Dia	Lipídios totais (%)	Erro
0	10,8	± 0,414
3	19,6	± 5,779
6	20,3	± 3,417
9	21,3	± 0,968
12	20,2	± 2,183
15	24,5	± 1,901
18	29,0	± 2,712
21	25,0	± 6,364

A figura 12 mostra que o aumento na porcentagem de lipídios totais nas células ocorre na fase estacionária do crescimento. Para diferentes gêneros de microalgas as concentrações de lipídios são menos abundantes na fase exponencial de crescimento, pois ocorre uma alta demanda de energia, e tendem aumentar na fase estacionária, quando as células passam acumular reservas energéticas devido a limitação de nutrientes no ambiente (EMDADI; BERLAND, 1989; FERNANDEZ-REIRIZ et al., 1989). Assim, quando as microalgas são cultivadas para produção de lipídio, finalizar o cultivo antes da fase estacionária pode ocorrer perdas de lipídios.

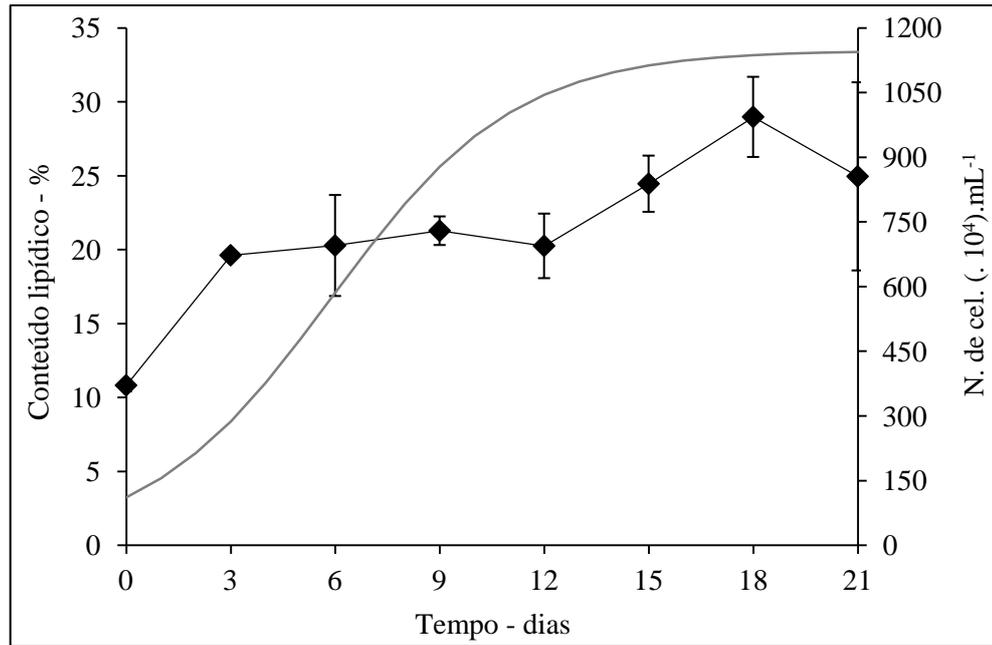


FIGURA 12 – PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS TOTAIS NA BIOMASSA SECA (◆: LIPÍDIOS TOTAIS; —: DENSIDADE CELULAR - AJUSTE LOGÍSTICO)

O reduzido teor lipídico (29%) apresentado por essa microalga pode ser decorrente da alta concentração de nitrato no meio de cultivo, pois, o meio *Guillard* “F/2” modificado apresenta relação da taxa de nitrato:fosfato igual a 25:1 quando o ideal seria 16:1. O que pode direcionar o metabolismo da microalga para a produção de carboidratos, triglicerídeos saturados e lipídios neutros e diminuir o teor de ácidos graxos polinsaturados (MARKOU et al., 2012; SIRON et al., 1989).

Quando comparada a microalga cultivada neste trabalho com as microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum tricornutum* o conteúdo lipídico (%) dessa foi duas vezes maior para o mesmo tempo de cultivo, indicando o potencial da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel (MANDAL; MALLICK, 2009; MORAIS, 2011).

A figura 13 mostra o conteúdo lipídico do meio em mg.L⁻¹. Observa-se que ocorre um aumento significativo deste até o 18º dia, porém, no 21º primeiro ocorre um decréscimo, provavelmente em consequência do consumo de energia pelas próprias células, em função das condições limitantes do cultivo. A produtividade de lipídios nesse sistema foi superior em 16 e 17% quando comparada com os resultados de Ribeiro et al. (2012) e Mello et al. (2010), respectivamente, considerando o mesmo tempo utilizado nos cultivos de ambos os autores.

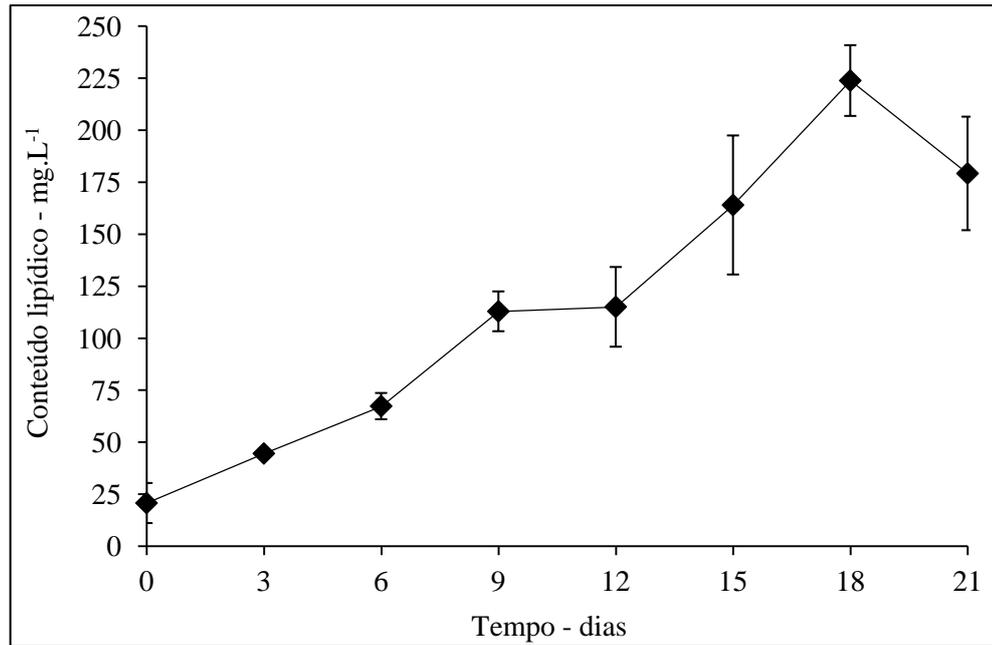


FIGURA 13 – PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS TOTAIS

5.2 PERÍODO DE CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp.

Para definir o período de cultivo que será aplicado nos demais experimentos foi considerada a variação da produtividade diária de biomassa e do conteúdo lipídico da microalga cultivada.

A tabela 10 apresenta a produtividade diária de biomassa seca ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) da microalga *Scenedesmus* sp.. Observa-se que essa alcançou seu maior valor no 9º dia de cultivo, aproximadamente $0,037 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de biomassa e para os dias seguintes foi decrescente.

TABELA 10 – PRODUTIVIDADE DIÁRIA DE BIOMASSA SECA

Dias	Biomassa seca ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	Erro
3	0,026	$\pm 0,000$
6	0,020	$\pm 0,003$
9	0,037	$\pm 0,002$
12	0,030	$\pm 0,002$
15	0,033	$\pm 0,004$
18	0,031	$\pm 0,002$
21	0,026	$\pm 0,002$

A figura 14 mostra que a produtividade de biomassa seca ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) pela microalga sofre redução significativa do 3º para o 6º dia de cultivo, aumentando no 9º dia e decrescendo até o 21º dia. Em relação a biomassa, pode-se afirmar que a continuidade do cultivo, depois do nono dia, não seria mais viável.

