

MARIA ALEJANDRA CRUZ SALAZAR

PRODUÇÃO DE BIOMASSA E HIDROCARBONETOS A PARTIR DA MICROALGA
Botryococcus braunii UTILIZANDO ESGOTO DOMÉSTICO TRATADO
SECUNDARIAMENTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2014

DEDICATORIA

Dedico este trabalho a minha família no Equador, especialmente aos meus pais Marco e Sandra pelo apoio apesar da distancia, e seu exemplo de luta constante. A Sebastián por estar sempre de meu lado e iluminar a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski, pelo acompanhamento, orientação e amizade.

À meu coorientador, Prof. Carlos Ricardo Soccol pelo acompanhamento, orientação e a oportunidade.

Ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, do Setor de Engenharia, da Universidade Federal do Paraná, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Luciana Vandenbergue, pelo apoio recebido.

Aos Professores do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pelas contribuições e sugestões no trabalho.

À Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) por permitir a colheita de amostras para este trabalho.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório pelo apoio, amizade, sugestões e companhia nesses dois anos de mestrado.

RESUMO

Botryococcus braunii tem uma notável capacidade para acumular lipídeos entre eles vários hidrocarbonetos de cadeia longa, moléculas de interesse na área de biocombustíveis, porém é uma microalga de crescimento lento, assim é necessário utilizar ferramentas como a estatística para otimizar as condições do cultivo e incrementar a produção da biomassa. No presente trabalho otimização estatística do meio de cultura, da concentração do inoculo, concentração de CO₂ e intensidade de luz foram realizadas, utilizando duas cepas de *B. braunii* UTEX LB 572 and CCAP 807/2. Como primeiro passo o crescimento da microalga foi avaliado usando três meios encontrados na literatura para cultivo de *B. braunii*, CHU₁₃, BG₁₁ e 3N-MBM, e três taxas de inoculação (0,05 gL⁻¹, 0,1 gL⁻¹ and 0,2 gL⁻¹) não houve diferença significativa entre os meios de cultivo mas entre a taxa de inoculação a melhor produção de biomassa foi utilizando 0,2gL⁻¹. O segundo passo foi otimizar a concentração de três sais importantes para o crescimento de *B. braunii*, segundo a literatura e a experiências próprias no laboratório. Os sais testados foram: nitrato de sódio, citrato férrico e fosfato de potássio dibásico. Os resultados das concentrações ótimas dos três sais testados foram 0,3 gL⁻¹; 0,03 gL⁻¹ e 0,12 gL⁻¹ respectivamente. Um dos objetivos é a utilização de esgoto Doméstico tratado secundariamente (EDTS), por tanto foi feita a sua caracterização e um planejamento com um único fator para identificar em que concentração de EDTS *B. braunii* produz maior concentração de biomassa e o resultado foi 50% de EDTS diluído em meio BG₁₁ modificado (utilizando as concentrações de sais otimizadas), que suplementa os nutrientes necessários. Depois foi avaliada a concentração de CO₂ e a intensidade de luz, onde as diferentes intensidades de luz utilizadas apresentaram diferença significativa, a maior intensidade de luz utilizada 70 μmolm⁻²s⁻¹ foi a que apresentou a maior concentração de biomassa 1,77 gL⁻¹. Finalmente os resultados das otimizações foram validados cultivando *B. braunii* em um fotobiorreator de 9L durante 36 dias, com o uma concentração celular máxima de 1,88 gL⁻¹.

Palavras-chave: produção de biomassa. hidrocarbonetos. esgoto Doméstico tratado. secundariamente otimização das condições de cultivo. fotobiorreator

ABSTRACT

Botryococcus braunii has the ability of accumulating lipids were most of them are long chain hydrocarbons, molecules of interest for biofuels area, despite of this benefic, it's a slow-growing microalgae, making necessary the employment of statistic tools to improve the culture conditions for increasing the biomass production. Optimization of the culture media, inoculum concentration, CO₂ concentration and light intensity were done, using two strains of *B. braunii* Utex LB 572 and CCAP 807/2. As the first step, the growing of the algae was evaluated using three synthetic mediums employed for growing of *B. braunii*, CHU₁₃, BG₁₁ and 3N- MBM, and three rates of inoculation (0,05gL⁻¹, 0,1gL⁻¹ and 0,2gL⁻¹), were it's no significant difference between de culture medium, but the rate of inoculation better condition for biomass production was 0,2gL⁻¹. The second step was to optimize the concentration of three salts important for *B braunii* growing, recommended by references and own experiences in the laboratory, the tested salts were: sodium nitrate, ferric citrate and dipotassium phosphate. The optimum concentrations for the salts were 0,3 gL⁻¹ of; 0,03 gL⁻¹ and 0,12 gL⁻¹ of K₂HPO₄ respectively. One goal is to use secondary treated domestic sewage, a characterization of it was done and a single factor statistical desing to identify in which concentration of sewage *B braunii* produces higher biomass concentration and the result was 50% of sewage diluted in medium modified BG₁₁ (with optimized salt concentrations), which supplements the necessary nutrients.After it were evaluated the concentration of CO₂ and light intensity, were the highest light intensity used 70μmolm⁻²s⁻¹ presented the highest biomass concentration 1,77 gL⁻¹. Finally the results of the optimizations were validated cultivating *B. braunii* in a photobioreactor of 9L for 36 days, with a maximum cell concentration of 1,88 gL⁻¹.

