

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ SANTOS

REDUÇÃO DO CUSTO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL COMO
MATÉRIA PRIMA PARA BIODIESEL

CURITIBA

2013

BEATRIZ SANTOS

REDUÇÃO DO CUSTO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL COMO
MATÉRIA PRIMA PARA BODIESEL

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano

Coorientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

CURITIBA

2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família pelo constante apoio e por ter me fornecido toda base necessária para que fosse possível a chegada até aqui.

Agradeço imensamente ao Diego de Oliveira Corrêa pela incansável ajuda e a cima de tudo pela sua amizade e sinceridade, pela paciência e pelas palavras de conforto e estímulo. Sem dúvida, esse trabalho se tornou muito mais fácil com você ao meu lado.

Ao meu orientador André Bellin Mariano pela amizade e ensinamentos.

Ao meu coorientador Thales Ricardo Cipriani por sua contribuição na elaboração deste trabalho.

Ao professor José Vargas pelo reconhecimento, pela oportunidade de integrar o time do NPDEAS e pelos sábios conselhos.

Ao Bruno Miyawaki pela amizade e por ter tornado possível a realização dos experimentos nos fotobiorreatores airlift.

A todos integrantes do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável pelos auxílios prestados.

À Maria Elisa e aos técnicos de Biotecnologia por segurar as pontas na sala de cultivo.

À Nilko Metalurgia Ltda e à PSA Peugeot por depositar confiança no nosso trabalho e viabilizar as pesquisas.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

A todos o meu muitíssimo obrigada, espero poder lhes retribuir de alguma maneira todo companheirismo dedicado.

RESUMO

As microalgas têm sido reconhecidas como potenciais produtoras de biomassa para a geração energia, tais como biodiesel, biohidrogênio e bioetanol. Uma das características que as colocam em vantagem em relação às matérias primas convencionalmente utilizadas é a possibilidade do uso de terras não aráveis. Estudos indicam que o teor de óleo pode chegar a 40% do peso seco da microalga, entretanto, o custo de produção da biomassa ainda é elevado, devido aos processos de separação da biomassa, da extração do óleo e da produção do meio de cultivo que pode chegar a 35% dos custos totais. Este estudo teve como objetivo a redução dos custos de produção de biomassa de microalgas utilizando duas metodologias diferentes, a redução da concentração do meio de cultivo sintético em 50% do original e a substituição do meio sintético por dejetos suíno biodigerido em concentração de 2,5%. Para alcançar o objetivo estabelecido foram realizadas duas fases experimentais. A fase 1 ocorreu em laboratório com cultivos em frascos erlenmeyer com volume de 2 L, utilizando meio de cultivo sintético CHU nas concentrações 100% e 50%. Foram utilizadas espécies do gênero *Scenedesmus* e do gênero *Chlorella*. A fase 2 foi realizada em fotobiorreatores do tipo airlift com volume de 10 L utilizando meio sintético na concentração de 50% e dejetos suíno biodigerido em concentração de 2,5%. A espécie de microalga utilizada foi a que mostrou mais produtiva na fase 1, a *Scenedesmus* sp.. Nas duas fases os cultivos tiveram duração de 15 dias e o acompanhamento do crescimento foi realizado diariamente através da quantificação da concentração celular e biomassa produzida. Com o resultado da fase 1, foi possível concluir que é plausível a redução pela metade da concentração do meio sintético CHU, pois ambos cultivos apresentaram produtividade de biomassa semelhante. Na etapa 2, o cultivo com dejetos suíno biodigerido foi mais produtivo em biomassa seca e em óleo, chegando ao rendimento de $43 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de biomassa seca, à medida que o cultivo em meio sintético chegou a $38 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Da mesma maneira, o cultivo em dejetos suíno produziu $6,8 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de óleo enquanto o cultivo em meio sintético chegou a $4,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Com base nos resultados obtidos, é possível destacar a viabilidade da redução dos custos de produção do meio de cultivo, passando de R\$ 0,023 para R\$ 0,011 na confecção de um litro de meio sintético, contudo, a substituição por dejetos suíno biodigerido se mostrou economicamente ainda mais vantajoso, chegando ao valor de R\$ 0,001, com produtividade de óleo cerca de 1,5 vezes superior.

Palavras-chave: Microalgas. Biodiesel. Biomassa.

ABSTRACT

Microalgae has been recognized as potential producers of biomass to generate energy, such as biodiesel, bioethanol and biohydrogen. One of the characteristics that put them at an advantage in relation to raw materials conventionally used is the possibility of using non-arable land. Studies indicate that the oil content can reach 40% of the microalgae dry weight, however, the production cost of biomass is still high due to separation processes of biomass, oil extraction and production culture medium that can reach 35% of total costs. This study aimed at reducing the costs of production of microalgae biomass using two different methodologies, reducing the concentration of the synthetic culture medium in 50% of the original and replacement of synthetic medium for swine manure biodigested in concentration of 2.5%. To achieve the goal established two experimental steps were performed. The first step occurred in laboratory cultures in erlenmeyer flasks with a volume of 2 L, using synthetic CHU culture medium at concentrations of 100% and 50%. Species of the genus *Chlorella* and *Scenedesmus* were used. The stage 2 was held in photobioreactors airlift type, using a volume 10 L of synthetic medium at a concentration of 50% and pig manure in concentration of 2.5%. The specie of microalgae used was the one with the best productive in phase 1, the *Scenedesmus* sp. In both phases, the crops lasted 15 days and the growth monitoring was performed daily by measuring the cell concentration and biomass produced. With the result of step 1, is possible to conclude that it is plausible to halve the concentration of the CHU synthetic medium, because both crops showed similar biomass productivity. In step 2, the cultivation with swine manure biodigested was more productive in dry biomass and oil, yielding $43 \text{ mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ of dry biomass, while the culture growing in synthetic medium reached $38 \text{ mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$. Likewise, cultivation in swine manure produced $6.8 \text{ mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ of oil while the cuture growing in synthetic medium reached $4.6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$. Based on the results obtained, it is possible to highlight the feasibility of reducing the production costs of the medium, from R\$ 0.023 to R\$ 0.011 in the production of one liter of synthetic medium, however, the substitution of swine manure biodigested proved economically more advantageous, reaching R\$ 0.001, with oil yields about 1.5 times higher.

Key words: Microalgae. Biodiesel. Biomass.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA CHU E BBM	33
TABELA 2 - BIOMASSA E TEOR DE LIPÍDEOS TOTAIS NOS CULTIVOS REALIZADOS NA FASE 2	47
TABELA 3 - TEORES DE LIPÍDEOS DE MICROALGAS DO GÊNERO <i>Scenedesmus</i>	48
TABELA 4 - TEOR DE CONVERSÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS EM EMAGs.....	49
TABELA 5 - CUSTOS PARA PRODUÇÃO DE 1 LITRO DE MEIO DE CULTIVO SINTÉTICO	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM TANQUE DO TIPO RACEWAY POND.....	17
FIGURA 2 - LAGOA CIRCULAR PARA CULTIVO DE MICROALGAS.....	17
FIGURA 3 - ESQUEMA DE UM FOTOBIORREATOR DO TIPO PAINEL.....	18
FIGURA 4 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE FOTOBIORREADORES DE COLUNA DO TIPO: A: COLUNA DE BOLHAS; B. CIRCUITO INTERNO; C. AIRLIFT; D. AIRLIFT DO TIPO LOOP EXTERNO.....	19
FIGURA 5 - FOTOBIORREATOR TUBULAR DESENVOLVIDO PELO NPDEAS....	20
FIGURA 6 - POTENCIAL DAS MICROALGAS COMO FONTE DE ENERGIAS RENOVÁVEIS.....	25
FIGURA 7 - RESUMO DA VIA DE SÍNTESE DO BIODIESEL E DIESEL VERDE RENOVÁVEL.....	27
FIGURA 8 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ESTRATÉGIAS.....	30
FIGURA 9 - <i>Scenedesmus</i> sp. (A) E <i>Chlorella</i> sp. (B). Aumento de 400 X.....	31
FIGURA 10 - EXPERIMENTOS REALIZADOS DURANTE A FASE 1.....	34
FIGURA 11 - REATORES DO TIPO AIRLIFT UTILIZADOS NA FASE 2.....	35
FIGURA 12 - CRESCIMENTO DAS MICROALGAS EM MEIO CHU.....	39
FIGURA 13 - DENSIDADE ÓPTICA DOS CULTIVOS EM MEIO CHU.....	40
FIGURA 14 - CRESCIMENTO DAS MICROALGAS EM MEIO BBM.....	41
FIGURA 15 - DENSIDADE ÓPTICA DOS CULTIVOS EM MEIO BBM.....	42
FIGURA 16 - PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DAS ESPÉCIES <i>Scenedesmus</i> sp. E <i>Chlorella</i> sp.....	43
FIGURA 17 - CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp.....	45
FIGURA 18 - DENSIDADE ÓPTICA DOS CULTIVOS REALIZADOS EM REATOR AIRLIFT.....	45

FIGURA 19 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO CHU E DEJETO SUÍNO
(FASE 2).....47

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	– Adenosina trifosfato
b	– Massa da biomassa utilizada para extração de lipídeos
BBM	– Bold Basal Medium
B _s	– Biomassa seca
CHL	– <i>Chlorella</i> sp.
CONAMA	– Conselho Nacional do Meio Ambiente
EMAG	– Ésteres metílicos de ácido graxo
L _t	– Lipídeos totais
m	– Metros
m ₀	– Massa do vial vazio
m _A	– Massa da biomassa utilizada para esterificação
m _f	– Massa do vial seco com os EMAGs obtidos
NPDEAS	– Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável
P ₁	– Massa da membrana seca (g)
P ₂	– Massa da membrana com biomassa seca (g)
SCN	– <i>Scenedesmus</i> sp
t	– Tempo de cultivo
TAG	– Triacilglicerídeos
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
V	– Volume do cultivo filtrado
v ₁	– Massa do vial vazio
v ₂	– Massa do vial com óleo
X	– Conversão mássica da amostra em EMAG

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 MICROALGAS	15
2.2 CULTIVO DE MICROALGAS	15
2.2.1 Sistemas abertos.....	16
2.2.2 Sistemas fechados	18
2.3 NECESSIDADES NUTRICIONAIS DAS MICROALGAS.....	20
2.3.1 Macronutrientes.....	21
2.3.2 Micronutrientes.....	22
2.3.3 Dejeito suíno	24
2.4 MICROALGAS COMO MATÉRIA PRIMA PARA BIOCOMBUSTÍVEIS	24
2.4.1 Biodiesel de microalgas.....	25
3 JUSTIFICATIVA	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GERAL	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1 ESPÉCIES DE MICROALGAS UTILIZADAS	31
5.2 MEIOS DE CULTURA	32
5.3 ETAPAS DE CULTIVO.....	33
5.3.1 Fase 1	33
5.3.2 Fase 2	34
5.4 METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DOS CULTIVOS..	35
5.4.1 Concentração celular.....	35
5.4.2 Densidade óptica.....	36

5.4.3 Biomassa seca	36
5.4.4 Teor de lipídeos totais	37
5.4.5 Ésteres metílicos de ácidos graxos (Biodiesel)	37
5.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	38
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1 FASE 1	39
6.1.1 Cultivos em meio CHU	39
6.1.2 Cultivos em meio BBM	41
6.1.3 Produção de biomassa na fase 1	42
6.2 FASE 2	44
6.3 BIODIESEL	48
6.4 CUSTOS DE PRODUÇÃO	49
6.5 BIORREMEDIAÇÃO	50
7 CONCLUSÕES	52
8 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

A sustentabilidade é essencial na gestão dos recursos naturais, de tal modo que a sua eficiência operacional terá reflexos sobre os impactos ambientais e socioeconômicos. As fontes convencionais e de origem fóssil para produção de energia, apesar de abundantes, não são renováveis e sua utilização acarreta problemas ambientais, como o aquecimento global e a chuva ácida. Por essa razão, existem iniciativas de pesquisas destinadas ao desenvolvimento de alternativas renováveis (SINGH; SHARMA, 2012).