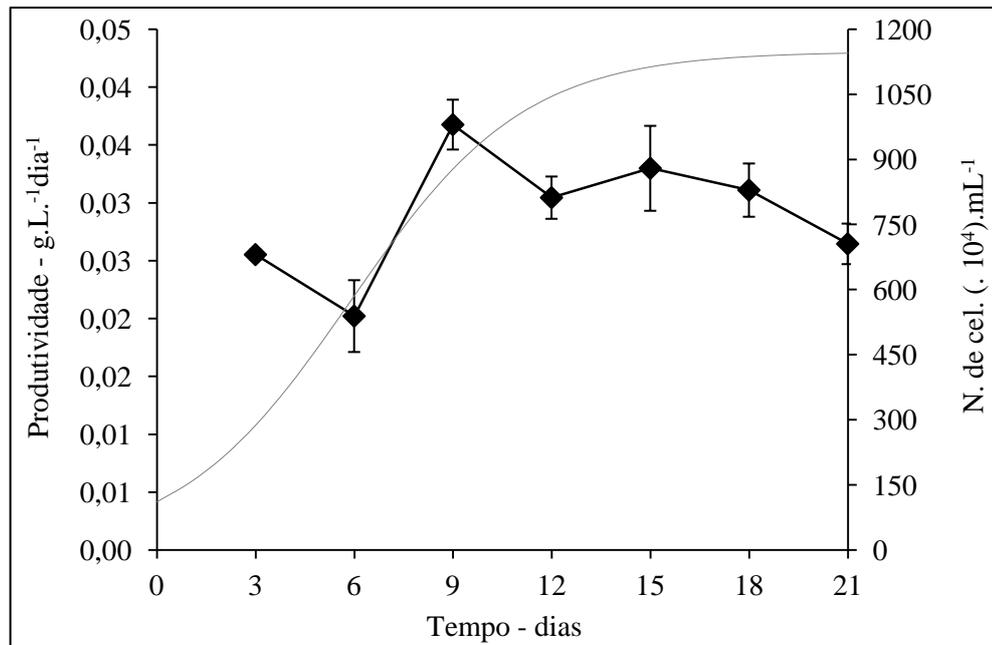


FIGURA 14 – PRODUTIVIDADE DIÁRIA DE BIOMASSA SECA (♦: BIOMASSA SECA; —: DENSIDADE CELULAR - AJUSTE LOGÍSTICO)

A tabela 11 apresenta a produtividade diária de lipídios ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). Observa-se que esta apresentou pequenas variações durante o cultivo, e que no 18º teve o maior valor da produtividade de lipídios no meio de cultivo.

TABELA 11 – PRODUTIVIDADE DIÁRIA DE LIPÍDIOS TOTAIS

Dias	Lipídios ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	Erro
3	7,94	$\pm 0,23$
6	7,76	$\pm 0,73$
9	10,24	$\pm 0,87$
12	7,86	$\pm 1,31$
15	9,55	$\pm 1,95$
18	11,28	$\pm 0,86$
21	7,54	$\pm 1,15$

A figura 15 mostra que há uma redução da produtividade no início do cultivo, esta é maior para o 3º do que no 6º dia de cultivo. Esse decréscimo pode ser entendido como os lipídios acumulados durante o cultivo do inóculo, pois segundo a literatura, é na fase estacionária do cultivo que ocorre o acúmulo de lipídios. Observa-se uma redução da produtividade de lipídios do 18º para o 21º dia de cultivo, o que permite descartar a continuidade do cultivo em 21 dias. Também o incremento de lipídios totais que podem ocorrer nas células do 9º ao 18º di não é significativa e, justifica a continuidade do cultivo além de nove dias após a inoculação. Portanto, foi definido como período padrão para os futuros experimentos deste trabalho, nove dias de cultivo.

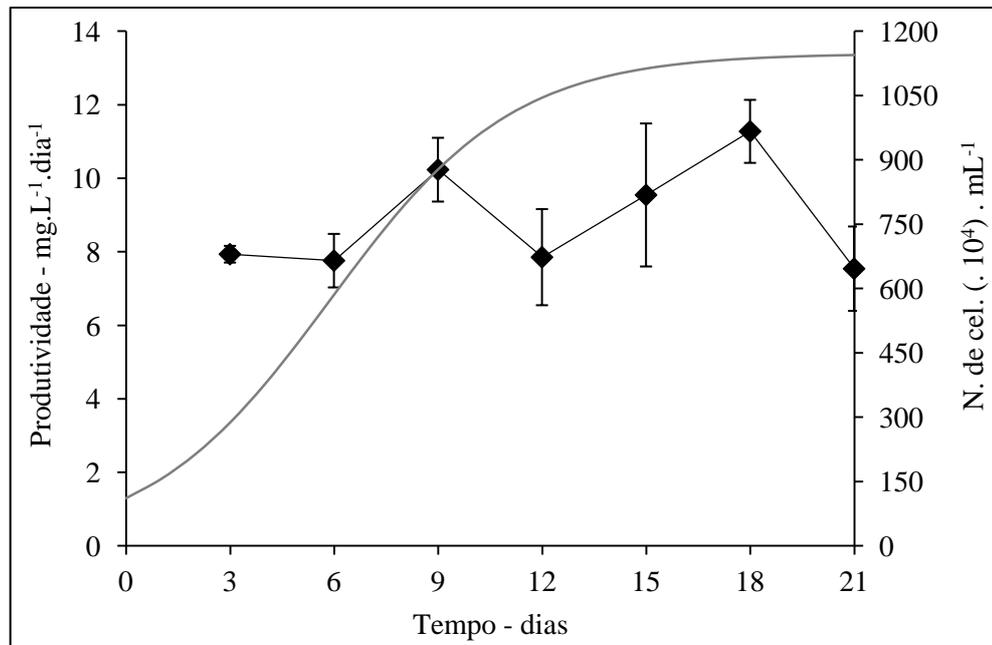


FIGURA 15 – PRODUTIVIDADE DIÁRIA DE LIPÍDIOS TOTAIS (♦: LIPÍDIOS TOTAIS; —: DENSIDADE CELULAR - AJUSTE LOGÍSTICO)

5.3 TRATAMENTO DO MEIO DE CULTIVO

Para não alterar os custos da produção de microalgas e não aumentar a quantidade de espécies químicas no meio de cultivo reciclado, que poderiam impedir o crescimento das microalgas, foi definido que o processo de tratamento do meio de cultivo clarificado deveria ser o próprio processo de recuperação da biomassa. Assim,

recuperação da biomassa deverá ter eficiência tal que o meio clarificado não necessite mais tratamento, além de filtração.

Com o intuito de identificar processo de tratamento do meio de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp., a microalga foi cultivada durante nove dias. O mesmo cultivo foi utilizado para realizar os testes de centrifugação, floculação com FeCl_3 e NaOH , conforme procedimentos descritos na seção 4.5, e definir a concentração de floculante ideal para recuperar as células do meio de cultivo.

A figura 16 representa o valor da absorbância e pH do meio clarificado com NaOH para cada concentração de floculante utilizada, para obter uma alta remoção de células do cultivo foi necessário aumentar o pH da amostra em 3,43, devido que o pH inicial da amostra já estava alcalino (8,37).

Observa-se que a amostra com concentração de floculante igual a 8 mmol.L^{-1} (figura 16 e 17-A) apresentou significativa recuperação das células quando comparado com a amostra com 4 e 6 mmol.L^{-1} .

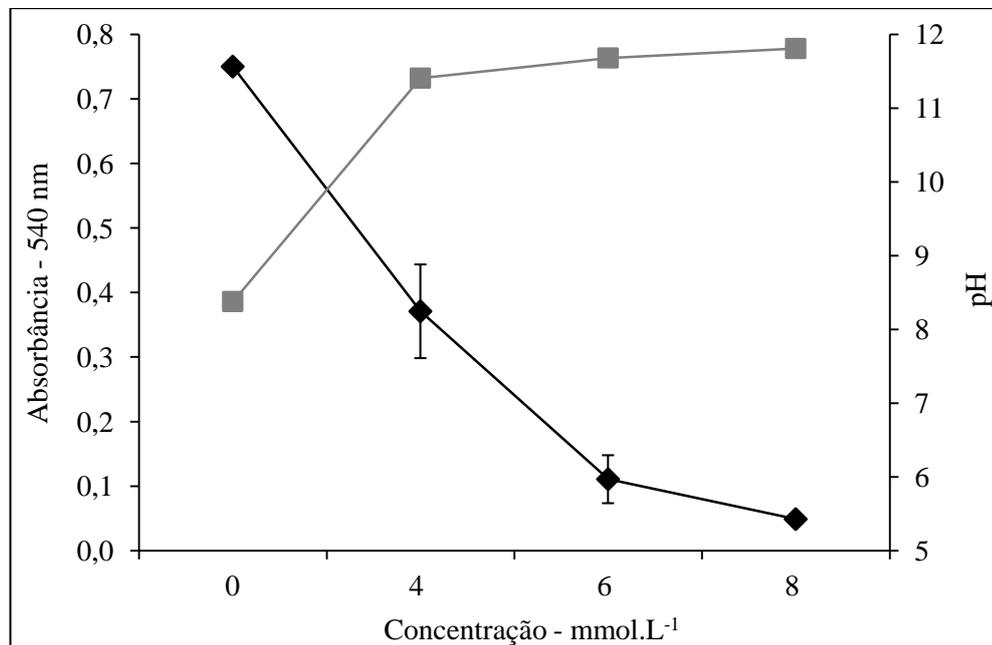


FIGURA 16 – VARIACÃO DA ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO INCREMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE NaOH NO MEIO CLARIFICADO (♦: ABSORBÂNCIA; ■: pH)

Devido a elevada solubilidade do hidróxido de sódio na água, $\pm 27 \text{ mol.L}^{-1}$, a floculação não ocorre por precipitação do hidróxido e sim, por meio de incremento do pH da solução, que desestabiliza as células e permite a precipitação.