Key words: biomass production. hydrocarbons. secondary treated domestic sewage. culture conditions optimization. photobioreactor

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1. A EVOLUÇÃO DOS BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL.....	18
FIGURA 2.2. MICROSCOPIA DE LUZ DE <i>B. Braunii</i> UTEX LB 572.....	23
FIGURA 2.3. TIPOS DE HIDROCARBONETOS PRODUZIDOS PELAS TRÊS RAÇAS QUÍMICAS DE <i>B. braunii</i>	27
FIGURA 2.4 SISTEMA DE TRATAMENTO ANAERÓBIO ESTAÇÃO DE TRATAMENTO ATUBA SUL. CURITIBA. PR.....	40
FIGURA 3.1. CEPAS DE <i>Botryococcus braunii</i> a) Utex LB 572, b) CCAP 807/2.....	41
FIGURA 3.2. CEPAS DE <i>Botryococcus braunii</i> c) CCAP 807/1 e d) SAG 30.8.....	42
FIGURA 3.3. COLETA DE EDTS NA ETE ATUBA SUL, CURITIBA, PARANA.....	43
FIGURA 3.4. MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>B. braunii</i>	44
FIGURA 3.5. EXPERIMENTOS DO CRESCIMENTO DE <i>B. braunii</i> EM SHAKER.....	45
FIGURA 3.6. CRESCIMENTO DE <i>B. braunii</i> EM FOTOBIOREATOR.....	46
FIGURA 3.7. CURVA PADRÃO PARA <i>Botryococcus Braunii</i> (Utex LB 572).....	47
FIGURA 4.1. CRESCIMENTO DAS CEPAS DE <i>B. braunii</i> EM MEIO CHU ₁₃ E EDTS..	61
FIGURA 4.2. PESO SECO DA BIOMASSA CULTIVADA EM EDTS É OS HIDROCARBONETOS EXTRAÍDOS. PORCENTAGEM DA BIOMASSA SECA.....	63
FIGURA 4.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>B. braunii</i> Utex LB 572 e CCAP 807/2 EM MEIO EDTS SUPLEMENTADO.....	64
FIGURA 4.4. PRODUÇÃO DE BIOMASSA COM TRÊS FONTES DE NITROGÊNIO..	67
FIGURA 4.5. PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM TRÊS MEIOS DE CULTIVO COM TRÊS TAXAS DE INOCULAÇÃO DIFERENTES.....	69
FIGURA 4.6. GRÁFICO DE PARETO PARA SELEÇÃO DE MEIO E TAXA DE INOCULAÇÃO (FATORIAL COMPLETO 2 ³).....	70

FIGURA 4.7. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA Á VARIÁVEL BIOMASSA, K_2HPO_4 E $NANO_3$	73
FIGURA 4.8. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA CITRATO FÉRRICO VS K_2HPO_4	73
FIGURA 4.9. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA Á VARIÁVEL HIDROCARBONETOS EXTERNOS, K_2HPO_4 E $NANO_3$	75
FIGURA 4.10. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA Á VARIÁVEL HIDROCARBONETOS EXTERNOS, FÉRRICO E K_2HPO_4	75
FIGURA 4.11. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA Á VARIÁVEL HIDROCARBONETOS EXTERNOS, CITRATO FÉRRICO VS $NANO_3$	76
FIGURA 4.12. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA Á VARIÁVEL HIDROCARBONETOS INTERNOS, K_2HPO_4 E $NANO_3$	77
FIGURA 4.13. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA Á VARIÁVEL HIDROCARBONETOS INTERNOS, CITRATO FÉRRICO VS K_2HPO_4	78
FIGURA 4.14. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA Á VARIÁVEL HIDROCARBONETOS INTERNOS, CITRATO FÉRRICO VS $NANO_3$	79
FIGURA 4.15. PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM PESO SECO PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EDTS.....	81
FIGURA 4.16. PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM PESO SECO PARA O PLANEJAMENTO BOX, HUNTER & HUNTER.....	84
FIGURA 4.17. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE BIOMASSA DE <i>B. braunii</i> 807/2 E CONSUMO DE NO_3 PARA A VALIDAÇÃO EM FOTOBIORREATOR.....	88
FIGURA 4.18. CURVA PADRÃO DE ABSORBÂNCIA E BIOMASSA SECA PARA <i>B. braunii</i> 807/2.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 COMPARAÇÃO DE MATÉRIAS-PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL.....	20
TABELA 2.2 CONTEÚDO DE ÓLEO EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS.....	22
TABELA 2.3. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DAS RAÇÃS DE <i>B. braunii</i>	25
TABELA 2.4. FUNÇÕES DOS NUTRIENTES DE UM MEIO DE CULTURA.....	30
TABELA 3.1. PROCEDÊNCIA DAS CEPAS DE <i>B. braunii</i> UTILIZADAS.....	41
TABLA 3.2. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS AUTOTRÓFICOS PARA <i>B. braunii</i>	43
TABELA 3.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA SELEÇÃO DE CEPA DE <i>B. braunii</i>	51
TABELA 3.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA FONTE DE NITROGÊNIO.....	52
TABELA 3.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA SELEÇÃO DO MEIO E DA TAXA DE INOCULAÇÃO.....	52
TABELA 3.6. PLANEJAMENTO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO.....	52
TABELA 3.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EDTS.....	54
TABELA 3.8. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR A INFLUENCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CO ₂ E A INTENSIDADE DE LUZ.....	55
TABELA 3.9 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA VALIDAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO EM FOTOBIORREATOR.....	55
TABELA 4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EDTS.....	58
TABELA 4.2. COMPARAÇÃO DE NUTRIENTES DOS MEIOS SINTÉTICOS E O EDTS.....	59