A preocupação com a degradação das condições ambientais vem se destacando nos últimos anos, surgindo a necessidade da substituição do uso de combustíveis de origem fóssil por alternativas que resultem em menor impacto ao meio ambiente.

Uma dessas alternativas, o biodiesel, é produzido a partir de óleos vegetais (comestíveis ou não) ou de gorduras animais. Uma vez que os óleos vegetais podem também ser utilizados para consumo humano, seu uso como biocombustível pode acarretar o aumento do preço de mercado, fazendo com que o custo do biodiesel aumente, impedindo a sua utilização mesmo havendo vantagens comparando com o combustível de origem fóssil (MATA; MARTINS; CAETANO, 2009).

Nesse cenário, as microalgas constituem alternativa interessante para produção de biodiesel, em comparação ao uso de matérias primas tradicionais, como as oleaginosas devido à sua elevada eficiência fotossintética (FRANCO et al 2013), duplicação da biomassa em um intervalo de tempo muito curto e elevados teores de lipídeos utilizados para conversão em biodiesel.

Uma característica importante dos sistemas de cultivo de microalgas é sua versatilidade, tornando possível relacionar aplicações diferentes no mesmo processo, como o tratamento de águas residuais, a produção de suplementos alimentícios, rações, fármacos e produtos químicos. Outra característica atrativa do

uso de microalgas, em comparação ao uso de outros micro-organismos, é sua capacidade fotossintética de converter energia solar em biomassa com composição química atraente do ponto de vista energético (de la NOUE; de PAUW, 1988).

Apesar dessas vantagens, existem alguns desafios a serem superados para tornar viável a produção de biodiesel de microalgas, como por exemplo, o desenvolvimento de fotobiorreatores e separação da biomassa mais eficientes, a busca por espécies potencialmente acumuladoras de óleo e o aprimoramento das tecnologias de extração de óleo e posterior conversão à biodiesel.

Dentre os principais desafios, os custos de produção possuem destaque especial. Do valor total do custo da produção de biomassa, aproximadamente 35% é gasto para produzir o meio de cultivo (GRIMA *et al.*, 2003). Diante disso, o uso de resíduos agroindustriais surge como uma alternativa de baixo valor econômico capaz de substituir meios de cultivos sintéticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

O termo alga foi proposto pela primeira vez em 1753 por Lineu, e congregava quatro ordens de criptógamos (briófitas e pteridófitas), 14 gêneros e 214 espécies dos quais somente cinco gêneros e 48 espécies constituem o que hoje entendemos por alga. De fato a criação deste termo foi pouco preciso do ponto de vista taxonômico, sendo ele usado para designar uma enorme variedade de organismos, de tal maneira que atualmente não se aplica um significado preciso ao termo alga. Pode-se generalizar e designar como algas os talófitos e protistas clorofilados (BICUDO e MENEZES, 2005), sendo que algumas cianobactérias estão incluídas nesta definição (TOMASELLI, 2004).

Um dos maiores grupos de algas conhecido é o das algas verdes, que juntamente com as plantas terrestres constituem o sub-reino Viridiplantae. A estrutura vegetativa das algas verdes apresenta uma variedade muito grande de níveis de organização, desde indivíduos unicelulares, flagelados ou não, até talos morfologicamente complexos (REVIERS, 2006).

2.2 CULTIVO DE MICROALGAS

O cultivo de microalgas é uma ferramenta que fornece informações pertinentes quanto aos processos ecológicos, à fisiologia, à bioquímica e à ontogenia de uma espécie em questão. Além disso, pode-se obter com o cultivo de microalgas biomassa para diversas aplicações biotecnológicas. Entretanto, a produção em larga escala exige que o sistema de cultivo seja eficiente. O uso do meio de cultivo deve estimular o crescimento sem elevar demasiadamente os

gastos, a luz deve atingir todas as células, devendo tomar o cuidado de manter o cultivo com densidade tal que não cause autossombreamento no interior do cultivo.

Cultivos em grande escala podem ser realizados em sistemas abertos ou fechados, ambos possuem vantagens e desvantagens quanto à sua implementação, como destacado a seguir.

2.2.1 Sistemas abertos

Sistemas abertos são os mais utilizados devido ao baixo custo de construção e manutenção. Três principais modelos têm sido usados na produção em larga escala, o do tipo inclinado, do tipo *raceway pond* e as lagoas circulares (TREDICI, 2004).

No modelo do tipo inclinado a turbulência é criada pela gravidade, de modo que a cultura em suspensão flui de cima para baixo numa superfície inclinada. Nesse sistema, a camada de cultivo pode ser extremamente fina, chegando a uma espessura menor do que um centímetro, contudo, a concentração celular pode ultrapassar 10 g.L^{-1} de cultivo. Um dos problemas deste modelo é a alta taxa de evaporação e sedimentação em locais com baixa turbulência (TREDICI, 2004).

O segundo modelo mais utilizado para produção em larga escala é o *raceway pond* (FIGURA 1). O gasto para a sua construção é relativamente baixo, e consiste numa vala rasa escavada no chão e revestida com plástico, com agitação realizada por longas pás. Uma das desvantagens encontradas é o nível da água que deve estar entre 15 cm e 50 cm para não diminuir a turbulência que favorece a homogeneização do cultivo e nem prejudicar a entrada de luz em toda a coluna d'água. Nesse modelo, o baixo nível de água requer grandes áreas para cultivo, com cerca de 150 L.m^{-2} , a concentração celular não ultrapassa $0,60 \text{ g.L}^{-1}$, facilitando contaminações e aumentando o custo de coleta da biomassa. Outro problema é a perda excessiva por evaporação, que agrava em dias quentes e secos (TREDICI, 2004).

O terceiro sistema aberto muito usado, principalmente no Japão, Indonésia e Taiwan, são as lagoas circulares (FIGURA 2), apesar do seu alto gasto energético, custo de instalação e das mesmas desvantagens encontradas no tanque do tipo *raceway pond*.

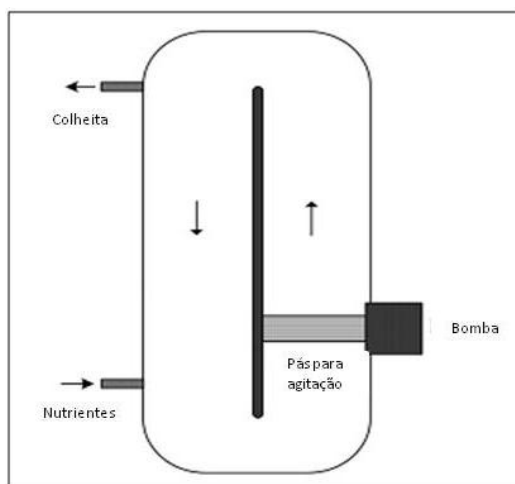


FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM TANQUE DO TIPO RACEWAY POND
FONTE: Adaptado de Suali e Sarbatly (2012).



FIGURA 2 - LAGOA CIRCULAR PARA CULTIVO DE MICROALGAS
FONTE: <http://biologiaenem.blogspot.com.br>

2.2.2 Sistemas fechados

Fotobiorreatores (FBR) são reatores em que organismos fotossintetizantes crescem e realizam suas reações biológicas, de modo que, os sistemas abertos também podem ser classificados como fotobiorreatores, no entanto, esse termo é comumente empregado para designar os sistemas fechados. Podem ser definidos como sistemas de cultura para organismos fotoautotróficos, no qual grande proporção da luz não incide diretamente sobre a superfície da cultura, mas precisam passar através das paredes transparente do reator para alcançar as células microalgais. Sendo assim, fotobiorreatores não permitem, ou limitam intensamente a troca direta de gases e contaminações entre o cultivo celular e a atmosfera (TREDICI, 2004). Para que um fotobiorreator tenha um bom desempenho seu projeto deve atender alguns requisitos, como permitir o máximo possível a entrada de luz e garantir que as trocas gasosas ocorram de modo a manter o equilíbrio de CO_2/O_2 . Os fotobiorreatores podem ser classificados quanto à sua geometria, sendo que os modelos mais utilizados são: painel, coluna vertical ou tubular.

Fotobiorreatores do tipo plano (FIGURA 3) são caracterizados por possuírem uma grande superfície iluminada em relação ao seu volume e por serem compactos. Além disso, o fotobiorreator pode ser orientado em direção à fonte luminosa, garantindo maior aproveitamento da luz. Uma desvantagem a ser considerada é a possibilidade de formação de biofilme, impedindo a passagem de luz.

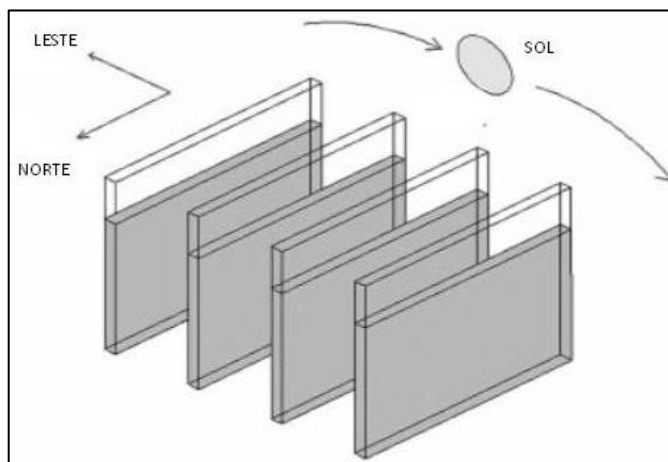


FIGURA 3 - ESQUEMA DE UM FOTOBIORREATOR DO TIPO PAINEL

FONTE: Adaptado de XU *et al.*, 2009.

Os reatores do tipo coluna (FIGURA 4) são cilíndricos geralmente com raio de 0,2 m e 4 m de altura. O comprimento do raio não deve ser muito grande para não prejudicar a relação volume/superfície. Quanto maior a altura da coluna, menor a eficiência nas trocas gasosas, gerando gradientes de CO_2 e o declínio do cultivo. Ademais, o aumento da coluna aumenta o tempo de residência do O_2 , que em certas concentrações pode inibir o crescimento das microalgas (WANG; LAN; HORSMAN, 2012).

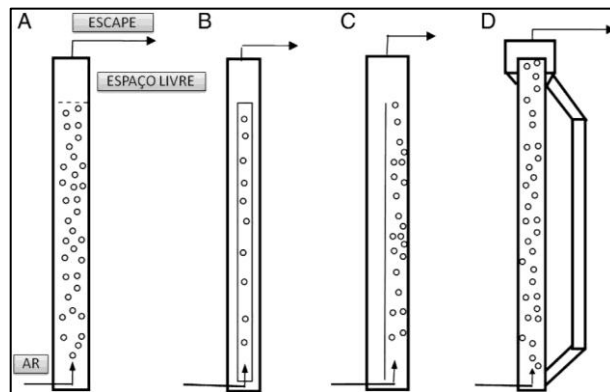


FIGURA 4 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE FOTOBIORREATORRES DE COLUNA DO TIPO: A: COLUNA DE BOLHAS; B. CIRCUITO INTERNO; C. AIRLIFT; D. AIRLIFT DO TIPO LOOP EXTERNO

FONTE: Adaptado de Wang; Lan; Horsman (2012).