FIGURA 17 – MEIO DE CULTIVO CLARIFICADO POR FLOCULAÇÃO: A – NaOH 4; 6 E 8 mmol.L^{-1} ; B – FeCl_3 0,1; 0,2 E 0,3 mmol.L^{-1}

As figuras 17-B e 18 mostram que a maior recuperação de células foi obtida na amostra com concentração de flocculante igual a $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ de FeCl_3 , pois, a amostra com $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ apresentou aumento no valor da absorbância, indicando perda da capacidade de recuperar a biomassa ou excesso de ferro na solução.

Quando utilizado na floculação cloreto férrico há formação de compostos hidrolisados polinucleados que precipitam com as células. Durante a dispersão do sal na amostra ocorre a formação de ácido clorídrico, que reduz o pH do meio clarificado (figura 18), $\pm 1,51$ para uma concentração de $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ de FeCl_3 .

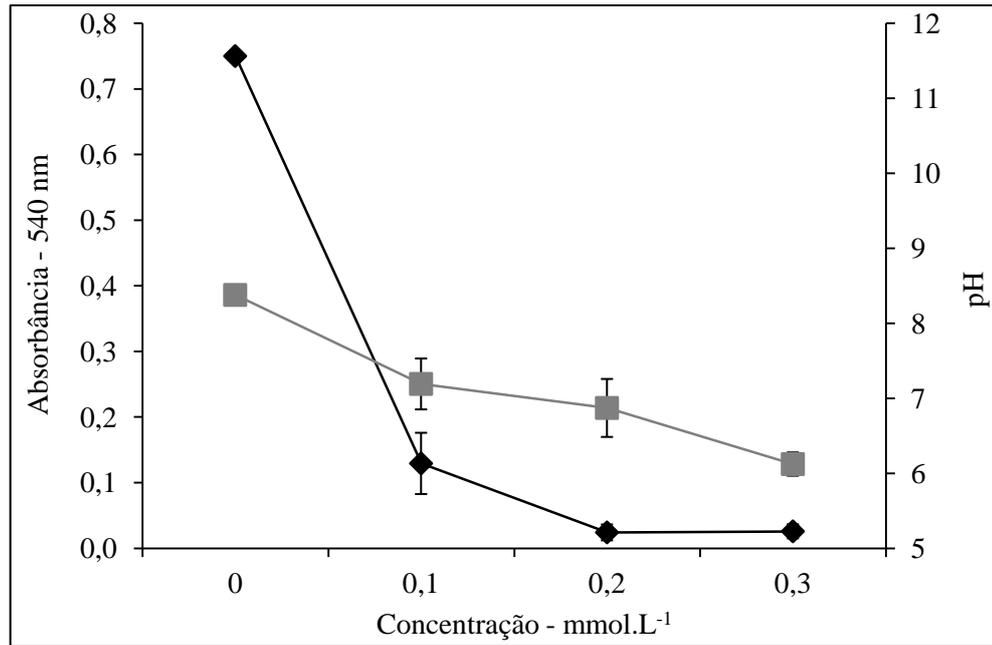


FIGURA 18 – VARIACÃO DA ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO INCREMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE FeCl_3 NO MEIO CLARIFICADO (◆: ABSORBÂNCIA; ■: pH)

A tabela 12 apresenta a porcentagem de recuperação da biomassa, calculada a partir da absorbância do meio clarificado, para cada teste realizado. Foram selecionadas as concentração de floculante NaOH e FeCl_3 que permitiram recuperar a biomassa na mesma proporção que a centrifugação (destacado na tabela 12) para definir o processo de floculação mais eficaz de tratamento do meio de cultivo.

TABELA 12 – EFICIÊNCIA DOS PROCESSOS AVALIADOS EM RECUPERAR BIOMASSA

Processo		Eficiência
Centrifugação		91,7%
Floculação NaOH / sedimentação (mmol.L ⁻¹)	4	50,6%
	6	85,3%
	8	93,5%
Floculação FeCl_3 / sedimentação (mmol.L ⁻¹)	0,1	82,8%
	0,2	96,8%
	0,3	96,6%

A figura 19 representa a eficiência de cada processo selecionado, em clarificar o cultivo de microalgas. Ambos os processos apresentaram eficiência superior a 90%,

porém, a floculação com FeCl_3 teve eficiência de 96,8%, indicando que o processo de floculação / sedimentação com FeCl_3 é o mais eficiente para recuperar as células dos cultivos de microalga *Scenedesmus* sp..

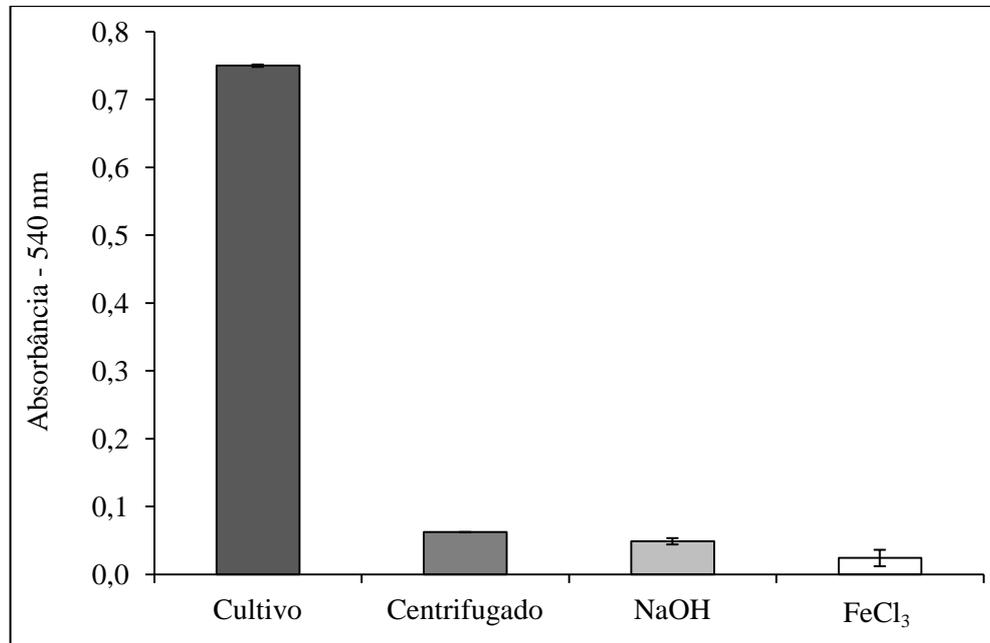


FIGURA 19 – EFICIÊNCIA NA CLARIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO POR CENTRIFUGAÇÃO, FLOCULAÇÃO COM $\text{NaOH} - 8 \text{ mmol.L}^{-1}$ E COM $\text{FeCl}_3 - 0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$

Ao comparar a eficiência da floculação com cloreto férrico encontrada no presente trabalho com dados da literatura, essa obteve melhor taxa de recuperação de células. Na recuperação da biomassa com combinação de coagulantes catiônicos, realizada por Kim et al. (2011) a melhor eficiência foi obtida com cloreto de cálcio (10 mmol.L^{-1}) e cloreto férrico ($0,26 \text{ mmol.L}^{-1}$), que permitiu recuperar mais de 90% das células dos cultivos de *Scenedesmus* sp. enquanto que outras combinações de floculantes tiveram eficiência inferior a 80%. Mesmo para a análise estatística, utilizando superfícies de resposta, a eficiência máxima seria de 91,3% para floculação com cloreto de cálcio e cloreto férrico com concentração de $9,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $0,22 \text{ mmol.L}^{-1}$ respectivamente.

A avaliação da eficácia dos processos de recuperação da biomassa por floculação (figura 20) permitiu identificar uma redução do teor lipídicos de 3,03% ao comparar a biomassa recuperada por floculação com FeCl_3 com a recuperada por

centrifugação, porém, ao comparar o teor lipídico da biomassa recuperada com NaOH, a redução do teor lipídico foi de 19,70 % em relação a biomassa recuperada por centrifugação. Indicando que o uso de NaOH como agente floculante rompe a parede celular, levando a perdas do conteúdo das células das microalgas *Scenedesmus* sp..