TABELA 4.3. SELEÇÃO DE CEPAS EM MEIO CHU ₁₃ E EDTS.....	61
TABELA 4.4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA SELEÇÃO DE CEPAS EM MEIO CHU ₁₃ E EDTS.....	62
TABELA 4.5. VALORES DA EXTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS (g L ⁻¹).....	62
TABELA 4.6. BIOMASSA DE <i>B. braunii</i> Utex LB 572 e CCAP 807/2.....	64
TABELA 4.7. PLANEJAMENTO COM DOIS FATORES CEPA E FONTE DE NITROGÊNIO.....	65
TABELA 4.8. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ESTUDO DA FONTE DE NITROGÊNIO.....	66
TABELA 4.9. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ PARA SELEÇÃO DO MEIO E TAXA DE INOCULAÇÃO.....	68
TABELA 4.10. ANOVA PLANEJAMENTO 2 ³ SELEÇÃO DO MEIO E TAXA DE INOCULAÇÃO R ² =0,97352.....	68
TABELA 4.11. PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL PARA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO.....	71
TABELA 4.12. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL, R ² =0,641, PARA RESPOSTA BIOMASSA.....	72
TABELA 4.13. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL, R ² =0,752, PARA RESPOSTA HIDROCARBONETOS EXTERNOS.....	74
TABELA 4.14. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL, R ² =0,798, PARA RESPOSTA HIDROCARBONETOS INTERNOS.....	77
TABELA 4.15. EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EDTS DILUÍDO EM MEIO BG ₁₁	80
TABELA 4.16. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O PLANEJAMENTO DE UM FATOR (CONCENTRAÇÃO DE EDTS).....	82
TABELA 4.17. PLANEJAMENTO BOX, HUNTER & HUNTER PARA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CO ₂ E DA INTENSIDADE DE LUZ.....	83
TABELA 4.18. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO PLANEJAMENTO BOX, HUNTER & HUNTER, R ² =0,922, PARA RESPOSTA BIOMASSA.....	84

TABELA 4.19. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO PLANEJAMENTO BOX, HUNTER & HUNTER, $R^2=0,869$, PARA RESPOSTA HIDROCARBONETOS EXTERNOS.....	85
TABELA 4.20. ANÁLISE DE DO PLANEJAMENTO FATORIAL BOX, HUNTER & HUNTER, $R^2=0,833$, PARA RESPOSTA HIDROCARBONETOS INTERNOS.....	85
TABELA 4.21. VALORES OBTIDOS DA VALIDAÇÃO DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM FOTOBIOREATOR.....	87
TABELA 4.22. EXTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DA VALIDAÇÃO CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM FOTOBIOREATOR.....	89
TABELA 4.23. RESUMO DAS OTIMIZAÇÕES DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>B braunii</i>	90

LISTA DE SIGLAS

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

SANEPAR - Companhia de Saneamento do Paraná

ETE - Estação de Tratamento de Esgoto

EDTS - Esgoto Doméstico Tratado Secundariamente

HC - Hidrocarbonetos

DQO - Demanda Química de Oxigênio

DCCR - Planejamento Composto Central Rotacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. OBJETIVO GERAL	16
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. BIOCOMBUSTÍVEIS, VANTAGENS E DESVANTAGENS.....	17
2.2. BIOCOMBUSTÍVEIS DE MICROALGAS.....	21
2.3. <i>BOTRYOCOCCUS BRAUNII</i> MORFOLOGIA E TAXONOMIA.....	23
2.4. RAÇAS DE <i>B. braunii</i>	24
2.5. CULTIVO DE <i>B. braunii</i> EM BIORREATORES.....	28
2.5.1. Meios e Condições de cultivo.....	28
2.5.2. Otimização das condições do cultivo.....	33
2.5.3. Fotobiorreatores utilizados para cultivo.....	34
2.6. PROCESSO DE DOWNSTREAM.....	36
2.7. USO DE EFLUENTES PARA CULTIVO DE MICROALGAS.....	38
2.7.1. Esgoto Doméstico Tratado Secundariamente.....	38
2.7.2. Estações de Tratamento de Esgoto.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. MICRORGANISMO.....	41
3.2. MEIOS DE CULTIVO.....	42
3.2.1. Coleta e Preparação do meio de cultivo alternativo EDTS.....	42
3.3. PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	44
3.4. CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	44
3.4.1. Manutenção das cepas.....	44
3.4.2. Experimentos em Shaker.....	45
3.4.3. Experimentos utilizando Fotobiorreator.....	45
3.5. ESTIMATIVA DA BIOMASSA.....	46
3.5.1. Peso Seco.....	46
3.5.2. Método Espectrofotométrico.....	46
3.6. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HIDROCARBONETOS.....	47
3.6.1. Hidrocarbonetos externos.....	47
3.6.2. Hidrocarbonetos internos.....	48

3.7.	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	49
3.7.1.	Anions.....	49
3.7.2.	Cátions.....	49
3.7.3.	Hidrocarbonetos.....	50
3.8.	CINÉTICA DAS CEPAS DE <i>B. braunii</i>	50
3.8.1.	Cinética de crescimento.....	50
3.8.2.	Cinética de consumo de nutrientes.....	50
3.9.	ANALISES ESTATÍSTICAS	51
3.9.1.	Seleção de Cepas.	51
3.9.2.	Estudo da Fonte de Nitrogênio.....	51
3.9.3.	Seleção do meio e da taxa de inoculação.....	52
3.9.4.	Otimização do meio de cultivo.....	53
3.9.5.	Concentração de Esgoto Doméstico Tratado Secundariamente	53
3.9.6.	Influencia da concentração de CO ₂ e da intensidade de luz	54
3.10.	VALIDAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EM FOTOBIOREATOR.....	55
3.11.	ESTUDOS CINÉTICOS	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DO ESGOTO DOMESTICO TRATADO SECUNDARIAMENTE	58
4.2.	SELEÇÃO DAS CEPAS	60
4.3.	CINÉTICA DE CRESCIMENTO INICIAL DE <i>B. braunii</i>	63
4.4.	ESTUDO DA FONTE DE NITROGÊNIO	65
4.5.	SELEÇÃO DO MEIO E DA TAXA DE INOCULAÇÃO	67
4.6.	OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO (DDCR)	70
4.7.	PLANEJAMENTO COM ÚNICO FATOR: CONCENTRAÇÃO DE EDTS	80
4.8.	INFLUENCIA DA CONCENTRAÇÃO CO ₂ E DA INTENSIDADE DE LUZ	82
4.9.	VALIDAÇÃO DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM FOTOBIOREATOR	86
5.	CONCLUSÕES	91
6.	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	92
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE	97

1. INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis são combustíveis produzidos a partir de matéria orgânica renovável como o bioetanol produzido a partir de cana de açúcar, milho e material lignocelulósico; como o biodiesel produzido a partir de diferentes fontes, como óleos vegetais (soja, palma, girassol, algodão, amendoim e outros), gordura animal e pelo reuso de óleo (de fritura).