Uma das características dos reatores de coluna é a alta eficiência na troca gasosa, pois o borbulhamento de ar a partir do fundo da coluna garante grande aproveitamento de CO_2 e a remoção de O_2 . Sendo assim, o crescimento do cultivo pode ser limitado por outros fatores, como a intensidade luminosa.

Os fotobiorreatores tubulares são constituídos por tubos transparentes e podem ter padrões diferentes, tais como em linha reta, curva ou serpentina. Basicamente esse sistema é composto de um painel para captação da luz, uma coluna pra trocas gasosas e uma bomba de circulação (FIGURA 5).



FIGURA 5 - FOTOBIORREATOR TUBULAR DESENVOLVIDO PELO NPDEAS

FONTE: O autor (2012).

2.3 NECESSIDADES NUTRICIONAIS DAS MICROALGAS

São reconhecidos cerca de 30 elementos tidos como essenciais para o crescimento e composição química das microalgas, ainda que as quantidades e os elementos variem de acordo com a espécie cultivada (LOURENÇO, 2006).

Algumas microalgas conseguem crescer exclusivamente em substratos orgânicos, opção interessante para a produção de biomassa e de alguns biocomponentes, entretanto o crescimento autotrófico é ainda o mais importante (GROBBELAAR, 2004).

Processos metabólicos exigem concentrações altamente variáveis dos nutrientes, desse modo, os nutrientes podem ser divididos em duas categorias principais: os macronutrientes e os micronutrientes.

2.3.1 Macronutrientes

O carbono é o elemento exigido em maiores concentrações, pois ele é o elemento mais importante de todas as substâncias orgânicas produzidas pelas células, tais como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídeos, entre outros. No ambiente natural, o carbono normalmente não é um fator limitante, contudo em sistemas de produção, o CO₂ pode não ser suficiente, sendo necessária a suplementação de uma fonte de carbono orgânica (GROBBELAAR, 2004) ou aeração enriquecida com CO₂ (LOURENÇO, 2006).

O nitrogênio é o segundo componente presente em maiores concentrações nas células microalgais, pois é essencial para a constituição de três classes de moléculas estruturais: as proteínas, os ácidos nucleicos e os pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas), apresentando importância elevada por ser constituinte de substâncias envolvidas com o metabolismo primário. (LOURENÇO, 2006). Verifica-se que em baixas concentrações de nitrogênio, há a diminuição da divisão celular, o cultivo fica com aspecto amarelado, pois há o decréscimo da quantidade de clorofila e o aumento de carotenoides, além do acúmulo de componentes com carbono orgânico como polissacarídeos e certos óleos, como ácidos graxos poli-insaturados (GROBBELAAR, 2004). Em meios de cultivos sintéticos, o nitrogênio está presente principalmente na forma de nitrato ou amônia.

A transferência de energia e a composição de moléculas estruturais são as funções primordiais do fósforo (P). ATP, açúcares fosfatados, fosfoenzimas e ácidos nucleicos são os principais elementos que possuem fósforo em sua composição. As microalgas possuem a capacidade de absorver mais fosfato do que o necessário, de tal modo que o crescimento continua ocorrendo, ainda que novas fontes de fósforo não estejam disponíveis (LOURENÇO, 2006). Dada as suas funções de extrema importância, o fósforo é junto com o nitrogênio um elemento limitante. Nos meios de cultivos usam-se sais de sódio ou potássio, fosfatos de cálcio ou ferro são insolúveis, portanto não estão disponíveis para as células (LOURENÇO, 2006).

O magnésio (Mg) é de importância elevada por ser constituinte da clorofila, além de ser um ativador de atividade enzimática. Outra importância do magnésio é

atuar na estabilidade do ribossomo e operar como co-fator no transporte iônico (GROBBELAAR, 2004). A ausência de magnésio causa clorose, processo pelo qual as células perdem seu conteúdo pigmentar (LOURENÇO, 2006). Em meios de cultivos o magnésio está presente na forma de sulfato de magnésio.

Outro macronutriente importante para os cultivos de microalgas é o enxofre (S) presente nas células principalmente como componente estrutural de proteínas, por meio de dois ácidos aminados a metionina e cisteína. Além disso, o enxofre é um importante co-fator da enzima acetil coenzima de algas verdes.

O ferro (Fe) é visto por alguns pesquisadores como um micronutriente e participa da cadeia transportadora de elétrons na respiração, do transporte fotossintético de elétrons, atua na redução do nitrato a nitrito, na redução do sulfato, é importante na fixação de nitrogênio molecular e na detoxicação de espécies reativas de oxigênio, além de ser co-fator de diversas enzimas. Tendo em vista a ampla atuação do ferro, Lourenço (2006), o classifica como um macronutriente.

2.3.2 Micronutrientes

Existem duas principais funções dos micronutrientes na célula de microalgas, uma delas é a participação na atividade de diversas enzimas, a outra a compor a estrutura de algumas organelas, como por exemplo, os ribossomos.

O manganês (Mn) é um micronutriente que atua na composição estrutural dos tilacóides nos cloroplastos e atua como co-fator de enzimas com atividade na síntese de ácidos graxos e enzimas do ciclo de Krebs, além de ter importante papel no transporte de elétrons no fotossistema II. Além disso, é componente estrutural da superóxido-dismutase, enzima que retira superóxidos tóxicos da célula. Em meios de culturas, o manganês é adicionado como cloreto de manganês hepta-hidratado quelado (BLABY-HAAS; MERCHANT, 2012).

O molibdênio (Mo) é constituinte de uma das principais enzimas presentes nas plantas e também nas microalgas, a nitrato redutase, que reduz nitrato a nitrito. Ademais, o molibdênio é co-fator de algumas enzimas que possuem atividade na

fotossíntese e na respiração, assim como a nitrogenase que fixa oxigênio em cianobactérias. Esse elemento pode ser limitante em água doce, ao contrário do que ocorre nos oceanos. A forma mais comum de encontrá-lo em meio de cultivo é como molibdato de sódio di-hidratado (AGUILAR; CÁRDENAS; FERNÁNDEZ, 1991).

Cobalto (Co), presente nos meios de cultivo como cloreto de cobalto, é exigido em pequenas concentrações pelas células. É componente principal de uma das três vitaminas mais importante para o crescimento da microalga, a cianocobalamina, além de participar do metabolismo do nitrogênio (LOURENÇO, 2006).

O zinco (Zn) está presente nas algas como componente estrutural, principalmente da enzima anidrase carbônica que é de extrema importância no transporte e na fixação do CO₂. Em situações em que o CO₂ está presente em baixas concentrações a quantidade desta enzima aumenta, de modo que a necessidade de zinco pela célula também é aumentada sob baixas quantidades de CO₂ (SUNDA, 1995). O zinco também é encontrado na estrutura da fosfatase alcalina, importante na aquisição de formas orgânicas do fósforo e em enzimas envolvidas na transcrição do DNA. Em meios de cultivos, a forma encontrada do zinco é uma das suas formas solúveis, o sulfato de zinco hepta-hidratado (BLABY-HAAS; MERCHANT, 2012).

A função do cobre (Cu) nas microalgas está relacionada com a obtenção de energia, pois é constituinte de coenzimas que participam no transporte de elétrons na fotossíntese, como a citocromo oxidase. O cobre não é um elemento limitante na natureza e em meios de culturas é adicionado como cloreto de cobre ou sulfato de cobre (MERCHANT *et al*, 2006).

O boro (B), encontrado nos meio de cultivos como ácido bórico, participa da composição de algumas enzimas do metabolismo primário. Pouco se sabe sobre as funções do boro, mas acredita-se que haja participação na regulação na utilização do carbono (GAUCH and DUGGER, 1953) e esteja presente na estrutura dos ribossomos.

O cálcio (Ca) pode ser encontrado nas células a forma de um componente estrutural como alginato de cálcio ou carbonato de cálcio, e atua como co-fator no

transporte de íons, ativação enzimática. É adicionado no cultivo como cloreto de cálcio (LOURENÇO, 2006).

Atuando no balanço de água tem-se o sódio (Na), encontrado nas células na forma iônica. Outra função é ativação da enzima nitrato redutase.

2.3.3 Dejeito suíno

Em regiões com alta densidade populacional de suínos, parte dos dejetos é lançada ao solo sem critérios e em cursos d'água sem tratamento prévio, gerando importante fonte de poluição ambiental.

O dejeito suíno possui altas quantidades de matéria orgânica, sobretudo fósforo e nitrogênio, compostos que podem ser utilizado pelas microalgas para o seu crescimento, visto que muitas espécies de microalga crescem em águas não potáveis. Além disso, o tratamento do dejeito com a utilização de microalgas é uma alternativa mais econômica e com menor gasto energético em relação aos tratamentos aeróbios e anaeróbios.

Os limites exigidos pelo CONAMA nº 357/2005 para lançamento do efluente tratado em corpos hídricos de água doce classe 3 são de 0,05 mg P.L⁻¹ para fosfato total e 1,0 a 13,3 mg N.L⁻¹ para nitrogênio amoniacal. A água doce classe 3 pode ser destinada ao consumo humano desde que tratada pelos métodos convencionais ou avançados, irrigação de algumas espécies vegetais, pesca amadora, recreação de contato secundário e dessedentação de animais.

2.4 MICROALGAS COMO MATÉRIA PRIMA PARA BIOCOMBUSTÍVEIS

A capacidade das microalgas de fixar dióxido de carbono em uma taxa mais elevada que os demais vegetais lhes conferem algumas vantagens de cultivo, uma vez que é possível utilizar a biomassa gerada de diversas maneiras, tais como suplemento alimentar para humanos; rações para animais, bioativos de valor

elevado (CHISTI, 2007), na aquicultura, produção de antioxidantes (PULZ E GROSS, 2004), além do potencial de produção de biocombustíveis.

Em função do crescente interesse pela pesquisa e desenvolvimento de novas fontes energéticas, o cultivo de microalgas vem ganhando destaque especial como fonte de matéria prima para produção de biocombustíveis diversos, em especial o biodiesel.

A figura 6 apresenta um fluxograma com diferentes alternativas de utilização da biomassa de microalgas para geração de energia.