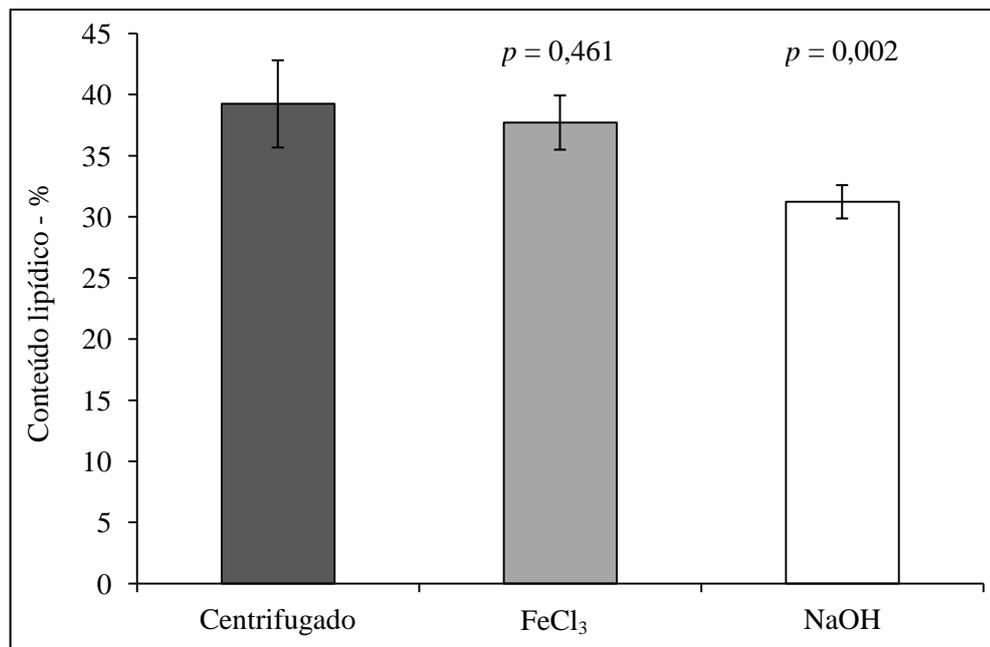


FIGURA 20 – TEOR LIPÍDICO PRESENTE NA BIOMASSA RECUPERADA POR CENTRIFUGAÇÃO, FLOCULAÇÃO COM 8 mmol.L⁻¹ DE NaOH E COM 0,2 mmol.L⁻¹ DE FeCl₃

Com base no resultado do teste T de *Student* observa-se que há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados de lipídios totais das amostras de biomassa recuperadas por floculação com NaOH e centrifugadas, indicando que o hidróxido de sódio é agressivo às células, ao contrário do cloreto férrico, cujos resultados de lipídios totais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparado com as amostras centrifugadas, o que permite afirmar que o uso de NaOH como agente floculante não seria viável na recuperação de células da microalga *Scenedesmus* sp..

Portanto, definiu-se como processo padrão de tratamento do meio de cultivo e recuperação da biomassa dos cultivos realizados neste trabalho a sedimentação precedida por floculação com cloreto férrico. Este, além de ter melhor eficiência de recuperar a biomassa e não agredir as células, não gera alteração significativa do pH do meio, assim, não se faz necessário ajustar o pH do meio de cultivo. O cloreto

férrico também é um dos componentes do meio de cultivo da microalga, assim, o aumento de sais durante as etapas de reciclagem será menor, ao contrário do que ocorreria se o cultivo fosse flocculado com NaOH.

5.4 RECICLAGEM DO MEIO DE CULTIVO

Para definir se a microalga *Scenedesmus* sp. poderia ser cultivada em meio reciclado, foi realizado um cultivo com meio fresco. A figura 21 apresenta o crescimento celular do cultivo. Devido ao aumento da fase *lag* (destacada na figura 21) não foi possível ajustar a equação logística aos dados dos dois dias iniciais do cultivo.

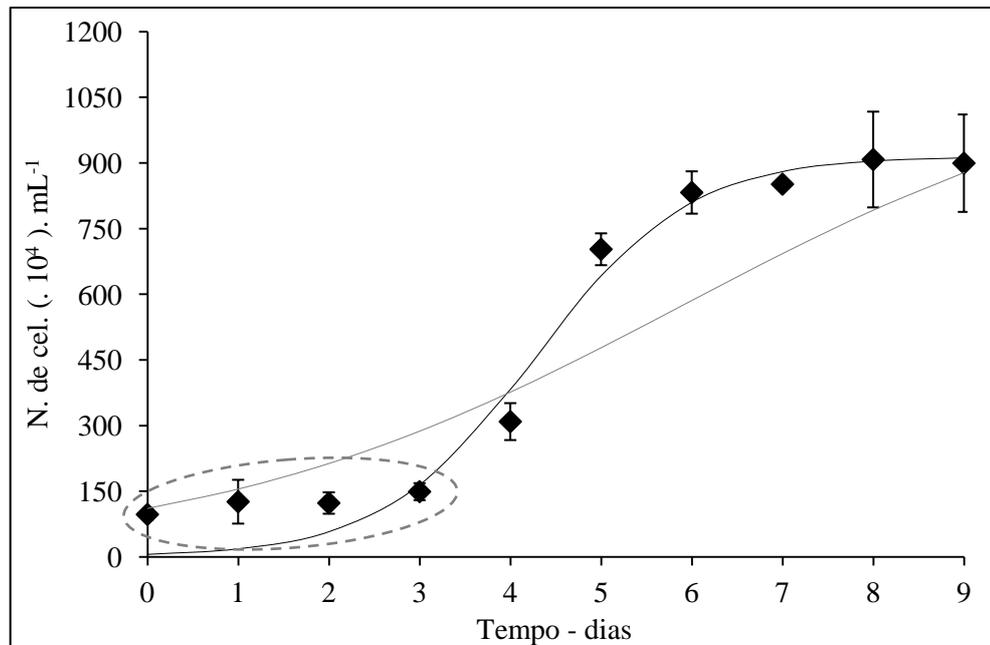


FIGURA 21 – CURVA DE CRESCIMENTO DO CULTIVO C₂ UTILIZADO PARA COMPOR OS MEIOS DE CULTIVOS RECICLADOS T₁ E T₂. (♦: DENSIDADE CELULAR; —: AJUSTE LOGÍSTICO - C₂; - - - : AJUSTE LOGÍSTICO - C₁)

A análise cinética, apresentada na tabela 13, das curvas de crescimento das figuras 10 e 21, C₁ e C₂, respectivamente, mostra que o cultivo C₂ sofreu alteração significativa nos parâmetros para que os dados fossem ajustados a equação logística, houve redução da densidade celular inicial e máxima e aumento da velocidade máxima de crescimento. Devido ao aumento da velocidade de crescimento o C₂ entrou na fase estacionária do crescimento antes que o C₁ (figura 21).

TABELA 13 – ANÁLISE CINÉTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA PELO AJUSTE DA EQUAÇÃO LOGÍSTICA

Parâmetros	Cultivo C ₁	Cultivo C ₂
N ₀ (cel..10 ⁴ .mL ⁻¹)	96,0767	6,7317
N _{max} (cel..10 ⁴ .mL ⁻¹)	949,4047	915,1790
μ _{max} (dia ⁻¹)	0,4821	1,1862
Intervalo (dia)	0 – 9	0 – 9

As alterações apresentadas na cinética de crescimento são respostas a alguma mudança nas condições de cultivo, temperatura, fluxo de ar, entre outros, que afeta o desenvolvimento da microalga. Em decorrência dessas alterações, os dados dos cultivos subsequentes não foram mais ajustados a equação logística.

A partir da análise da curva de crescimento (figura 21), é possível afirmar que a quantidade de nutriente, antes disponível no meio, já foi consumida pelas microalgas, pois, no sexto dia o crescimento do cultivo já se encontrava na fase estacionária, indicando que a quantidade de nutriente não era mais suficiente para as microalgas se multiplicarem.

A quantidade de nutriente a ser adicionada ao meio reciclado foi definida com base em informações gerais sobre nutrição das microalgas. Como o nitrogênio é constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário e o fósforo está envolvido em trocas energéticas e na constituição de moléculas estruturais, esses dois nutrientes foram adicionados ao meio reciclado nas mesmas concentrações que no meio fresco. Como os metais são micronutrientes, destes o mais requerido é o ferro e será adicionado ao meio de cultivo durante a floculação. Definiu-se por fazer duas variações significativas na quantidade de solução de metais a ser adicionada ao meio reciclado (ÖRDÖG et al., 2011; LOURENÇO, 2006; SIRON et al., 1989; MARKOU et al., 2012).

Ao término do período de cultivo (nove dias) da microalga, o meio foi tratado conforme procedimento padrão definido na seção 4.6 e 5.3. O meio clarificado foi utilizado para compor o meio de cultivo de dois experimentos T₁ e T₂, adicionando nutrientes conforme a tabela 14 e 10% do volume de meio de cultivo de inóculo.

TABELA 14 – CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES NOS CULTIVOS COM MEIO RECICLADO

Experimento	T ₁	T ₂
Nitrato	100%	100%
Fosfato	100%	100%
Metais	0%	25%

5.4.1 Cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. em meio fresco e reciclado

Os dois experimentos (T₁ e T₂) e o controle (T₀) foram realizados em triplicatas. O crescimento celular dos cultivos é apresentado nas figuras 22 e 23.

A figura 22 mostra um deslocamento da fase *lag* para o cultivo em meio reciclado sem adição de solução de metais (T₁) quando comparado com o cultivo em meio fresco (T₀), entretanto estas diferenças não são significativas segundo o resultado do teste T de *Student*, porém, no 7º e 8º dia do cultivo há diferenças significativas ($p < 0,05$) no número de células.