Estudos recentes indicam que biocombustíveis podem ser obtidos a partir de microalgas, devido à facilidade de seu cultivo, quantidade intracelular de lipídios, viabilidade de manipulação genética das vias metabólicas, duplicação da biomassa em um curto período de tempo e possibilidade de controlar estas condições. Neste sentido, é emergente a aplicação de microalgas como fonte alternativa para a produção de biocombustíveis. As microalgas são organismos aquáticos, que crescem em ambientes de águas doce e salgada. Estas podem usar diferentes metabolismos energéticos para manutenção de suas estruturas, como fotossíntese, respiração e fixação/assimilação de nitrogênio, o que torna algumas espécies organismos únicos, com amplo espectro de aplicação tecnológica (Pereira *et al.*, 2012)

Botryococcus braunii é uma microalga verde, distribuída amplamente em água fresca, lagoas, reservatórios e tanques, situados em zonas continentais, temperadas, alpinas ou tropicais. Esta alga caracteriza-se pela habilidade de sintetizar e acumular uma variedade de lipídeos, incluindo numerosos hidrocarbonetos e éteres lipídicos específicos (Metzger e Largeau, 2005)

É importante esclarecer que tipos de compostos são considerados lipídeos; de acordo com a definição clássica, lipídeos são todos os compostos produzidos por organismos vivos, os quais são insolúveis em água, mas facilmente solúveis em solventes orgânicos e na sua estrutura pode conter cadeias longas de hidrocarbonetos ou unidades de isopreno e vários grupos funcionais, especialmente oxigenados. (Metzger e Largeau, 2005)

Dependendo da cepa e das condições, mais de 75% da biomassa pode ser hidrocarbonetos, a natureza química varia com a cepa produtora (Banerjee *et al.*, 2002). As cepas de *B. braunii* são subclassificadas em três raças. Algas da raça A produzem essencialmente hidrocarbonetos n-alcadieno e trieno de número ímpar de carbonos desde C₂₃ a C₃₃ (Meztger *et al.* 1985), algas da raça B produzem hidrocarbonetos triterpenoides C₃₀ – C₃₇ botryococcenos (Meztger *et al.* 1985), e C₃₁ – C₃₄ esqualenos metilados (Meztger *et al.*, 1985b; Achitouv *et al.*, 2004) e a raça L produz um único hidrocarboneto tetraterpenoide, licopadieno (Meztger *et al.*, 1985b).

Devido à sua capacidade de acumular lipídeos, hidrocarbonetos e formação de biofilmes, resistindo ao longo de muitos anos, esta microalga tem sido proposta como uma fonte renovável de combustível líquido, além disso, a produção de óleos via fixação de CO₂ poderia ajudar na mitigação da emissão de gases efeito estufa (Meztger e Largeau, 2005)

O interesse em *B. braunii* é histórico devido a seu significado na geoquímica, estudos Paleobotânicos sugerem que *B. braunii* é uma das maiores fontes de hidrocarbonetos em uma variedade de depósitos ricos em óleo que datam do período Ordoviciano até o presente. Botryococcane tem sido encontrado em uma variedade de betume costeiras (querogênio) formações na Austrália. *B. braunii* é a principal fonte de alcanos C₂₇, C₂₉, C₃₁ encontrados no sedimento em Pula na Hungria (Banerjee *et al.*, 2002).

Foi reportado que *B. braunii* converte 3% da energia solar incidente em hidrocarbonetos. Sendo um organismo fotossintético a alga pode fixar CO₂ atmosférico. Consequentemente queimar os hidrocarbonetos de alga não é uma contribuição significativa para a concentração de CO₂ atmosférico. Potencialmente os valores das emissões de CO₂ podem ser reduzidos a futuro desenvolvendo uma fixação eficiente pelas microalgas (Meztger e Largeau, 2005).

A pesar de ter tantos aspectos benéficos tanto para as áreas de biocombustíveis e ambiental, esta microalga é de crescimento lento, tornando complicado seu cultivo, portanto é necessário desenvolver métodos e processos que otimizem o cultivo, além

de diminuir os custos de produção; uma opção é o uso de meios alternativos como efluentes domésticos ou industriais que permitam o desenvolvimento da biomassa e o acúmulo de hidrocarbonetos.

1.1. OBJETIVO GERAL

Produção de Biomassa e Hidrocarbonetos a partir da microalga *Botryococcus braunii* utilizando Esgoto Doméstico Tratado Secundariamente como meio de cultivo.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o Esgoto Doméstico Tratado Secundariamente e compara-lo com os meios sintéticos utilizados para crescimento de *B. braunii*.
- Obter as características cinéticas do crescimento e da produção de hidrocarbonetos nos diferentes meios de cultivo.
- Seleção da melhor cepa de *B. braunii* entre quatro cepas de diferentes bancos em quanto a produção de biomassa e hidrocarbonetos.
- Seleção da fonte de nitrogênio para produção de biomassa de *B. braunii*
- Otimização das condições do cultivo de *B. braunii*, concentração de inóculo e meio de cultivo para produção de biomassa e hidrocarbonetos.
- Avaliar a melhor concentração de esgoto tratado para crescimento e produção de hidrocarbonetos.
- Identificar os hidrocarbonetos produzidos pela microalga *B. braunii* utilizando esgoto doméstico tratado secundariamente como meio de cultivo

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica encontra-se uma breve descrição de que são os biocombustíveis, sua produção no Brasil, as vantagens e desvantagens que apresenta esta tecnologia relativamente nova. A produção de biocombustíveis a partir de microalgas também é abordada, e indo do geral ao específico vários aspectos da microalga *Botryococcus braunii* são descritos, já que esta microalga é utilizada para produção de biomassa e de hidrocarbonetos que poderiam ser utilizados como biocombustíveis, mas para isso é necessário conhecer mais sobre o microrganismo de interesse, sua morfologia, as diferentes raças presentes na natureza, suas diferenças e produção de hidrocarbonetos, além disso é importante estudar as condições de cultivo, os meios de cultivo utilizados e a sua possível otimização, os fotobiorreatores para produção, o processo de recuperação, meios de cultivo alternativos como esgotos tratados.