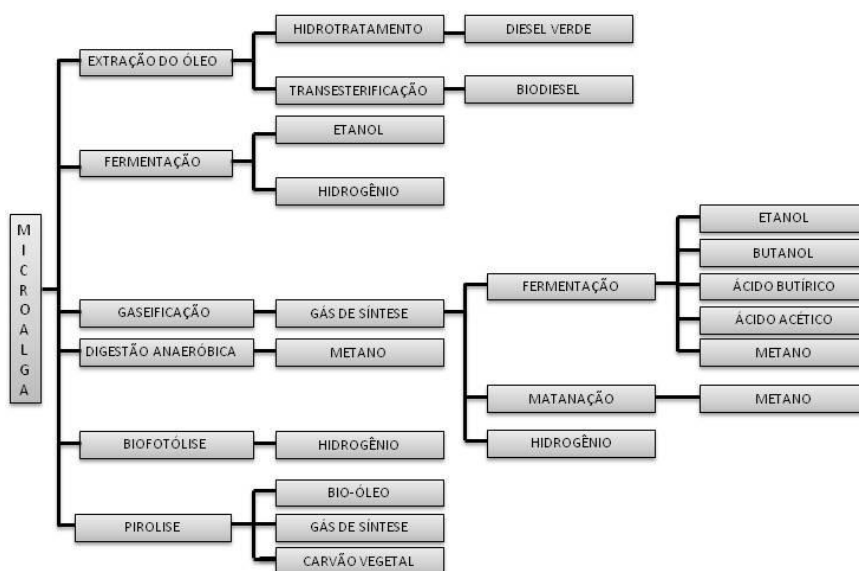


FIGURA 6 - POTENCIAL DAS MICROALGAS COMO FONTE DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

Fonte: Adaptado de Oncel. (2013).

2.4.1 Biodiesel de microalgas

Quimicamente, o biodiesel é um combustível formado por ésteres de ácidos graxos obtidos por transesterificação de triacilglicerídeos ou esterificação de ácidos graxos, na presença de metanol ou etanol em um catalisador básico ou ácido (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). A principal matéria prima utilizada para a produção de biodiesel é o óleo vegetal, como o da soja, do milho e da palma.

Entretanto, devido à preocupação da não utilização de terras aráveis, o óleo de microalga surge como uma alternativa interessante.

As microalgas podem sintetizar diversos tipos de lipídeos, dependendo das condições de cultivo. Sob condições ótimas de crescimento os tipos de lipídeos mais abundantes são os ácidos graxos presentes na membrana celular, entretanto, sob estresse há um estímulo para que as células passem a sintetizar triacilglicerídeos. Essas adversidades que levam ao estresse do cultivo podem ser físicas (luz e temperatura) ou químicas (privação de nutrientes, salinidade e pH) (HU *et al*, 2008).

Existe uma alternativa à rota de produção do biodiesel de microalgas conhecido como processo hidrocatalítico, no qual se utiliza hidrogênio ao invés de álcool, gerando o diesel verde. Seus coprodutos são propano, água e dióxido de carbono (KNOTHE, 2010). Uma das vantagens sobre o biodiesel é o baixo conteúdo de oxigênio na sua composição, bem similar aos combustíveis derivados de petróleo. Além disso, em sua composição há um número alto de cetanos, o que o torna mais energético em comparação ao biodiesel. Desse modo, o uso do diesel verde possui o potencial de utilizar o sistema de refinaria de petróleo já existente e ainda poder reutilizar seus coprodutos (água e CO₂) novamente nos cultivos de microalgas (ONCEL, 2013). Contudo, não há relato na literatura de produção em larga escala a partir da biomassa microalgal, apesar de que esse processo já vem sendo utilizado em gordura animal.

Ainda que a literatura científica aponte o potencial das microalgas em relação à produção de lipídeos e conseqüentemente a geração de biodiesel, o processo de extração do óleo da biomassa ainda se apresenta como um dos maiores desafios para viabilizar a tecnologia de produção de biodiesel de microalgas.

A Figura 7 ilustra as rotas para produção de biodiesel e diesel verde renovável a partir do óleo extraído da biomassa de microalgas.

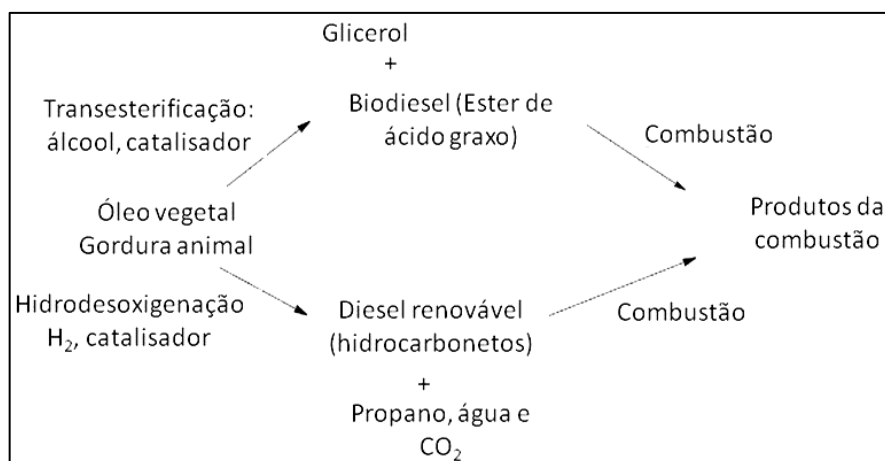


FIGURA 7 - RESUMO DA VIA DE SÍNTESE DO BIODIESEL E DIESEL VERDE RENOVÁVEL

Fonte: Adaptado de Knothe (2010).

Além da produção de biodiesel e diesel verde, o cultivo e produção de biomassa de microalgas apresenta a possibilidade de produção de várias outras formas de energia, como demonstrado na figura 6, dentre essas alternativas, é possível destacar a produção de hidrogênio e de bioetanol.

O hidrogênio é tido como um combustível renovável, sustentável e ecologicamente correto devido às suas propriedades únicas. A produção de hidrogênio pela fotólise da água é um processo biológico que pode armazenar energia química com a utilização da luz solar pela fotólise direta, ocorrendo principalmente em espécies de Chlorophyta. (LEVIN; PITT; LOVE, 2004).

Já o bioetanol de microalgas pode ser produzido através da fermentação da biomassa de microalgas (HO *et al*, 2013), depois da extração de lipídeos (LEE *et al*, 2013) ou através de reações intracelulares (HIRANO *et al*. 1997).

Ambas as alternativas de produção são objetos de estudo do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), na Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3 JUSTIFICATIVA

É crescente o esforço para desenvolver metodologias que viabilizem a substituição dos combustíveis de origem fóssil por combustíveis baseados em fontes renováveis. Nesse cenário, as microalgas se apresentam como uma alternativa promissora na geração de biocombustíveis, sobretudo na forma de biodiesel.

Embora possuam potencial teórico extremamente elevado, a utilização da biomassa de microalgas para produção de biodiesel esbarra em alguns obstáculos, dentre os quais é possível destacar a dificuldade operacional na realização dos cultivos, as metodologias de separação da biomassa e extração de óleo e os custos envolvidos durante a etapa de cultivo.

Inserido nesse contexto, e baseado no quadro promissor de utilização das microalgas, faz-se necessária a investigação científica e o desenvolvimento de cultivos economicamente mais viáveis.

Dessa forma, o presente trabalho pretende contribuir com a geração de novos dados acerca de cultivos realizados com meio nutriente alternativo, bem como na investigação de espécies com maior potencial para produção de biomassa e consequente produção de biodiesel.

4 OBJETIVOS

Os objetivos definidos para a realização desse trabalho estão divididos entre objetivo geral e objetivos específicos, ambos serão tratados a seguir.

4.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto tem por objetivo principal a redução do custo de produção da biomassa de microalgas como matéria prima para a produção de biocombustíveis através da adequação do meio de cultivo e pesquisa de diferentes espécies em escala laboratorial.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Testar em duas espécies de interesse do NPDEAS com maior produtividade em biomassa seca em escala laboratorial;
- Definir o meio e a concentração de nutrientes mais adequada ao crescimento dos cultivos e avaliar o efeito da redução da concentração de nutrientes nos cultivos;
- Utilizar resíduos agroindustriais como substituto ao meio sintético;
- Avaliar o padrão dos cultivos em ambiente externo. Realizar experimentos em escala piloto (40 L) para avaliar os efeitos do cultivo em ambiente externo;
- Quantificar os teores de lipídeos totais e de ácidos graxos conversíveis em biodiesel nos cultivos realizados em escala piloto.

Para a conclusão de cada objetivo específico, foi estabelecida uma estratégia, como apresenta a Figura 8.

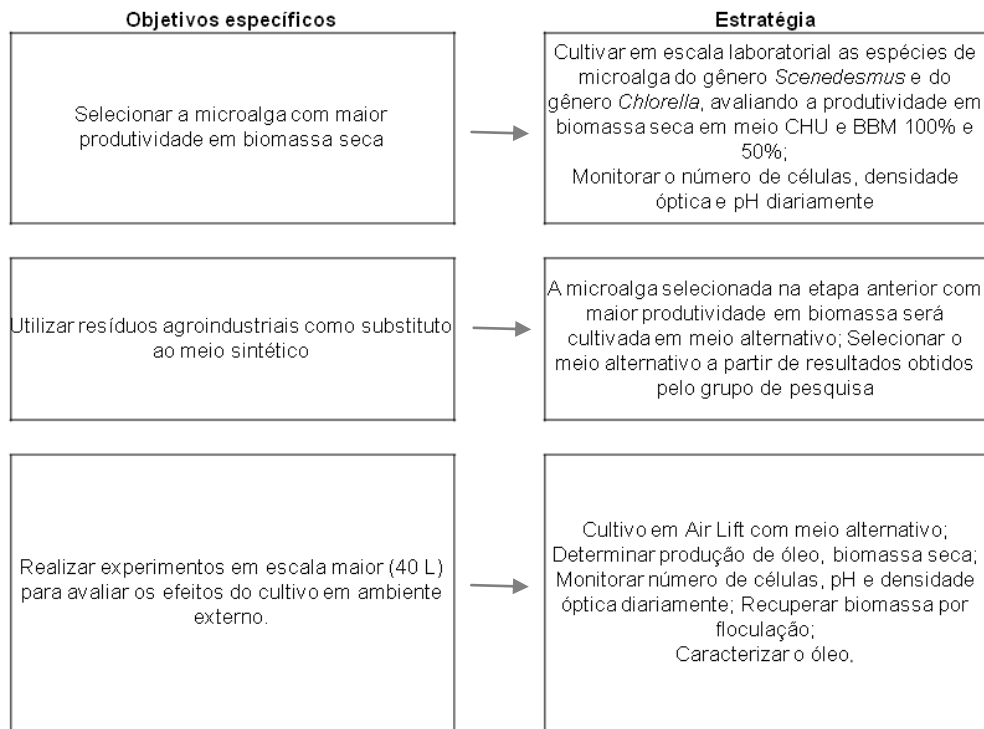


FIGURA 8 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ESTRATÉGIAS

FONTE: O Autor.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

As metodologias utilizadas durante a realização desse projeto estão apresentadas a seguir. Todas as etapas de cultivo e obtenção dos resultados foram realizadas nas instalações do (NPDEAS).

5.1 ESPÉCIES DE MICROALGAS UTILIZADAS

Para este trabalho foram utilizadas as espécies de microalga *Scenedesmus* sp e *Chlorella* sp (Figura 9), ambas mantidas em cultivo no NPDEAS.

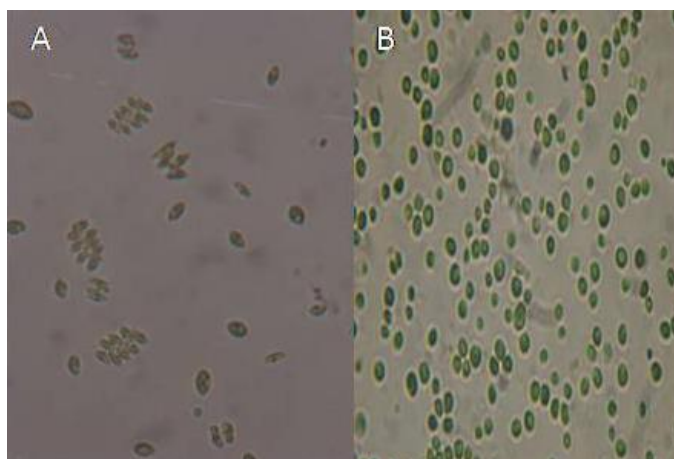


FIGURA 9 - *Scenedesmus* sp. (A) E *Chlorella* sp. (B). Aumento de 400 X.