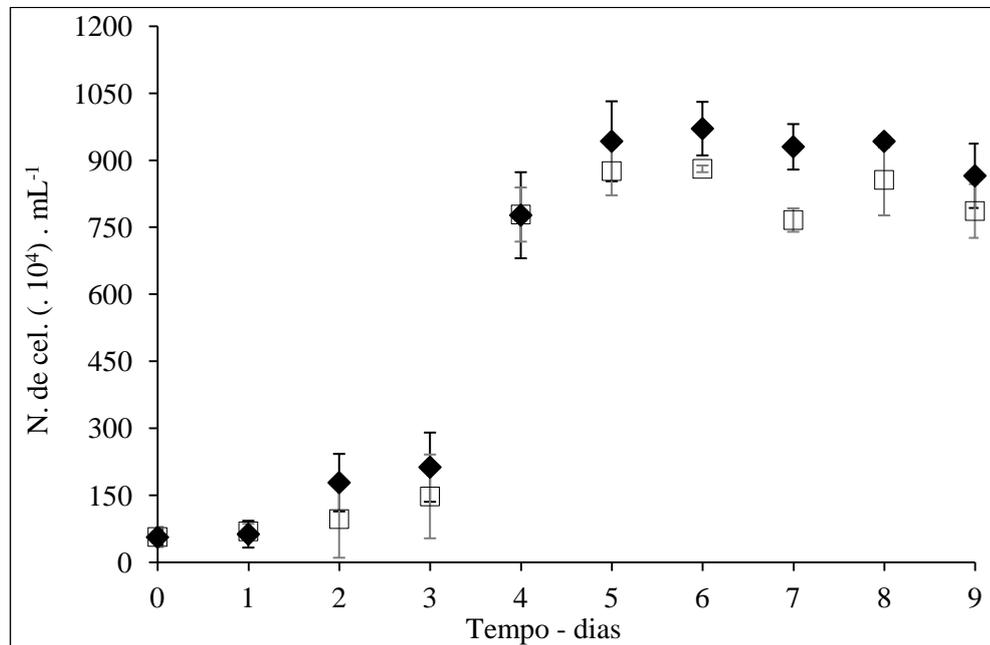


FIGURA 22 – CURVAS DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS COM MEIO FRESCO – T₀ E RECICLADO – T₁ (♦: T₀; □: T₁)

A variação no número de células que ocorre nos últimos dias do cultivo T₁ não pode ser atribuída a ausência de ferro, pois a variação de 0 para 12 nmol.L⁻¹ da

concentração de ferro no meio leva a um aumento do crescimento em $\pm 500 \cdot 10^4$ cel.mL⁻¹ (LIU et al., 2008). Assim estas variações podem ser atribuídas à falta dos micronutrientes que não foram adicionados aos cultivos ou à alterações nas condições de cultivo.

A figura 23 apresenta o cultivo com meio fresco (T₀) e meio reciclado com adição de 25% de solução de metais (T₂). Ao contrário do meio reciclado T₁, o meio reciclado T₂ não apresenta variações significativas durante todo o período de cultivo ao ser comparado com o cultivo em meio fresco (T₀).

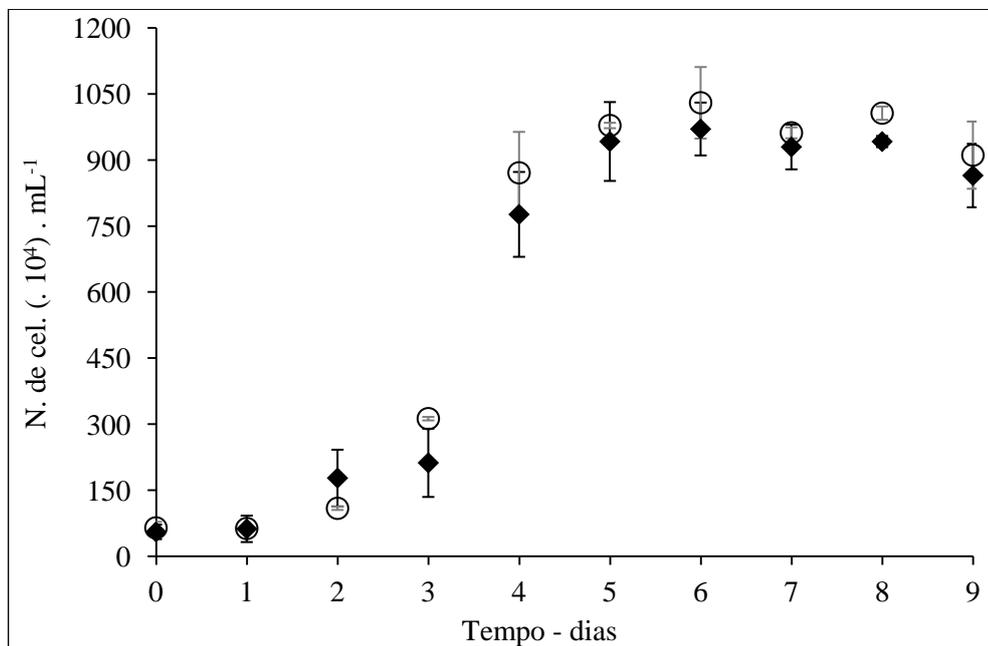


FIGURA 23 – CURVAS DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS COM MEIO FRESCO – T₀ E RECICLADO – T₂ (♦: T₀; ○: T₂)

5.4.2 Produtividade de biomassa seca e de lipídios totais da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em meio fresco e reciclado

Para identificar se a reciclagem do meio de cultivo não levaria a alterações das taxas metabólicas das células, no 9º dia de cultivo foram realizadas análises de biomassa seca e de lipídios dos cultivos com meio fresco (T₀) e reciclado (T₁ e T₂).

A variação na média da biomassa seca apresentada na figura 24, $\pm 0,1$ g.L⁻¹ dos cultivos T₁ e T₂ em relação ao cultivo T₀, não é significativa. Conforme o resultado do teste T de Student $p > 0,05$.

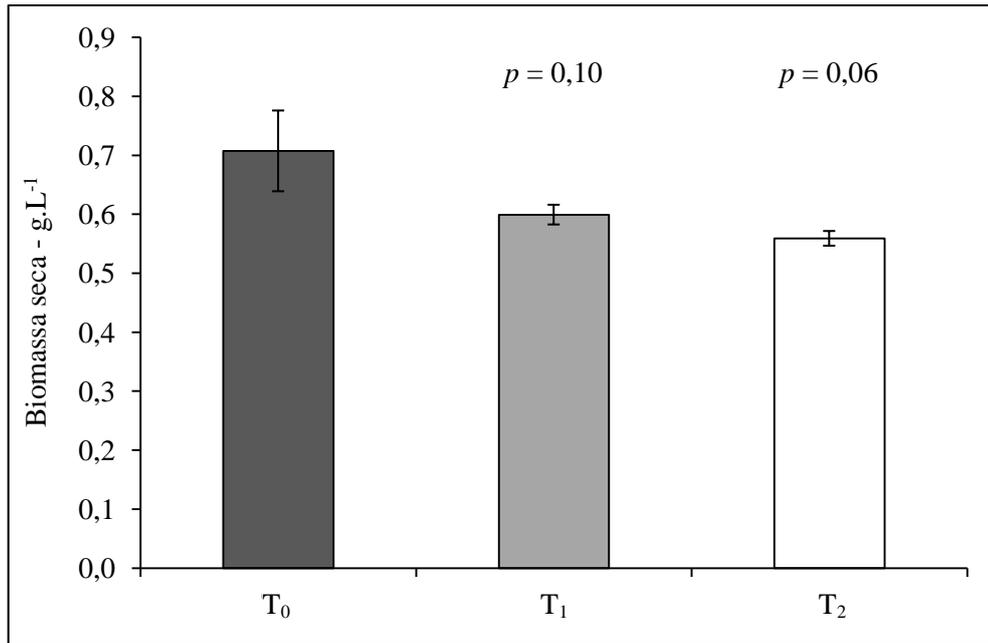


FIGURA 24 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA NO 9º DIA DE CULTIVO EM MEIO FRESCO – T₀ E RECICLADO – T₁ E T₂

A figura 25 apresenta o conteúdo lipídico (%) dos cultivos T₀, T₁ e T₂. O cultivo com meio reciclado T₁ sofreu redução do conteúdo lipídico, sendo significativamente menor que o cultivo em meio fresco ($p < 0,05$). Entretanto o cultivo com meio reciclado T₂ manteve o conteúdo lipídico semelhante ao do cultivo T₀.