2.1. BIOCOMBUSTÍVEIS, VANTAGENS E DESVANTAGENS.

Os biocombustíveis, são combustíveis líquidos ou gasosos produzidos a partir de biomassa, entendida como matéria orgânica biodegradável e que não se encontra em estado fóssil, esta biomassa gera energia mediante um processo de transformação que pode ser: fermentação alcoólica, ácidos graxos, lipídeos ou decomposição anaeróbica (Anp, 2012).

A produção de biocombustíveis a nível mundial tem crescido exponencialmente nos últimos anos. Seu desenvolvimento é favorecido pelo aumento do preço do petróleo

e as políticas públicas adotadas pelos distintos países. O Brasil pela sua trajetória é um dos países que mais investe na pesquisa e na produção de biocombustíveis (FIGURA 2.1).

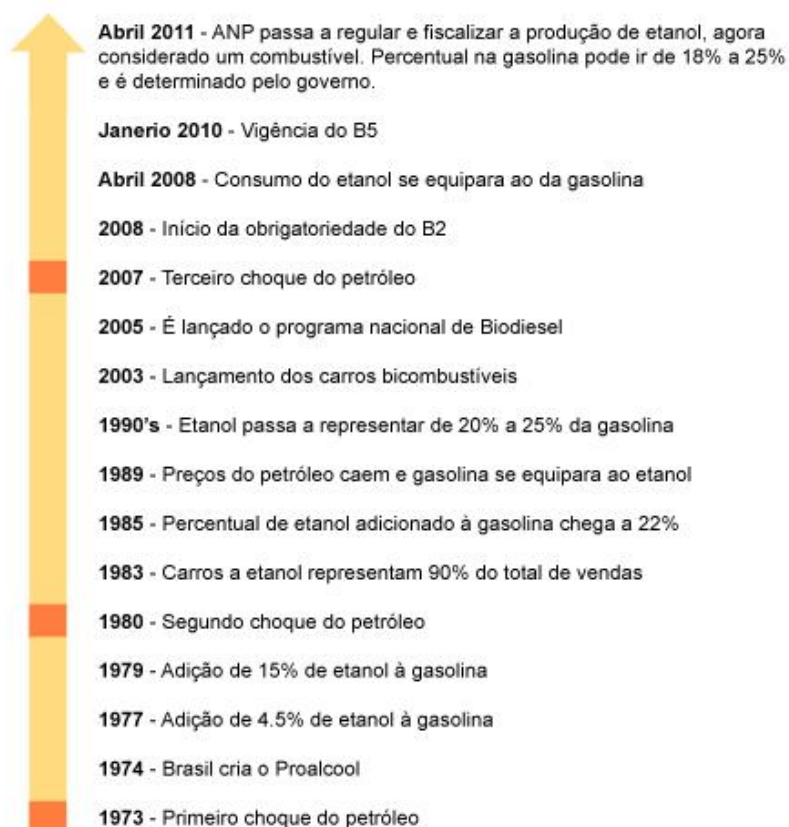


FIGURA 2.1. A EVOLUÇÃO DOS BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL
Fonte: ANP (2012)

A Lei nº 11.097, publicada em 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira e ampliou a competência administrativa da ANP, que passou desde então a denominar-se Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis e assumiu as atribuições de especificar e fiscalizar a qualidade dos biocombustíveis e garantir o abastecimento do mercado, em defesa do interesse dos consumidores. A Agência também executa as diretrizes do Conselho Nacional de Política Energética para os biocombustíveis (Anp, 2012).

Uma das vantagens dos biocombustíveis é que poluem menos por emitirem menos compostos tóxicos do que os combustíveis fósseis no processo de combustão dos motores e também porque seu processo de produção tende a ser mais limpo. A adoção do etanol é considerada um dos principais mecanismos de combate ao aquecimento global, pois reduz as emissões de gás carbônico (CO₂). Parte do CO₂ emitido pelos veículos movidos a etanol é reabsorvido pelas plantações de cana-de-açúcar. Isso faz com que as emissões do CO₂ sejam parcialmente compensadas (Anp, 2012).

Na comparação com o diesel de petróleo, o biodiesel também tem significativas vantagens ambientais. Estudos do National Biodiesel Board (associação que representa a indústria de biodiesel nos Estados Unidos) demonstraram que a queima de biodiesel pode emitir em média 48% menos monóxido de carbono; 47% menos material particulado (que penetra nos pulmões). Como esses percentuais variam de acordo com a quantidade de B100 (somente biodiesel) adicionado ao diesel de petróleo, no B3, B5, B10 (onde a numeração indica a porcentagem por volume de biodiesel na mistura com diesel) essas reduções ocorrem de modo proporcional (Anp, 2012).

Uma das desvantagens é o vínculo entre a seguridade alimentar e a produção em grande escala de biocombustíveis. O Comitê de Seguridade Alimentaria Mundial afirmou em um de seus debates mais recentes que o desenvolvimento de biocombustíveis compreende "oportunidades e riscos nos aspectos econômicos, sociais e ambientais", dependendo do contexto e das práticas. "Em alguns casos, a produção atual de biocombustíveis cria competição entre culturas para este fim e culturas alimentares (Fao, 2013).

A matéria-prima utilizada na síntese de biocombustível contribui em maior porção nos custos da produção de biodiesel. Em geral, a procura por fontes alternativas e economicamente viáveis tem sido o principal foco de pesquisadores da área. Assim, a fonte ideal para a produção de biocombustível depende principalmente da sua disponibilidade e do seu custo (Pereira *et al.*, 2012).

De vários pontos de vista as microalgas podem ser utilizadas como uma alternativa renovável para a produção de energia, ao não ser consideradas como uma fonte alimentícia, outra vantagem da utilização de microalgas para produção de biocombustíveis são seus altos rendimentos de produção ao ser comparadas com outras culturas.