FONTE: O Autor.

As duas espécies foram selecionadas em função de informações prévias disponíveis pelo grupo de pesquisa e a necessidade do NPDEAS selecionar uma microalga com melhor desempenho em um crescimento fotoautotrófico.

Scenedesmus é o mais comum e cosmopolita dos gêneros de algas verdes e são dos primeiros a colonizar um ambiente. A característica taxonômica distintiva do grupo é a ocorrência de colônias planas, formadas em geral por 2, 4, 8 ou até 16

células dispostas lateralmente. O gênero *Chlorella* é composto por indivíduos sempre solitários e de vida livre, uma característica marcante é a forma do cloroplasto, quando apenas um estiver presente possui a forma de taça, quando existir dois, estes têm a forma de calotas rasas e abertas (BICUDO; MENEZES, 2005).

5.2 MEIOS DE CULTURA

Estudos realizados em 2008 pelo grupo apontaram o meio sintético CHU (1942) como a melhor opção quando comparado aos meios sintéticos Guillard e F/2, a partir de então, todos os cultivos realizados no NPDEAS são mantidos em meio CHU. Esse meio possui concentração de nutrientes suficientes para manter um cultivo por muitos dias, assim como o *Bold Basal Medium* (BBM) recomendado pelo Centro de Cultura de Algas e protozoários, Cambridge (CCAP, 1992). O BBM era o meio utilizado para o crescimento da espécie *Chlorella* sp. utilizada neste trabalho antes de chegar ao NPDEAS. Apesar de serem muito parecidos, os meios utilizados apresentam algumas diferenças, sobretudo na composição dos micronutrientes.

A fim de comparar o comportamento dos cultivos em meios distintos e viabilizar a melhor condição de produção, foram utilizados os meios sintéticos CHU e BBM. A tabela 1 apresenta as composições dos meios utilizados.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA CHU E BBM

Componente	CHU		BBM	
	100% (g.L ⁻¹)	50% (g.L ⁻¹)	100% (g.L ⁻¹)	50% (g.L ⁻¹)
Nitrato de sódio	0,25	0,125	0,25	0,125
Cloreto de cálcio di-hidratado	0,025	0,0125	0,025	0,0125
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	0,075	0,0375	0,075	0,0375
Fosfato de potássio dibásico	0,075	0,0375	0,075	0,0375
Fosfato de potássio monobásico	0,175	0,0875	0,175	0,0875
Cloreto de sódio	0,025	0,0125	0,025	0,0125
EDTA	0,05	0,025	0,05	0,025
Hidróxido de potássio	0,031	0,0155	-	-
Sulfato ferroso hepta-hidratado	0,005	0,0025	0,005	0,0025
Ácido bórico	0,01142	0,00571	0,01142	0,00571
Sulfato de zinco hepta-hidratado	8,82x10 ⁻⁵	4,41x10 ⁻⁵	8,82x10 ⁻⁵	4,41x10 ⁻⁵
Cloreto de manganês tetra-hidratado	1,44x10 ⁻⁵	7,20x10 ⁻⁶	-	-
Sulfato de manganês hidratado	-	-	1,225x10 ⁻⁵	3,6x10 ⁻⁷
Molibdato de sódio	7,1x10 ⁻⁶	3,55x10 ⁻⁶	1,2x10 ⁻⁵	6x10 ⁻⁶
Sulfato de cobre penta-hidratado	1,57x10 ⁻⁵	7,85x10 ⁻⁶	1,57x10 ⁻⁵	7,85x10 ⁻⁶
Nitrato de cobalto hexa-hidratado	4,9x10 ⁻⁶	2,45x10 ⁻⁶	-	-
Cloreto de cálcio hexa-hidratado	-	-	9x10 ⁻⁶	4,50x10 ⁻⁶

FONTE: O autor.

5.3 ETAPAS DE CULTIVO

Os cultivos foram realizados em duas fases, sendo a primeira realizada em escala laboratorial e a segunda em ambiente externo em reatores do tipo airlift. Para fins de melhor entendimento, a etapa realizada em escala laboratorial será denominada fase 1 e a etapa realizada em reator airlift será denominada fase 2.

5.3.1 Fase 1

A fase 1 foi dividida em dois experimentos com a utilização dos dois diferentes meios sintéticos. No primeiro foi utilizado meio CHU nas concentrações de

100% e 50%, enquanto no segundo foi utilizado meio BBM nas mesmas concentrações, em ambos os experimentos foram utilizadas as duas espécies de microalgas. A figura 10 esquematiza os cultivos realizados durante a fase 1 com seus respectivos frascos utilizando os meios CHU e BBM nas concentrações de 50 e 100%, para ambas as espécies de microalgas utilizadas.

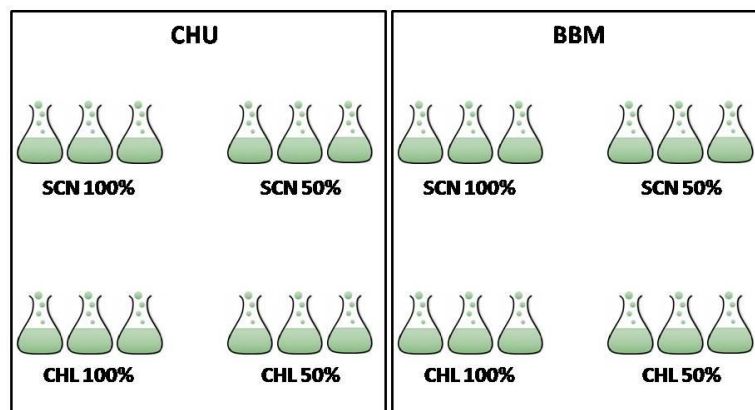


FIGURA 10 - EXPERIMENTOS REALIZADOS DURANTE A FASE 1

FONTE: O Autor

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 2000 mL, com volume operacional de 1600 mL, temperatura mantida em 22 °C, aeração constante de 3 L.min⁻¹, sem a implementação de fotoperíodo e durante período de 15 dias.

5.3.2 Fase 2

A fase 2 consistiu na realização de cultivo em reator do tipo airlift em ambiente externo. Para tanto foi utilizada a microalga do gênero *Scenedesmus* com os meios de cultura CHU 50% e dejetos suíno 2,5%, em função dos resultados obtidos na fase 1.

O reator do tipo airlift utilizado consiste de uma coluna ascendente de gaseificação com uma membrana difusora que permite alta eficiência na transferência de massa no interior do cultivo. A figura 11 apresenta o aspecto dos

cultivos realizados durante a fase 2, realizada em ambiente externo e utilizando os reatores do tipo airlift desenvolvidos e construídos pelo NPDEAS.

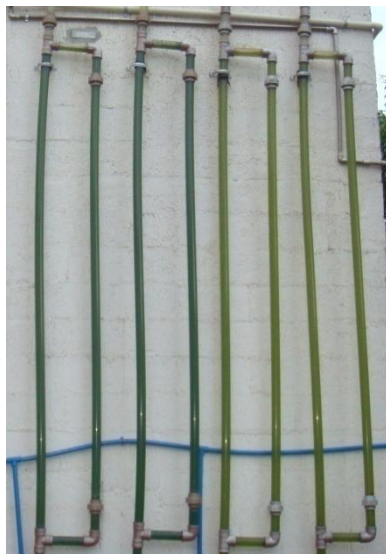


FIGURA 11 - REATORES DO TIPO AIRLIFT UTILIZADOS NA FASE 2

FONTE: O Autor.

A fase 2 permitiu a comparação da produtividade da microalga utilizando o meio sintético e o meio alternativo, o que possibilita a redução dos custos de produção.

5.4 METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DOS CULTIVOS

A fim de identificar a microalga com maior potencial na produção de biodiesel e o meio com maior produtividade, parâmetros como a densidade celular, densidade óptica, biomassa seca e teor de lipídeos foram acompanhados durante o período de execução dos cultivos nas fases 1 e 2.

5.4.1 Concentração celular

Com a finalidade de determinar o aumento da concentração celular foram realizadas contagens diárias com auxílio de um hemocitômetro em microscópio

óptico. Para tanto, foram recolhidas alíquotas com volume aproximado de 1 mL de cada cultivo para realização das análises.

5.4.2 Densidade óptica

A densidade óptica é um método indireto para estimar a concentração celular, de tal modo que, quanto maior o número de células na amostra, maior o espalhamento da luz (LOURENÇO, 2006). Sendo assim, foram realizadas leituras em espectrofotômetro diariamente aproveitando o mesmo volume retirado para contagem. O comprimento de onda utilizado foi de 540 nm por ser um comprimento de onda não absorvido pelas clorofilas a e b presentes nas células.

5.4.3 Biomassa seca

A determinação da biomassa seca foi realizada por análise gravimétrica através da filtração de alíquotas de 10 mL de cultivo em membrana de microfibras de vidro. Tais análises foram realizadas em dias alternados, a fim de minimizar os impactos decorrentes da retirada de volume de cultivo para análise.

O cálculo para quantificação da biomassa seca pelo método gravimétrico foi:

$$B_s = \frac{P_2 - P_1}{V} \quad (1)$$

Onde:

B_s : biomassa seca (g.L^{-1})

P_1 : massa da membrana seca (g)

P_2 : massa da membrana com biomassa (g)

V : volume do cultivo filtrado (mL)

Para o cálculo da biomassa seca nos cultivos em dejetos suíno, o valor de biomassa seca inicial foi subtraído das respectivas medidas diárias (Δ de biomassa). De modo a diminuir a interferência dos sólidos totais presentes no resíduo.

5.4.4 Teor de lipídeos totais

A fim de caracterizar o potencial de utilização das microalgas na produção de biodiesel foi realizada a quantificação do teor de lipídeos totais presentes na biomassa produzida durante o período de execução desse projeto. A metodologia utilizada consiste em extração a frio utilizando uma mistura de solventes (clorofórmio:metanol) conforme descrito por Bligh & Dyer (1959).

Para quantificação foi utilizada a seguinte equação:

$$L_t = \frac{(v_2 - v_1)}{b} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

L_t : Lipídeos totais (%)

v_1 : massa do vial vazio (g)

v_2 : massa do vial com óleo (g)

b : biomassa seca utilizada (g)

5.4.5 Ésteres metílicos de ácidos graxos (Biodiesel)

As amostras foram submetidas à esterificação para quantificação do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) presentes na biomassa. Foi realizada a metodologia de Hartman e Lago (1973) como modificações propostas por Menezes *et al.* (2012). Para cada 200 mg de biomassa seca presente em cada tubo, foram adicionados 3 mL de uma solução de Metóxido (NaOH – 99% m/m / MeOH. 0,5

mol.L⁻¹). Posteriormente, os tubos foram imersos em um banho a 90 °C por 10 minutos. Passado esse período, foram colocados em um banho de gelo. Após resfriamento, foram adicionados 9 mL de uma solução esterificante preparada a partir de 2 g de cloreto de amônio (NH₄Cl), 60 mL de metanol e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado, e imersos no mesmo banho a 90 °C por 10 minutos. Logo após, novamente foram resfriados e procedeu-se a extração dos monoésteres com n-heptano, sendo realizadas 3 extrações consecutivas, intercaladas com 3 lavagens com água destilada. A fase do solvente contendo os monoésteres foi coletada com pipeta Pasteur e armazenada em um vial com massa pré-determinada. O mesmo foi submetido à secagem para determinação da massa de monoésteres e cálculos de conversão. Após esse procedimento, o mesmo vial foi ressolubilizado com n-heptano. 99% v/v. para conservação dos EMAG's e posterior análise cromatográfica para análise qualitativa.