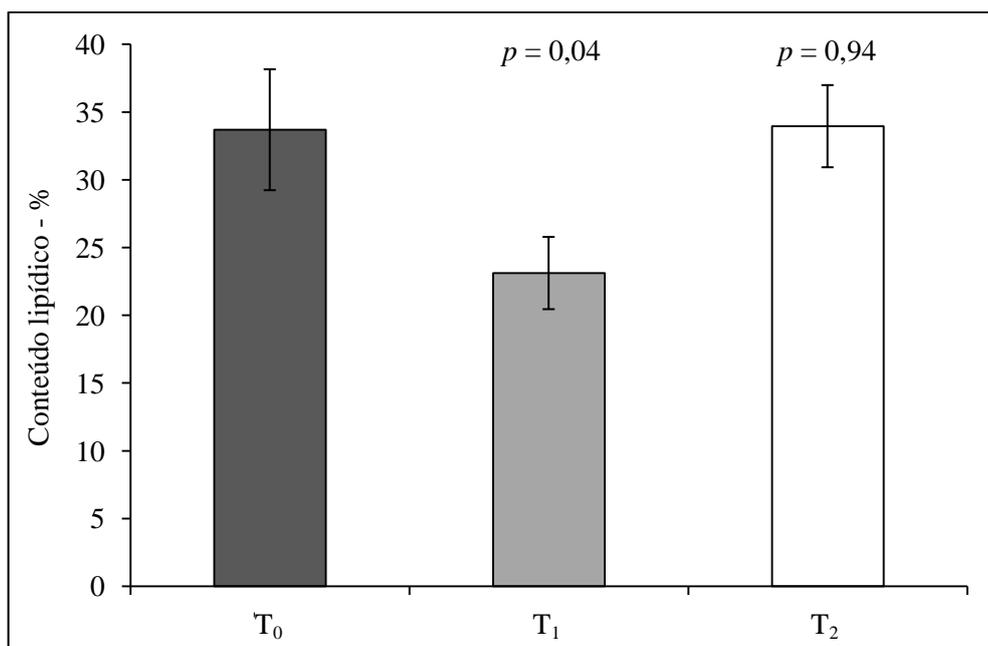


FIGURA 25 – TEOR LIPÍDICO (%) NO 9º DIA DE CULTIVO EM MEIO FRESCO – T₀ E RECICLADO – T₁ E T₂

A redução do conteúdo lipídico que ocorreu no cultivo T_1 pode ser consequência da redução de micronutrientes, sais metálicos no meio, pois estes participam de atividades enzimáticas como a síntese de ácidos graxos (LOURENÇO, 2006).

Os resultados dos cultivos em meio reciclado T_2 indicam que o residual de ferro, da solução adicionada como flocculante, no meio clarificado é pequeno, pois, não ocorre aumento do crescimento celular e nem variações do conteúdo lipídico.

A figura 26 apresenta o conteúdo lipídico (mg.L^{-1}) do volume de cultivo para os cultivos T_0 , T_1 e T_2 , a média do T_1 apresentou um decréscimo quando comparada ao T_0 e T_2 , porém, o teste T de *Student* indica que não há diferenças significativas entre cultivo em meio fresco e meio reciclado em termos de teor lipídico por litro de cultivo.

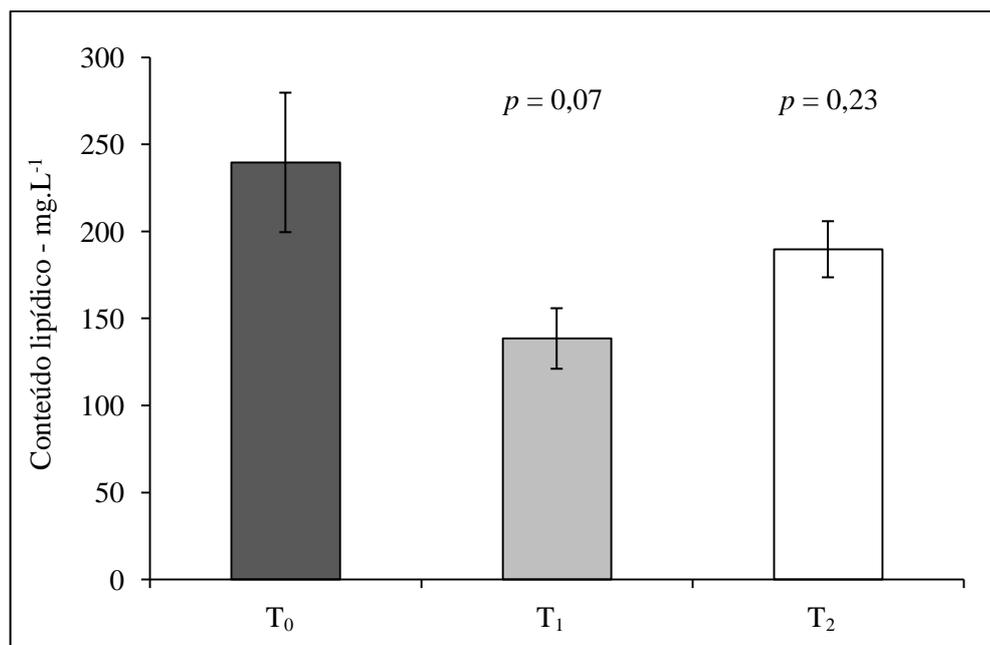


FIGURA 26 – TEOR LIPÍDICO (mg.L^{-1}) NO 9º DIA DE CULTIVO EM MEIO FRESCO – T_0 E RECICLADO – T_1 E T_2

5.4.3 Adição de nutrientes no meio reciclado

A quantidade de nutrientes a ser adicionada nos cultivos de microalga *Scenedesmus* sp., padrão para este trabalho, em meio reciclado, foi definida com base no cultivo apresentado na seção 5.4.

Apesar dos cultivos em meio fresco, com 25% e 0% de solução de metais, não terem apresentado variações significativas em relação à densidade celular e biomassa seca, em termos de lipídios totais ocorreram variações significativas.

Levando em consideração a perda de lipídios totais no cultivo reciclado T₁ e as possíveis reciclagens do meio (um sistema sem descarga do efluente), seria inviável não adicionar solução de metais ao cultivo reciclado, após determinado intervalo de tempo os metais seriam completamente eliminados do meio de cultivo.

Assim, ficou definido como taxa de reposição de nutrientes para os cultivos com meio reciclado, padrão para este trabalho, a adição de 100% de solução de nitrato e fosfato e 25% da solução de metais.

Entretanto, não é possível afirmar que as microalgas consomem 25% dos metais presentes no meio de cultivo, assim, estes deveriam ser analisados detalhadamente para avaliar se o volume adicionado não estaria em excesso ou em falta com as necessidades nutricionais e de produção de lipídios das microalgas, pois, os metais são essenciais ao desenvolvimento da microalga, participando de estruturas e atividades enzimáticas como, síntese de ácidos graxos, fixação do nitrogênio, respiração e fotossíntese.

5.5 AVALIAÇÃO DO PÓS-TRATAMENTO DO MEIO DE CULTIVO

A remoção das células em suspensão no meio clarificado só será alcançada por meio de filtração, e este sistema é inviável para células pequenas (3 – 30 µm de diâmetro), que é o caso das células presentes no meio de cultivo tratado (meio clarificado) da microalga *Scenedesmus* sp.. Assim, utilizar as células como parte adicional do inóculo dos cultivos com meio reciclado é um procedimento interessante, permitindo aumentar a densidade celular do cultivo, e econômico para o sistema de produção de microalgas, pois evita o gasto energético com a filtração.

Para definir se a utilização do meio de cultivo, da microalga *Scenedesmus* sp., tratado sem filtração não afetaria o desenvolvimento do novo cultivo, foi realizado um cultivo com meio fresco. A multiplicação celular deste é apresentada na figura 27,

como ocorreu com os cultivos apresentados na seção 5.4, houve uma fase *lag* longa que não permitiu o ajuste dos dados à equação logística.