Em estudo realizado por vários autores, constatou-se que as microalgas, quando comparadas com outras culturas, se apresentam como excelente alternativa para a produção de biocombustível, devido ao elevado teor de óleo (TABELA 2.1).

TABELA 2.1 COMPARAÇÃO DE MATÉRIAS-PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL

Fonte de óleo para biocombustíveis	Produtividade óleo (Lha⁻¹)
Mamona*	806*
Pinhão manso	1892
Milho	172
Soja	446
Canola	1190
Coco	2689
Óleo de palma	5950
Microalgas*	58700

* variedades com 30% de óleo (em peso) na biomassa
 Fonte: (Pereira *et al.*, 2012).

O cultivo de microalgas para a produção de bioenergia sugere uma cultura com grande quantidade de energia solar, fornecendo luz e CO₂ para a célula e condições adequadas dentro do meio. A eficiência desse processo, conhecido como fotoconversão, é limitada pela eficiência da fotossíntese e do anabolismo celular. Em especial, a taxa de respiração e o metabolismo algal são diferentes para cada espécie de alga, dependendo também das condições de cultivo e podem assim ser somente estimadas para fins de comparação com outras matérias primas (Pereira *et al.*, 2012).

2.2. BIOCOMBUSTÍVEIS DE MICROALGAS

O mundo está enfrentando uma crise energética e questões ambientais, devido ao esgotamento dos combustíveis fósseis e ao aumento da concentração de CO₂ na atmosfera. Microalgas em crescimento podem contribuir para soluções práticas para os problemas globais, pois eles podem utilizar a energia solar e capturar de CO₂, convertendo-o em biocombustível, utilizando a concentração de CO₂ na atmosfera para a fotossíntese. Microalgas são organismos robustos, capazes de crescimento rápido sob uma variedade de condições, incluindo em tanques abertos ou fechados fotobiorreatores (Razeghifard, 2013)

O potencial fotossintético das microalgas junto com a sua capacidade de fixação de CO₂ é assunto de grande interesse na pesquisa. As microalgas sintetizam lipídios sob condições ambientais propícias. Podem promover vários tipos de combustíveis renováveis: biodiesel derivado de óleo extraído, hidrocarbonetos, etanol e metanol, gás natural como metano produzido pela digestão anaeróbica da biomassa algal e bio-hidrogênio produzido fotobiologicamente

A quantidade de óleo produzido por microalgas varia conforme a sua composição bioquímica e do tipo de cultivo utilizado. (Pereira *et al.*, 2012). O conteúdo lipídico de algumas microalgas está listado na TABELA 2.2.

Os compostos reduzidos da biomassa podem ser usados como matéria-prima para a produção de uma variedade de biocombustíveis. Como outra vantagem, a sua capacidade de se acumular ou secretar biocombustíveis pode ser controlada mudando as condições de crescimento ou de engenharia metabólica. As algas também são boas fontes de biocombustíveis uma vez que algumas espécies podem produzir quantidades de lipídios como parte da sua biomassa. É importante ressaltar o potencial das microalgas para a produção de produtos químicos ou

combustíveis de petróleo relacionados como o bioetanol, hidrocarbonetos triterpênicos, isobutiraldeído, isobutanol, e isopreno a partir de sua biomassa (Razeghifard, 2013)

TABELA 2.2 CONTEÚDO DE ÓLEO EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS

Microalga	Conteúdo de óleo (% peso seco)	Microalga	Conteúdo de óleo (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0 - 75,0	<i>Neochloris oleoabundans</i>	35,0 - 54,0
<i>Chlorella sp.</i>	28,0 - 32,0	<i>Nitzchia sp.</i>	16,0 - 47,0
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 - 58,0	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20,0 - 30,0
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20,0	<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0 - 18,8
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16,0 - 37,0	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0 - 55,0
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,0	<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6 - 21,1
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7 - 71,0	<i>Schizochytrium sp.</i>	50,0 - 77,0
<i>Euglena gracilis</i>	14,0 - 20,0	<i>Spirulina maxima</i>	4,0 - 9,0
<i>Isochrysis sp.</i>	25,0 - 33,0	<i>Spirulina platensis</i>	4,0 - 16,6
<i>Monallanthus salina</i>	> 20,0	<i>Tetraselmis suecica</i>	15,0 - 23,0
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0 - 35,0	<i>Tetraselmis sp.</i>	12,6 - 14,7
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31,0 - 68,0		

Fonte: (Pereira *et al.*, 2012).

Estes biocombustíveis são produzidos utilizando luz solar, CO₂ e água, que muitas vezes pode ser efluentes tratados, que são todos renováveis. 183 toneladas de CO₂ podem ser capturadas quando 100 toneladas de biomassa microalgal é produzida. Organismos oxigênicos como plantas, algas e cianobactérias são capazes de oxidar água como último doador de elétrons, produzindo oxigênio (Razeghifard, 2013).

2.3. *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* MORFOLOGIA E TAXONOMIA

As colônias de *B. braunii* observadas ao microscópio apresentam uma morfologia (FIGURA 2.2) caracterizada por uma organização de células individuais em forma de gota levemente arredondadas mantidas juntas por uma matriz contendo lipídeos. Gotas de óleo podem ser excretadas da matriz devido a pressão da lamínula. Estudos ultraestruturais revelam que a matriz em torno da porção basal das células consiste em paredes exteriores provenientes de divisões celulares sucessivas (Achitouv *et al.*, 2004). A parede de cada célula possui uma camada interna fibrilar feita de polisacarídeo e uma bainha externa trilaminar (Largeau *et al.*, 1980). Depois da divisão celular, cada célula secreta uma nova parede dentro da parede da célula mãe, assim a matriz parece estar composta por paredes sucessivas e saturadas com óleo. Células ao final da fase exponencial contêm numerosos cloroplastos com tilacoides arrumados paralelamente com a superfície da célula e poucos grânulos de amidos presentes. O citoplasma da célula está cheio de glóbulos lipídicos (Metzger *et al.*, 1985a; b).