A conversão mássica dos ensaios de esterificação dos extratos graxos em EMAG foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$X = m_f - m_0 \times \frac{100}{m_A} \quad (3)$$

Onde:

X : conversão mássica da amostra em EMAGs (%)

m_f : massa do vial seco com os EMAGs obtidos (g)

m_0 : massa do vial vazio (g)

m_A : massa da biomassa utilizada para esterificação (g)

5.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todos os resultados apresentados estão representados pelas médias dos resultados das amostras individuais de cada experimento, calculadas através da realização de leituras em triplicata. Os desvios padrões foram multiplicados por dois, para que o nível de significância dos erros corresponda a 95% dos valores das amostras.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 FASE 1

Os resultados referentes à fase 1, escala laboratorial, estão divididos entre os experimentos de cultivo com meio CHU e os experimentos de cultivo utilizando meio BBM. A seguir serão apresentados os dados obtidos aos cultivos em escala laboratorial.

6.1.1 Cultivos em meio CHU

Os primeiros resultados obtidos foram as curvas de crescimento das microalgas *Scenedesmus* sp. (SCN) e *Chlorella* sp. (CHL) em meio CHU nas concentrações 100% e 50% como pode ser visualizado na Figura 12.

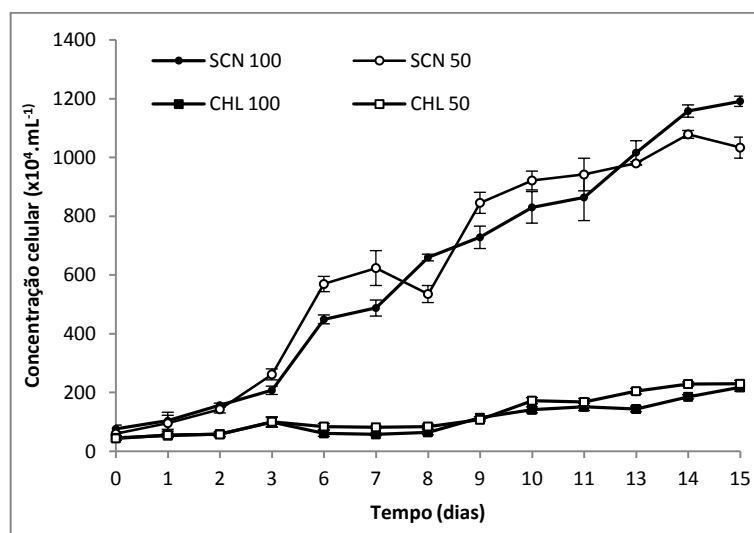


FIGURA 12 - CRESCIMENTO DAS MICROALGAS EM MEIO CHU

FONTE: O Autor.

Observa-se que os cultivos iniciaram com uma concentração celular bem próxima e fica evidente no gráfico a diferença na taxa de crescimento entre as duas espécies, contudo o crescimento entre os cultivos da mesma espécie em diferentes concentrações do meio CHU foram extremamente parecidos. Dada a grande semelhança entre os dois meios utilizados, pode-se inferir que a presença do elemento traço nitrato de cobalto e a falta do elemento traço cloreto de cálcio hexahidratado no meio CHU tenha resultado na diminuição da taxa de crescimento em *Chlorella* sp.

É interessante observar que entre os cultivos da microalga *Scenedesmus* sp., os cultivos com 50% do meio CHU já estavam entrando na fase estacionária. Essa fase pode durar por um tempo indeterminado, dependendo da espécie, de qualquer modo, é nessa fase em que as células passarão a armazenar gordura e é fundamental conhecer o tempo que um cultivo leva para entrar nessa fase, principalmente quando se trabalha com a produção de biodiesel.

A figura 13 apresenta os dados de densidade óptica para os cultivos utilizando meio CHU 100% e 50%.

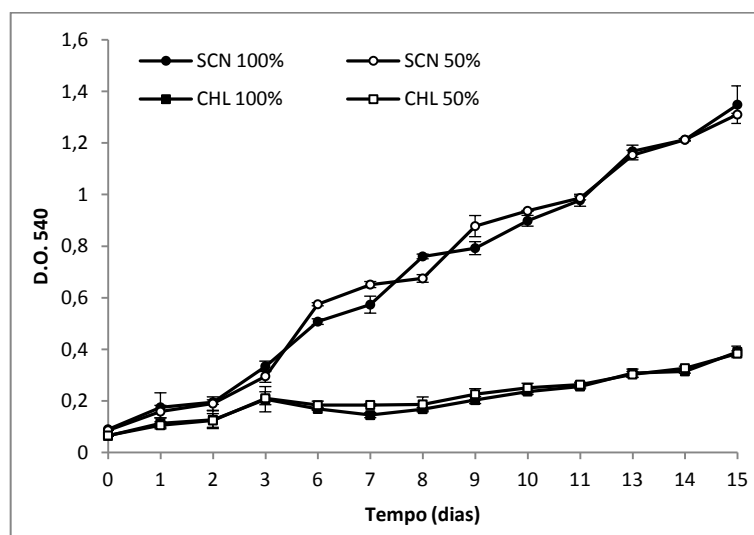


FIGURA 13 - DENSIDADE ÓPTICA DOS CULTIVOS EM MEIO CHU

FONTE: O Autor.

A densidade óptica é um método indireto de avaliar o crescimento de um cultivo e de fato o resultado observado na Figura 13 corrobora com a curva de crescimento apresentado na figura 12.

6.1.2 Cultivos em meio BBM

Assim como para os cultivos realizados em meio CHU, os cultivos realizados em meio BBM foram realizados em escala laboratorial nas concentrações de 100% e 50%. A figura 14 apresenta os dados de crescimento celular para as espécies *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. com meio BBM.

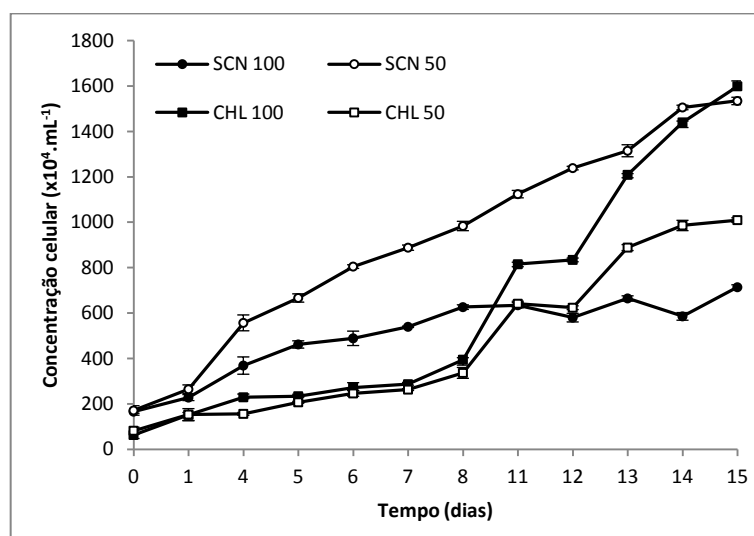


FIGURA 14 - CRESCIMENTO DAS MICROALGAS EM MEIO BBM

FONTE: O Autor.

Comparando os cultivos da espécie *Scenedesmus* sp., observa-se uma diferença notável entre os dois meios. Em meio CHU, essa microalga cresceu a taxas bem próximas, tanto na concentração de 100% quanto na de 50%, por outro lado, em meio BBM, a microalga cresceu melhor com 50% do meio, chegando a uma concentração de 1534×10^4 células.mL⁻¹, enquanto o cultivo com 100% do meio, não passou de 714×10^4 células.mL⁻¹.

Outra peculiaridade foi a curva de crescimento da microalga *Chlorella* sp., onde os cultivos em meio CHU, nas concentrações 100% e 50%, não ultrapassaram a concentração celular de 217×10^4 células.mL⁻¹ com 100% do meio e de 229×10^4 células.mL⁻¹ com 50% do meio, valores bem distintos dos observados em meio BBM

que alcançaram os valores de 1599×10^4 células.mL⁻¹ e 1009×10^4 células.mL⁻¹ com 100% e 50% da concentração do meio, respectivamente.

Vale ressaltar que ambas as espécies já vinham sendo cultivada em meio CHU antes do início deste experimento, de modo que já se esperava uma curva de crescimento sem a fase de adaptação nos experimentos em meio CHU. Isso era esperado mesmo no meio CHU 50%, já que todos os componentes do meio estavam presentes. No entanto, a ausência da fase de adaptação não era esperada no meio BBM, já que alguns componentes presentes em meio CHU, não estão presentes no meio BBM.

A Figura 15 apresenta os dados de densidade óptica medida em 540 nm para os cultivos mantidos meio BBM 100% e 50%. Novamente é possível observar alguma similaridade entre as curvas de crescimento celular e as curvas de densidade óptica, o que indica que apesar de não ser uma técnica precisa para determinação do crescimento das microalgas, pode ser utilizada como uma técnica acessória para essa finalidade.

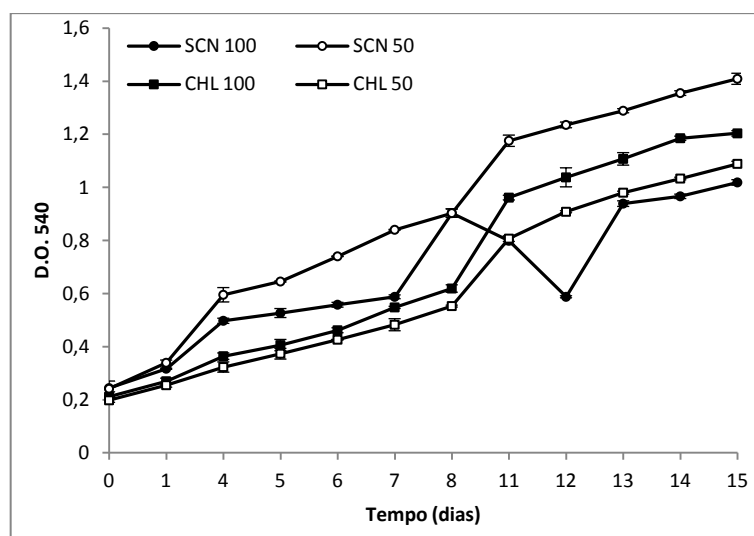


FIGURA 15 - DENSIDADE ÓPTICA DOS CULTIVOS EM MEIO BBM

FONTE: O Autor.

6.1.3 Produção de biomassa na fase 1

A produção de biomassa foi o fator de decisão que balizou a escolha da microalga *Scenedesmus* sp. para o cultivo da fase 2 e como pode ser observado na

Figura 16, essa espécie produziu cerca de 22 mg.L⁻¹.dia⁻¹. Esse valor é muito próximo ao encontrado no cultivo com a *Scenedesmus* sp. em meio CHU 100%, que atingiu 20 mg.L⁻¹.dia⁻¹, isto é, mesmo reduzindo a concentração do meio CHU pela metade, se obtém a mesma produtividade em biomassa seca.