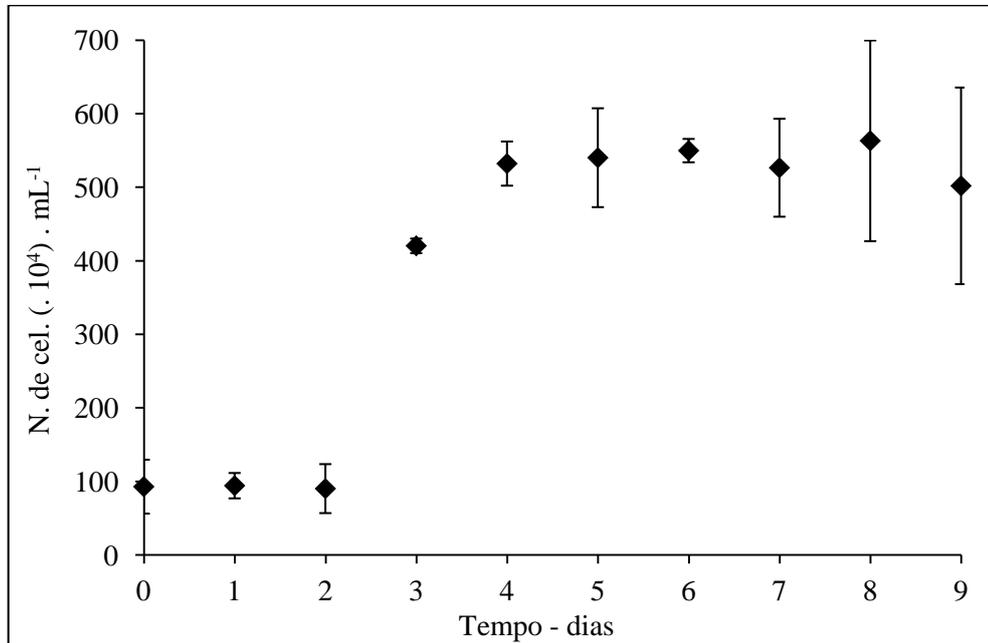


FIGURA 27 – CURVA DE CRESCIMENTO DO CULTIVO UTILIZADO PARA COMPOR OS MEIOS DE CULTIVOS RECICLADOS – B₁ E B₂

Ao nono dia de cultivo o meio foi tratado, conforme procedimento descrito na seção 5.3, e utilizado para compor o meio de cultivo reciclado filtrado (B₁) e sem filtrar (B₂), conforme seção 4.6.2. Foi adicionado ao meio reciclado o volume de nutriente definido na seção 5.4.2 e 10% (v:v) de inóculo.

As curvas de crescimento para os cultivos com meio reciclado B₁ e B₂ são apresentadas na figura 28. Ambos os cultivos entraram na fase estacionária de crescimento no quarto dia de cultivo, semelhante ao do cultivo da figura 27, o B₁ com valor máximo de aproximadamente $783 \cdot 10^4 \text{ cel.} \cdot \text{mL}^{-1}$ e o B₂ $675 \cdot 10^4 \text{ cel.} \cdot \text{mL}^{-1}$.

O erro estatístico elevado na densidade celular que o cultivo com meio reciclado filtrado (B₁) apresenta a partir do terceiro dia do cultivo (figura 28) é consequência da autofloculação dos cultivos. Esta pode ter ocorrido devido que a aeração foi realizada com bomba de ar, como a bomba fica junto com os cultivos, em um ambiente fechado, de forma que a concentração de CO₂ no ar é pequena devido a atividade fotossintética das microalgas. A redução do CO₂ nos cultivos, também, pode ter influenciado no número de células do cultivo.

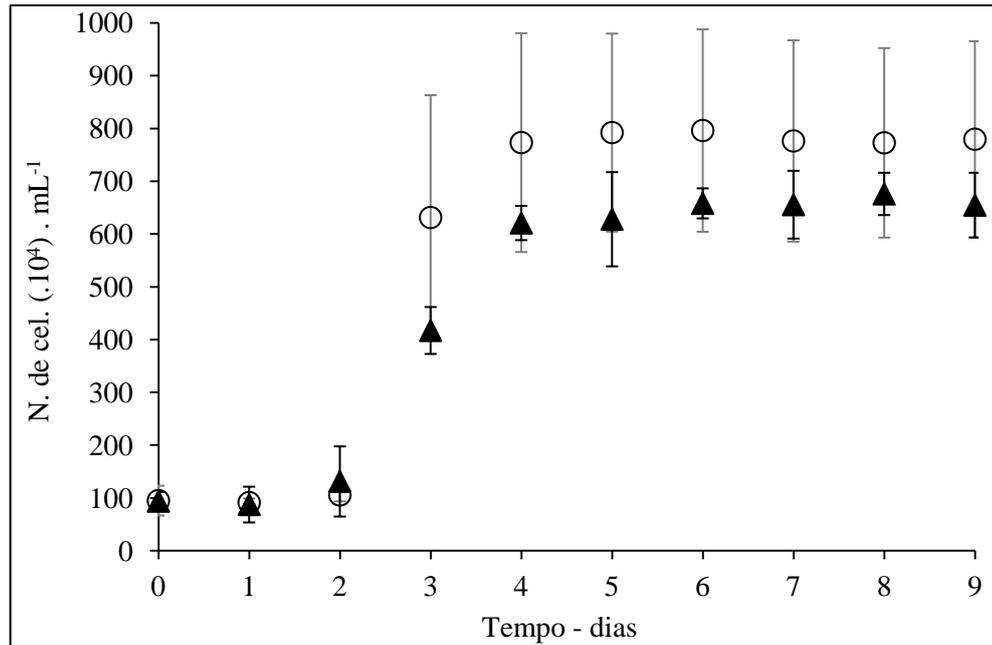


FIGURA 28 – CURVA DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS COM MEIOS RECICLADOS – B₁ E B₂ (○: B₁; ▲ - B₂)^a

NOTA – ^a Aeração dos cultivos foi realizada com bomba de ar.

Para o cultivo em meio reciclado sem filtrar (B₂) a baixa densidade celular pode ser decorrente tanto da aeração como da ausência de filtração. A filtração pode remover os nutrientes, que cristalizaram com a floculação, e parte do cloreto férrico dissolvido no meio, pois, estes podem ser retidos na membrana filtrante.

Ao comparar os dois cultivos B₁ e B₂ através do teste T de *Student* verifica-se que não há diferenças significativas ($p > 0,05$) entre eles. Entretanto há a necessidade de verificar se essa semelhança é real ou neste experimento foi decorrente da autofloculação do cultivo com meio reciclado filtrado (B₁).

Também há necessidade de realizar outros experimentos com meio de cultivo reciclado sem filtrar, a fim de verificar se a redução do número de células no cultivo foi decorrente da ausência de filtração do meio clarificado, do excesso de nutrientes ou da deficiência na aeração.

5.6 VIABILIDADE ECONÔMICA

A avaliação da economia que um sistema de reciclagem pode gerar foi realizada com base no custo da produção do meio de cultivo, considerando entrada de

nutrientes, volume de água e taxa para lançamento do efluente.

Considerando os valores apresentados na tabela 15 e que para ocorrer um cultivo com meio reciclado são realizados dois cultivos, a reciclagem do meio de cultivo representa uma economia de 38% no custo da produção do meio de cultivo.

TABELA 15 – CUSTO DO MEIO DE CULTIVO FRESCO E RECICLADO

Sistema de cultivo	Sem reciclar	Reciclando	
Variáveis	Meio fresco	Meio fresco	Meio reciclado
Nutrientes – nitrato e fosfato	R\$ 31,88	R\$ 31,88	R\$ 31,88
Nutrientes – metais	R\$ 6,82	R\$ 6,82	R\$ 1,71
Água	R\$ 55,24	R\$ 55,24	-
Esgoto	R\$ 46,92	-	R\$ 46,92
Total	R\$ 140,86	R\$ 93,94	R\$ 80,50

Nota: cálculo feito para um volume de meio de cultivo de 10 m³.

6 CONCLUSÃO

Esta pesquisa avaliou a densidade celular, biomassa seca e conteúdo lipídico da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em meio *Guillard "F/2"* modificado, afim de definir o período ideal de cultivo e as alterações na taxa metabólica, em termos de biomassa e lipídios totais, da microalga cultivada em meio reciclado. Foi definido o melhor agente floculante para tratar o meio de cultivo, quantidades de nutrientes para os cultivos com meio reciclado e a necessidade de filtrar o meio tratado para compor o meio reciclado. Com esses resultados conclui-se que:

- Quando os lipídios são destinados para produção de biodiesel, o processo de sedimentação precedida de floculação torna-se mais interessante que a centrifugação, pois o gasto de energia com este processo será consideravelmente maior que gasto com a floculação;
- O sistema floculação / sedimentação é eficaz como processo de recuperar biomassa de cultivos de microalga *Scenedesmus* sp., permitindo remover mais células do cultivo que a própria centrifugação;
- O hidróxido de sódio tem capacidade de agredir as células do cultivo, quando comparado o teor lipídico da biomassa recuperada por floculação com NaOH com a biomassa recuperada por centrifugação ocorreu uma perda de 19,7%. No entanto, para o cloreto férrico a perda de lipídios é de 3,03% o que não representa variação significativa quando comparado com a centrifugação;
- Os cultivos da microalga *Scenedesmus* sp. em meio de cultivo fresco e reciclado permitiu identificar a potencialidade de reciclagem do seu meio de cultivo sem que ocorresse decréscimo na densidade celular e lipídios totais quando adicionado ao meio reciclado 100% do volume original de solução de nitrato e fosfato e 25% de solução de metais;
- Com a avaliação do pós-tratamento do meio clarificado verificou-se que existe a possibilidade deste não ser aplicado no sistema de reciclagem do meio de cultivo;

A reciclagem do meio de cultivo da microalga resulta em economia com água e sais metálicos, representando uma redução de 38% no custo da produção do meio de cultivo, quando o mesmo é reciclado uma vez.

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Procurar nos próximos trabalhos obter um controle melhor da aeração dos cultivos.