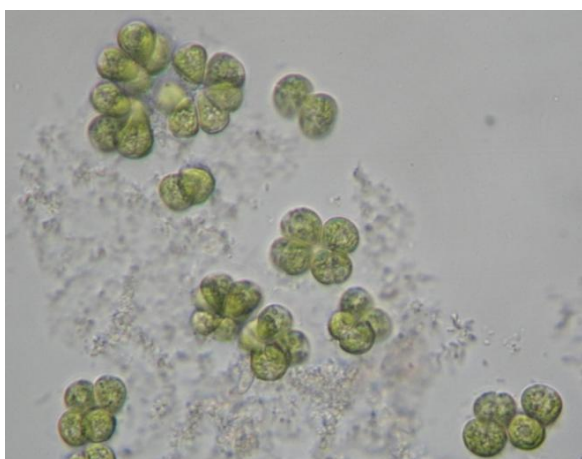


FIGURA 2.2. MICROSCOPIA DE LUZ DE *B. braunii* UTEX LB 572.
Fonte: O autor (2012).

No entanto, existe uma heterogeneidade morfológica importante entre algas analisadas após a amostragem da água de lagos e de cultivo das cepas no laboratório. A variação mais evidente está relacionada com o tamanho e a forma das células, que podem estar mais ou menos embebidas na matriz, e a presença

(ou não) do fio refringentes ligando os aglomerados celulares, conduzindo assim a formação de grandes colônias. Recentemente, sequências de rRNA 18S de quatro cepas de *B. braunii* correspondente as três raças químicas, estabeleceu que essas cepas formam um grupo monofilético (Metzger e Largeau, 2005).

Durante a fase estacionária do cultivo, *B. braunii* sofre uma alteração de cor devido a uma acumulação de carotenoides secundários (carotenoides são produzidos em grandes quantidades, sob condições de stress, tais como a deficiência de nitrogênio e alta intensidade de luz) na matriz. A presença de carotenoides é mais pronunciada nas raças B e L.

2.4. RAÇAS DE *B. braunii*

B. braunii existe em três raças diferentes: A, B, e L. Geralmente as raças podem ser diferenciadas na base dos hidrocarbonetos característicos que elas produzem. As três raças podem diferenciar-se identificando certas características morfológicas e fisiológicas descritas na TABELA 2.3.

Uma das diferenças mais evidentes é a cor da colônia da fase estacionária; as algas das raças B e L ficam vermelho-laranja e laranja-acastanhado quando chegam a fase estacionária mudando da cor verde da fase exponencial, a alga da raça A fica amarelo pálido na fase estacionária mudando do verde. Esta diferença é devida à acumulação de ceto-carotenóides (cantaxantina, echinenone, adonixanthin, etc) nas fases estacionárias das raças B e L. As raças também podem diferenciar-se pelos biopolímeros presentes na parede celular (Banerjee *et al.*, 2002)

TABELA 2.3. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DAS RAÇÃS DE *B. braunii*.

<i>B. braunii</i>			
	Raça A	Raça B	Raça L
Natureza do hidrocarboneto	C ₂₅ -C ₃₃ número ímpar n-alcadienos/trienos	Botryococenos (triterpenos) C _n H _{2n-10} , n=30-37	Licopadienos (tetraterpeno) C ₄₀ H ₇₈
Cor da colônia na fase estacionaria	Amarelo pálido ou verde	Laranja-vermelho ou laranja-marrom devido ao acúmulo de carotenoides	
Alquenil fenóis de cadeia longa	Presentes	Ausentes	Ausentes
Natureza dos biopolímeros	Cadeias alifáticas muito longas reticuladas por meio de pontes de éter e transportando ésteres graxos.		Tetraterpenoides reticulado por meio de pontes de éter

Fonte: Banerjee et al (2002)

Também alguns hidrocarbonetos identificados segundo a raça são apresentados na FIGURA 2.3.

Hidrocarbonetos produzidos por B. braunii raça A

A raça A produz hidrocarbonetos C₂₅ até C₃₁ alcadienos e alcatrienos. Estas olefinas lineares podem constituir até 61% do peso seco biomassa celular das colônias verdes em estado ativado (Banerjee *et al.*, 2002). Cerca de 30 estruturas químicas foram determinadas entre os 50 hidrocarbonetos detectados nas cepas cultivadas e amostras selvagens de *B. braunii* raça A. Todos estes compostos, que vão desde monoenos até tetraenos e quase todos com número de carbono ímpar, exibem uma insaturação terminal. Geralmente, os dienos predominam, e eles

apresentam uma insaturação ao meio da cadeia, predominantemente, em uma configuração *cis*. Os trienos encontrados mais frequentemente exibem duas insaturações conjugadas no meio da cadeia e a terceira ao final da cadeia como pode ser observado na FIGURA 2.3, enquanto a outra configuração que ocorre raramente, apresenta duas duplas ligações conjugadas numa posição terminal com a terceira o meio da cadeia. Só um tipo de tetraeno tem sido identificado com três duplas ligações em uma posição terminal e a quarta no meio da cadeia. No entanto, pode verificar que hidrocarbonetos parafínicos saturados não são biossintetizados por algas vivas (Metzger e Largeau, 2005).