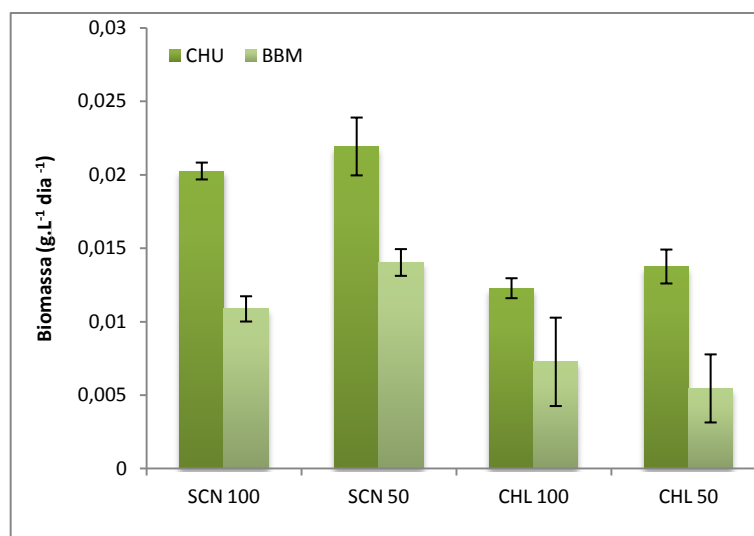


FIGURA 16 - PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DAS ESPÉCIES *Scenedesmus* sp. E *Chlorella* sp

FONTE: O Autor.

Comparando os experimentos com a espécie *Scenedesmus* sp. em meio CHU e BBM, verifica-se que os cultivos com 50% de ambos meios produziram mais biomassa por litro de cultivo. De acordo com Hu *et al.* (2008), em condições ótimas de crescimento as microalgas sintetizam principalmente lipídeos de membranas, a maioria ácidos graxos poli-insaturados derivados da dessaturação aeróbica e da alongação de um ácido graxo palmítico (16:0) ou oleico (18:1 ω 9) precursor. Em situações de estresse, como a privação de nutrientes, altera-se a via de biossíntese de lipídeos para formação e acúmulo de lipídeos neutros, principalmente triacilglicerídeos (TAG), que estão relacionados com o armazenamento de carbono como fonte de energia.

Desse modo, as microalgas que cresceram em meio CHU e BBM 50%, após consumirem parte dos nutrientes, passaram a enfrentar uma situação de privação nutricional, assim as células passaram a sintetizar TAG para armazenagem, o que as tornam maiores produtoras de biomassa. Por outro lado, as microalgas que

creciam em meio completo, não chegaram a consumir todos nutrientes em 15 dias de cultivo, permanecendo numa situação de crescimento ótimo, sem a necessidade de estocar energia na forma de TAG.

6.2 FASE 2

Após a obtenção do melhor resultado na fase 1 com a espécie *Scenedesmus* sp. em meio CHU 50%, iniciou-se a fase 2 deste estudo em ambiente externo e utilizando reator do tipo airlift.

Com o objetivo de diminuir os custos de produção por meio do uso de meios de cultura alternativo, como o dejetos suíno biodigerido, a microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada em meio CHU 50% como controle e em dejetos suíno biodigerido em concentração de 2,5%. Com esse experimento, o objetivo foi alcançar valores de biomassa e lipídeos iguais ou superiores aos encontrados em meio sintético.

A Figura 18 mostra a curva de crescimento obtida nos cultivos em meio CHU 50% e em dejetos suíno. Observa-se que no dia três o cultivo em dejetos suíno possuía cerca de 1,7 vezes mais células do que em meio sintético, com 731×10^4 células.mL⁻¹ para dejetos e 438×10^4 células.mL⁻¹ para CHU. A partir de então, essa diferença não possui grandes variações até atingir o dia 14 onde o cultivo em meio CHU passa a ser mais concentrado, com 1991×10^4 células por mililitro, enquanto o cultivo em dejetos suíno inicia a fase de declínio com 1892×10^4 células por mililitro. Kim *et al*, (2007) cultivando uma espécie do gênero *Scenedesmus* conseguiu em 15 dias de cultivo uma concentração de 500×10^4 células.mL em dejetos suíno

Cabe ressaltar que o meio alternativo utilizado é correspondente a uma concentração igual a 2,5% de dejetos suíno biodigerido sendo possível que a baixa concentração do meio alternativo tenha resultado em rápido consumo de nutrientes, levando o cultivo a apresentar esse perfil de crescimento.

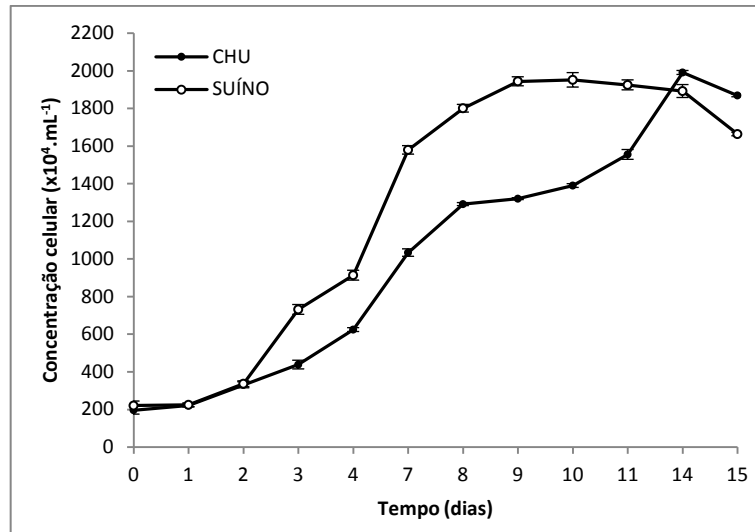


FIGURA 17 - CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus sp.*

FONTE: O Autor.

Assim como nos dados apresentados anteriormente, as curvas de densidade óptica obtidas durante os experimentos da fase 2 apresentam alguma similaridade com as curvas de crescimento apresentadas acima.

A Figura 19 apresenta os perfis de densidade óptica observados para os cultivos em meio CHU 50% e dejetos suíno realizados em reator do tipo airlift.

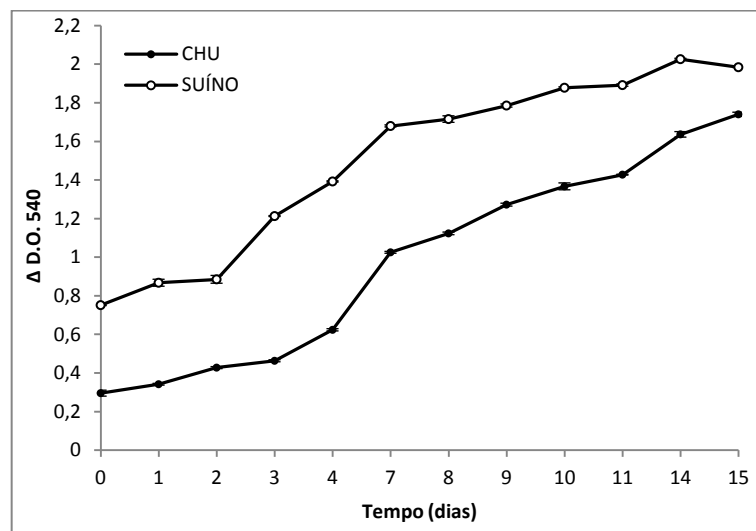


FIGURA 18 - DENSIDADE ÓPTICA DOS CULTIVOS REALIZADOS EM REATOR AIRLIFT

FONTE: O Autor.

Como o dejetos suíno possui grande quantidade de sólidos totais em sua composição, a biomassa seca no dia zero apresentou uma média de $150 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ deste modo, para minimizar o erro no cálculo da produtividade de biomassa, foi subtraído de cada ponto o valor da biomassa inicial.

Ao longo do experimento o cultivo em meio CHU apresentou uma queda após um aumento brusco na biomassa. Apesar deste evento, a quantidade de biomassa continuou a aumentar até o último dia, desta forma, pode-se presumir que o cultivo ainda não estivesse em declínio. Por outro lado, o cultivo em dejetos suíno apresentou um aumento contínuo, se estabilizando nos últimos dois dias de cultivo, demonstrando que de fato o cultivo estava entrando em fase de declínio, como indicado na Figura 20.

Ao final dos 15 dias, o cultivo em meio CHU apresentou aumento de biomassa de aproximadamente 10 vezes, iniciando com $58 \pm 0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ e alcançando a quantidade de $584 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}$. Quando se analisa a produtividade em dejetos suíno a biomassa aumentou cerca de 14 vezes, indo de $44 \pm 0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ para $640 \pm 0,06 \text{ mg.L}^{-1}$. Em 1989 de La Nöue e Bassères conseguiram uma produção de aproximadamente 550 mg.L^{-1} em 12 dias de cultivo utilizando 2% e 3% de dejetos suíno biodigerido com uma espécie de *Scenedesmus*, Abau-Shanab *et al.* em 2013 obtiveram 530 mg.L^{-1} em 20 dias de cultivo utilizando dejetos suíno como meio para o crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus*, resultados que corroboram com os encontrados neste estudo e indicam viabilidade da substituição do meio sintético por dejetos agroindustriais.

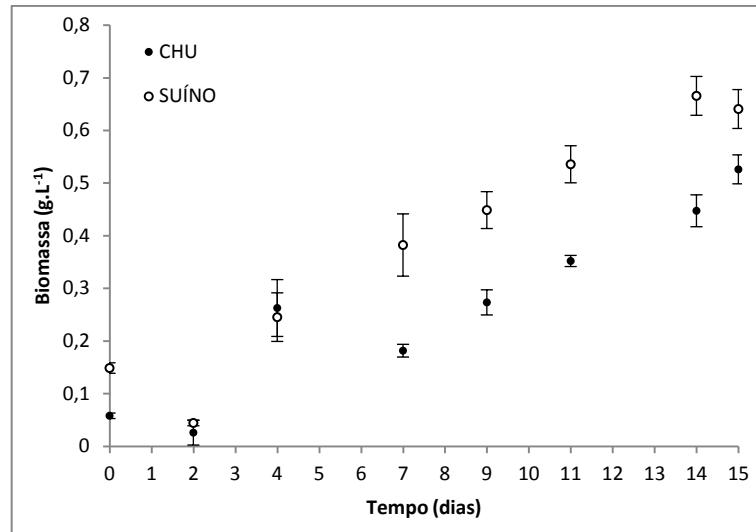


FIGURA 19 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO CHU E DEJETO SUÍNO (FASE 2)

FONTE: O Autor.

Nessa segunda fase, a quantidade de lipídeos totais foi calculada para os cultivos de ambos os meios no último dia de cultivo utilizando o método a frio proposto por Bligh & Dyer (1957).

O cultivo em dejetos suínos, além de possuir maior produtividade em biomassa seca, também apresentou maior quantidade em lipídeos totais como mostrado na tabela 2. Esse resultado pode estar relacionado com o percentual de dejetos suínos utilizados, de modo a induzir nas células a via de síntese dos triacilglicerídeos no período de 15 dias.