Aproximar as condições de cultivo das pesquisas às condições reais do fotobiorreator:

- Cultivar a microalga com fotoperíodo 12:12 (doze horas de iluminação por dose horas sem iluminação);
- Manter os cultivos em temperatura e intensidade de luminosidade ambiente. Levar também em consideração a sazonalidade do clima;
- Incluir no processo de reciclagem as perdas de meio que ocorrerão através da recuperação da biomassa, e quantidade de meio fresco que deverá ser acrescentado para voltar ao volume inicial do cultivo. Este detalhe permitirá um aumento nos ciclos de reciclagem;
- Determinar o potencial da reciclagem do meio de cultivo (quantas vezes o cultivo pode ser reciclado).

Melhorar a determinação da quantidade de nutriente a ser adicionada aos cultivos reciclados:

- Determinar a viabilidade de recuperação da biomassa residual do meio de cultivo reciclado, antes de definir a taxa de reposição de nutrientes;
- Fragmentar a variação dos nutrientes nos experimentos, variando também a quantidade de nitrato e fosfato a ser adicionada no meio reciclado.

REFERÊNCIAS

ALONSO, D. L. et al.. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. **Phytochemistry**, v.54, p. 461-471, fev. 2000.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A.. Cultivo da Microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciênc. agrotec.**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, set. / out. 2008.

ANDREO, C.S.; VALLEJOS, R.H.. **Fotosíntesis**. Washington: Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1984.

BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. **Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel**. 1. ed. Campina Grande: EMBRAPA, 2008. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CNPA-2009-09/22146/1/DOC201.pdf>>. Acesso em: 04/8/2010.

BRASIL. Lei n. 11097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis n. 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 jan. 2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em: 09/9/2010.

CHISTI, Y.. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, fev. 2007.

CHIU, S. et al.. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresour. Technology**, v.100, p. 833 – 838, 2009.

CYANOTECH. **Habitat Conservation Plans – working together for endangered species**. Disponível em: <<http://www.cyanotech.com/company.html>>. Acesso em: 14/5/2012.

DEMIRBAS, A.. **Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engines**. 1. ed. London: Springer, 2008.

DERNER, R. B. et al.. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

EMDADI, D.; BERLAND, B.. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Chemistry**, v. 26, p. 215-225, 1989.

FERNANDEZ-REIRIZ, M. J., et al.. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, v. 83 p. 17-37, 1989.

FRANCISCO, E. C. et al.. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 85, p. 395 – 403, 2010.

GHIDINI, L. F. C. et al.. **Change of culture broth pH for microalgae separation from the growth solution**. Trabalho apresentado no 20. International Congress of Mechanical Engineering, Gramados, 2009.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. et al.. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part I: Focus on cultivation and biofuel production. **Biofpr**, v. 6, p. 105 – 113, 2012.

GRIMA, E. M. et al.. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

HALL, D.O.; RAO, K.K.. **Fotossíntese**. São Paulo: E.P.U., 1980.

HARWOOD, J. L.; GUSCHINA, I. A.. The Versatility of algae and their lipid metabolism. **Biochimie**, v. 91, p. 679 – 684, 2009.

HORIUCHI, J. et al.. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 4, p. 412-415, 2003.

HUANG, G. et al.. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38 – 46, 2010.

HUNDT, K.; REDDY, B.V.; Algal biodiesel production from power plant exhaust and its potential to replace petrodiesel and reduce greenhouse gas emissions. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, v. 6, p. 294 – 298, 2011.

KIM, D. et al.. Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 3163 – 3168, 2011.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J.. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. **J Appl Phicol**, v. 21, p. 559-567, 2009.

LIU, Z.; WANG, G.; ZHOU, B.. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4717 – 4722, 2008.

LOERA-QUEZADA, M. M.; OLGUÍN E.J.. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. **Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal**. v. 1, n. 1, maio 2010.

LOPES, S.. **Bio**. 1. ed., São Paulo: Saraiva, 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas – princípios e aplicações**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006.

MALLICK, N. et al.. Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 87, p.137 – 145, 2012.

MANDAL, S.; MALLICK, N.. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 84, p. 281 – 291, 2009.

MARKOU, G.; CHATZIPAVLIDIS, I.; GEORGAKAKIS, D.. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **World J. Microbiol Biotechnol**, 2012. Disponível em: <<http://www.springerlink.com.ez22.periodicos.capes.gov.br/content/p0q4768606833462/>>. Acesso em: 04/6/2012.

MATSUNAGA, T. et al.. Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. Strain JPCG GA0024 toward biofuel production, **Biotechnol Lett**, v. 31, p.1367 – 1372, 2009.

MELLO, T. C. et. al.. **Efeito econômico da utilização de fertilizantes como substrato no cultivo de microalgas**. Trabalho apresentado no 5. Congresso Internacional de Bioenergia, Curitiba, 2010.

MENG, X. et al.. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1 – 5, 2009.

MIERZWA, J. C.; HESPANHOL, I.. **Água na Indústria: uso racional e reuso**. 1. ed. São Paul, Oficina de Textos, 2005.

MME. **Biodiesel: participação das matérias-primas**. In. **Boletim mensal de combustíveis renováveis**. Disponível em:< <http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicacoes.html>>. Acesso em: 31/7/2012a.

MME. **Óleo diesel (B5): média nas capitais**. In. **Boletim mensal do comercio de derivados de petróleo**. Disponível em:< <http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicacoes.html>>. Acesso em: 31/7/2012b.

MORAIS, K.C.C.. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ÖRDÖG, V. et al.. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. **J. Appl Phycol**, 2011 Disponível em:<<http://www.springerlink.com.ez22.periodicos.capes.gov.br/content/98181618p6552673/>>. Acesso em: 05/6/2012.

PACIFIC NORTHWEST NATIONAL LABORATORY. Energy and Environment Directorate. Disponível em: <<http://energyenvironment.pnnl.gov/highlights/highlight.asp?id=32>>. Acesso em: 14/5/2012.

PANKOWSKI, A.; MCMINN, A.. Development of immunoassays for the iron-regulated proteins ferredoxin and flavodoxin in polar microalgae. **J. Phycol.**, v. 45, p. 771 – 783, 2009.

PENTEADO, D. M. R... **Estudos de otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para a produção de lipídios.** 114 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

PIRES, J.C.M. et al.. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3043 – 3053, 2012.

RIBEIRO, R. L. L.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C.. **Estimativa da produção de biodiesel a partir de microalgas em fotobiorreatores tubulares compactos do NPDEAS.** Trabalho apresentado no 5. Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Salvador, 2012.

RIBEIRO, R. L. L. et al.. The temperature response of compact tubular microalgae photobioreactors. **Engenharia Térmica**, v. 8, p. 50-55, 2009.

RODOLFI, L. et al.. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 243-248, 2003.

RODOLFI, L. et al.. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100 - 112, 2009.

RODRIGUES, W. C.. **Apostila de estatística aplicada.** 6. ed., 2008. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/53715597/61/>>. Acesso em: 30/4/2012.

RODRÍGUEZ, J. A., PALAU, L. C., LÓPEZ, M. O. A.. Extracción y cuantificación de lípidos. In: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.** 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), 2007. p. 47 – 57.

SANDNES, J.M. et al.. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, p. 515 – 525, 2005.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M.. Influencia do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23(Supl), p. 17 – 21, dez. 2003.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J.V.C.. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **Int. J. of Energy Res.**, v. 35, n. 4, p. 291 – 311, 2010.

SAÚDE. **Tabela para cloração da água não tratada. In: Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano.** Disponível em: < http://www.saude.df.gov.br/005/00502001.asp?ttCD_CHAVE=9931>. Acesso em: 31/5/2011.

SCHMIDT, C. J. B.. Aislamiento, purificación, y mantenimiento de cepas de microalgas. In: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.** 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), 2007. p 1 – 16.

SIRON, R.; GIUSTI, G.; BERLAND, B.. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 55, p. 95 – 100, 1989.

SOARES, D.. **Avaliação do Crescimento Celular e da Produtividade de Lipídios de Microalgas Marinhas em Diferentes Regimes de Cultivo.** 107 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SPOLAORE, P. et al.. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STANKIEWICZ, E. H.; ANDRADE, L. F.; DOMINGUES, L. L.. **Levantamento ficológico do Rio Iguaçu,** algas unicelulares – I. 1. ed. Curitiba: SURHEMA, 1981.

UMWELT BUNDES AMT. **Wasser, Trinkwasser und Gewässerschutz – Schutz der Meere**. Disponível em: < <http://www.umweltbundesamt.de/wasser/themen/meere/mikroalgen.htm>>. Acesso em: 13/5/2012.

VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. In: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), 2007a. p. 17-25.

VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. In: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D.. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), 2007b. p. 27-30.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C.C.; JU, Y.H.. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 13-20, 2009.

WU, Z. et al.. Evaluation o flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 496 – 502, 2012.

XU, L. et al.. Improved algal oil production from *Botryococcus braunii* by feeding nitrate and phosphate in an airlift bioreactor. **Eng. Life Sci.**, v. 12, n. 2, p.171 – 177, 2012.