TABELA 2 - BIOMASSA E TEOR DE LIPÍDEOS TOTAIS NOS CULTIVOS REALIZADOS NA FASE 2

Meio	Biomassa Final (mg.L ⁻¹)	Produtividade de biomassa (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Lipídeos totais Final (mg.L ⁻¹)	Produtividade de lipídeos (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)
CHU	584	39	70	4,6
SUÍNO	640	43	102	6,8

FONTE: O Autor.

O teor de lipídeos encontrado em microalgas pode variar muito de acordo com a fase em que o cultivo se encontra ou dependendo de alguns parâmetros, como a formulação do meio nutritivo em que a alga cresce, à temperatura e à intensidade luminosa (HU *et al.*, 2008).

Os resultados de teores de lipídeos obtidos nesse trabalho foram comparáveis aos resultados observados na literatura para outras espécies do mesmo gênero, como indica a tabela 3.

TABELA 3 - TEORES DE LIPÍDEOS DE MICROALGAS DO GÊNERO *Scenedesmus*

Espécie	Teor de lipídeos (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11 – 55
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9 – 18,4
<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6 – 21,1
CHU*	12
Suíno*	16

FONTE: Adaptada de Amaro, Guedes e Malcata (2011)

NOTA: * Resultados obtidos neste trabalho.

6.3 BIODIESEL

Após a esterificação foi possível quantificar o teor de EMAGs em cada amostra de biomassa seca a partir da equação 3. A tabela 4 compara o teor de conversão entre as amostras de biomassa cultivadas nos dois diferentes meios. Observa-se que a taxa de conversão nesse experimento é relativamente baixa quando comparada a resultados de outros pesquisadores do grupo que utilizaram o óleo extraído para esterificação, que chega a converter cerca de 70% dos lipídeos totais em EMAGs (TAHER, 2013; SCHROEDER, 2013). A cerca desse resultado conclui-se que novos testes devem ser realizados se desejar viabilizar o uso de biomassa seca para esterificação dos ácidos graxos, como utilizar uma quantidade maior que 200 mg de biomassa seca e/ou aumentar o volume dos reagentes para esterificação.

TABELA 4 - TEOR DE CONVERSÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS EM EMAGs

Meio	Lipídeos totais (% ¹)	X _{EMAG} (%)
CHU	12	6,50
SUÍNO	16	9,00

FONTE: O autor.

Os resultados da análise cromatográfica para qualificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos não foram incluídos nesse documento, embora os ensaios pertinentes estejam sendo realizados.

6.4 CUSTOS DE PRODUÇÃO

A fim de determinar a redução dos custos de produção de biomassa relativos à substituição do meio utilizado, foi realizado durante o mês de novembro de 2013 um levantamento de preços dos elementos componentes do meio sintético utilizado. A tabela 5 apresenta os custos para produção de 1 litro de cultivo do meio CHU.

Para determinação dos custos de produção utilizando o meio alternativo com dejetos suíno foram considerados os gastos de transporte do dejetos desde a propriedade rural na cidade de Araucária na região metropolitana de Curitiba até o NPDEAS, localizado no Centro Politécnico, sendo assim, o custo para produção de 1 litro de meio alternativo na concentração de 2,5% foi de R\$ 0,001563, valor 15 vezes menor do que para o meio CHU na sua composição original.

Considerando o volume de produção em escala industrial realizada no NPDEAS com reatores de 10 m³, o custo na utilização do meio CHU 100% seria de R\$ 238,00, enquanto que no uso do meio sintético em 50%, seria de R\$ 119,00. Nesse sentido, a utilização do dejetos suíno para o mesmo volume de operação seria de R\$ 15,63, uma redução de 83% dos custos com meio nutritivo.

TABELA 5 - CUSTOS PARA PRODUÇÃO DE 1 LITRO DE MEIO DE CULTIVO SINTÉTICO

Componente	CHU 100%	CHU 50%
Nitrato de sódio	0,0064	0,0032
Cloreto de cálcio di-hidratado	0,0007	0,0003
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	0,0013	0,0006
Fosfato de potássio dibásico	0,0026	0,0013
Fosfato de potássio monobásico	0,0076	0,0038
Cloreto de sódio	0,0003	0,0001
EDTA	0,0030	0,0015
Hidróxido de potássio	0,0015	0,0008
Sulfato ferroso hepta-hidratado	0,0002	0,0001
Ácido bórico	0,0002	0,0001
Sulfato de zinco hepta-hidratado	0,0000	0,0000
Cloreto de manganês tetra-hidratado	0,0000	0,0000
Molibdato de sódio	0,0000	0,0000
Sulfato de cobre penta-hidratado	0,0000	0,0000
Nitrato de cobalto hexa-hidratado	0,0000	0,0000
TOTAL	0,0238	0,0119

FONTE: O Autor.

Avaliando a possibilidade da implementação de um fotobiorreator em uma área rural com produção de suínos, esse gasto seria ainda menor, visto que não haveria gastos com meio de transporte.

6.5 BIORREMEDIAÇÃO

Trabalhos realizados anteriormente por integrantes do NPDEAS apontam para redução dos níveis de nutrientes presentes no dejetos suíno variando de 82 a 99,6% (TAHER, 2013; OLIVEIRA, 2013), Franchino *et al.* (2013) com a utilização da microalga *Chlorella vulgaris* cultivadas em um mistura de resíduos agroindustriais biodigeridos obteve uma redução de 97% dos níveis de fosfato e 98% de amônia, Abou-Shanab (2013) mostrou que o crescimento de microalgas em dejetos suíno pode reduzir cerca de 47% dos níveis de fósforo, 33% de cálcio e 21% de carbono inorgânico. Nesse mesmo ano, o trabalho de Rassoul-Amini *et al.* mostra que águas residuais tiveram 85% dos níveis de amônia reduzidos e uma redução de 99% dos

níveis de fósforo após tratamento com microalgas. Com base nesses dados, é possível indicar a possibilidade de descarte da água resultante após a separação da biomassa em corpos hídricos de classe 3, de acordo com a resolução CONAMA n. 357/2005 (TAHER, 2013).

7 CONCLUSÕES

O objetivo principal desse trabalho foi a redução dos custos de produção de microalgas em cultivo através da utilização de meio de cultivo alternativo, nesse caso o dejetos suíno biodigerido.

Sendo assim, os resultados obtidos durante a realização dos cultivos permitem concluir o seguinte:

- A microalga *Scenedesmus* sp. apresentou maior potencial de produção de biomassa em cultivo em escala laboratorial, quando comparada à *Chlorella* sp., mostrando ser mais adequada ao cultivo em escala piloto;
- O meio sintético CHU 50% apresentou melhores resultados de produção de biomassa em escala laboratorial, quando comparado ao meio BBM nas concentrações de 100% e 50%, o que aponta para a possibilidade de economia na formulação do meio utilizado;
- Os cultivos realizados em escala piloto, em ambiente externo e realizados em reator airlift, demonstraram que o meio alternativo composto por dejetos suíno biodigerido apresentou melhores resultados de produção de biomassa e lipídeos totais, quando comparado com o meio sintético CHU na concentração de 50%;
- Os cultivos com meio alternativo apresentaram custos 15 vezes menores do que na produção com meio sintético, o que aponta para maior viabilidade econômica desse processo;
- Com a realização dos cultivos em meio alternativo, comprovou-se sua eficiência na biorremediação do efluente suíno. Sendo assim, uma excelente alternativa para problemas ambientais.

É possível pontuar ainda o crescente interesse da comunidade científica sobre a utilização das microalgas na geração de biocombustíveis, o que constitui em oportunidades promissoras de atuação para biólogos interessados em contribuir com o desenvolvimento dessa área.

8. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ao longo deste trabalho alguns pontos puderam ser identificados para que o processo em escala industrial seja aprimorado. Com base nesses aspectos, algumas sugestões podem ser feitas para a realização de trabalhos futuros:

- Cultivar diferentes espécies de microalgas, buscando aquela com maior produtividade em óleo e que se adapte às condições de cultivo em ambiente externo;
- Testar novos meios de cultivo alternativos, baseados em resíduos agroindustriais;
- Desenvolver uma metodologia de reutilização da água após a recuperação da biomassa de microalga por floculação ou centrifugação;
- Implementar a redução de nitrato do meio para aumentar a produção de triacilglicerídeos pelas células de microalgas;
- Identificar a nível específico as microalgas utilizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAUD-SHANAB, R. A. I. et al. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. **Journal of Environmental Management**, v. 115, p. 257 – 264. 2013.

AGUILAR, M. R.; CÁRDENAS, J.; FERNÁNDEZ, E. Regulation of molybdenum cofactor species in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 463 – 469. 1991.

BLABY-HAAS; C. E.; MERCHANT, S. S. The ins and out of algal metal transport. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1531 – 1552, 2012,

BICUDO, C. E. M; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. São Carlos: RiMa, 2012.

BLIGH, E. G., DYER, W. J.. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Phys.** 1959,37, 7.

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

DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. **Applied Energy**, v. 88, p. 3541 - 3547, 2011.

DE LA NÖUE, J.; DE PAUW, N. The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. **Biotechnology advances**, v. 6, p. 725 - 770, 1988.

DE LA NÖUE, J.; BASSÈRES, A. Biotratament of anaerobically digest swine manure with microalgae. **Biological Wastes**, v. 29, p. 17 – 31. 1989.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 776-792, abr. 2009.

FRANCHINO, M. et al. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere*, v. 92, p. 738- 744. 2013.

GAUCH, H. G.; DUGGER JR, W. M. The role of boron in the translocation of sucrose. **Plant Physiology**. v. 28, p. 457 – 466. 1953

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

GROBBELAAR, J. U. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, 2004. p. 97 – 115.

HO *et al.* Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresearch Technology**. v. 135, p. 191 – 198. 2013.

HU, Q. *et al.* Microalgae triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**. v. 54, p. 621 – 639. 2008.

KIM *et al.* Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2220 – 2228. 2007.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 36, p. 364 – 373. 2010.

LEE *et al.* Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresearch Technology**. v. 132, p. 197 – 201. 2013.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 29, p. 173 – 185. 2004.

LOURENÇO, S. de O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. [S.l.]: Rima, 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 217 - 232, 2010.

OLIVEIRA, A. C. **Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013

ONCEL, S. S. Microalgae for a macroenergy world. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 26, p. 241 – 264. 2013.

MERCHANTE *et al.* Between a rock and a hard place: Trace element nutrition in *Chlamydomonas*. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 578 – 594.

PULZ, O. GROSS W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Microbiol. Biotechnol**, v 65, p. 635 – 648, 2004.

RASSOUL-AMINI, S. et al. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2013.

SCHROEDER, L **Obtenção de ácidos graxos de biomassa úmida de microalgas através de saponificação**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013

SINGH, G. H.; SHARMA, S. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2347 - 2353, 2012.

SUNDA, W.G.; PRICE, N.M; MOREL, F.M.M. Trace metal ion buffers and their use in culture studies. In: ANDERSEN, R. A. **Algal Culture Techniques**. Elsevier/Academic Press. San Diego, p. 35 – 63. 2005.

TAHER. D. M. **Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigerido**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, 2004. p. 178 – 214.

TREDICI, M. R. Mass production of microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, 2004. p. 178 – 214.

WANG, B.; LAN, C. Q.; HORSMAN, M. Close photobiorreactor for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 904 – 912, 2012.

ZHANG, Y. *et al.* Characterization of H₂ photoproduction by a new marine green alga, *Platymonas helgolandica var. tsingtaoensis*. **Applied Energy**. v. 92, p. 38 – 43. 2012.