Hidrocarbonetos produzidos por B. braunii raça B

A raça B produz triprenos polimetilados insaturados chamados Botryococenos (C_nH_{2n-10} , $n=30-37$). Os Botryococenos podem existir como isômeros com o mesmo número de carbonos mas com estruturas diferentes. Em populações naturais os botryococenos constituem de 27 a 86% do peso seco da biomassa (Banerjee *et al.*, 2002). Dos 50 botryococenos identificados, apenas cerca de 15 estruturas foram determinadas, devido a dificuldades encontradas na sua purificação. O primeiro descrito foi um composto C_{34} isolado por Cox em 1973, agora cinco isômeros de C_{34} são conhecidos. O botryococeno C_{30} isolado por Metzger e Casadevall em 1983 de uma colônia cultivada é o precursor de todos os compostos homólogos superiores. Microalgas da raça B sintetizam esqualeno e C_{31} - C_{34} esqualenos metilados (Metzger e Largeau, 2005). As células das raças A e B tem um tamanho de $13\mu m \times 7-9\mu m$ (Metzger, Casadevall e Coute, 1988)

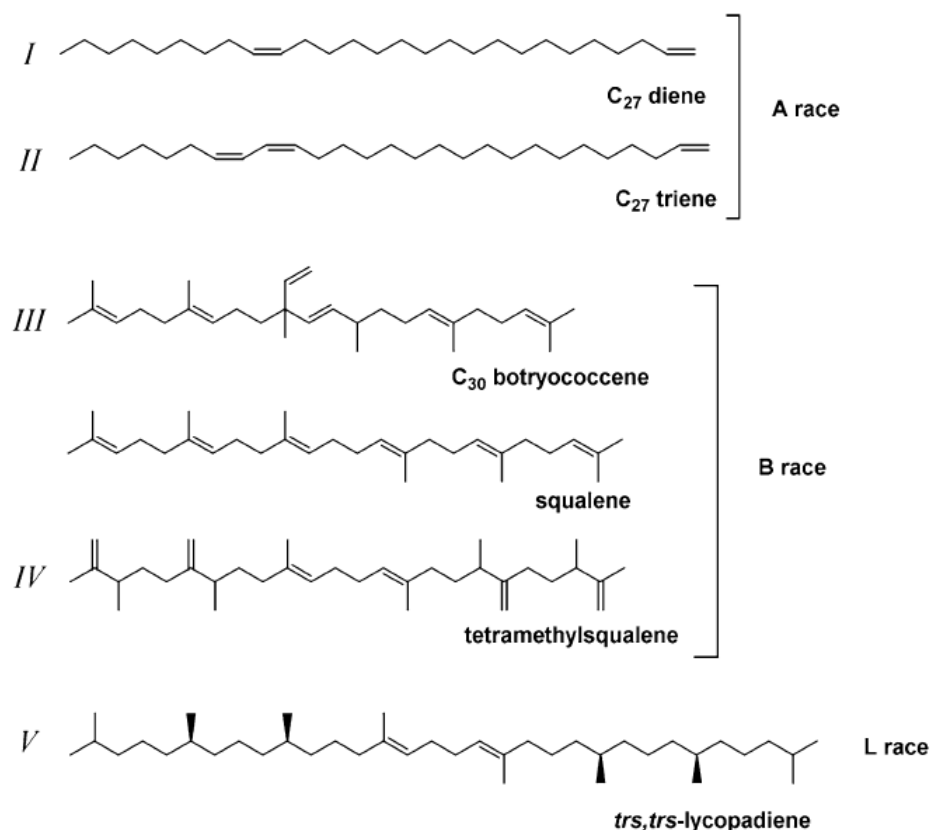


FIGURA 2.3. TIPOS DE HIDROCARBONETOS PRODUZIDOS PELAS TRÊS RAÇAS QUÍMICAS DE *B. braunii*.

Fonte: Metzger (2005).

Hidrocarbonetos produzidos por B. braunii raça L

A raça L produz um único hidrocarboneto $C_{40}H_{78}$, um tetraterpeno conhecido como licopadieno, este hidrocarboneto representa de 2 a 8% da biomassa seca (Metzger e Casadevall, 1987). As células da raça L tem um tamanho de 8 a 9 μm x 5 μm , são relativamente menores comparadas com as outras raças (Metzger, Casadevall e Coute, 1988)

Devido a um conteúdo maior de hidrocarbonetos, as raças A e B podem ser superiores que a raça L para uma extração comercial de hidrocarboneto como combustível (Banerjee *et al.*, 2002)

Os hidrocarbonetos são extraídos dos lipídeos totais como o componente solúvel em hexano, os hidrocarbonetos podem ser convertidos em combustíveis utilizados atualmente como gasolina mediante craqueamento catalítico (Dayananda *et al.*, 2007).

2.5. CULTIVO DE *B. braunii* EM BIORREATORES

2.5.1. Meios e Condições de cultivo

O sucesso de um processo de cultivo depende da correta seleção de quatro pontos básicos: o microrganismo, o meio de cultura, o controle do processo fermentativo e a recuperação do produto. Um meio de cultura a ser usado na indústria deve levar em consideração aspectos biológicos e econômicos, já que se pretende empregar meios de cultura baratos, mas ao mesmo tempo que o microrganismo possa encontrar neste meio as condições adequadas para realizar a bioconversão desejada (Schmidell W., 2001)

O problema para desenvolver o processo do laboratório até a escala piloto e posteriormente para a escala industrial deve ser considerado. Um meio utilizado no laboratório pode não ser o ideal para um fermentador grande (Stanbury, 1995) levando-se em conta que os componentes de um meio de laboratório tem custos altos para ser utilizados em escala industrial. Surgem uma série de alternativas como matérias primas naturais ou resíduos que podem ser utilizados como fonte de nutrientes em processos de cultivo.

O desenvolvimento de meios de cultivo para microalgas envolve: uma fonte de carbono suficiente; nitrogênio (importante para o crescimento); fósforo (responsável

pela formação de ADN, ARN, o ATP, a membrana celular), enxofre (constituente de aminoácidos, vitaminas, sulfolípideos, está envolvido na biossíntese de proteínas); potássio (cofactor para diversas enzimas e está envolvido na síntese de proteínas e regulação osmótica); magnésio (o átomo central da molécula de clorofila), ferro (constituente de cytochromes e importante na assimilação de nitrogênio); pH do meio, temperatura, irradiância, entre outros.

Existem vários trabalhos estabelecendo condições nutricionais ótimas para produção de hidrocarbonetos utilizando *B. braunii*. A produção de hidrocarbonetos na microalga parece estar associada à condições de cultivo específicas e dos nutrientes utilizados. Aparentemente, a taxa de crescimento lento observada nesta microalga não é consequência de uma suplementação limitada de nutrientes, mas sim o resultado da célula produzir moléculas de hidrocarbonetos que são energeticamente custosas (Banerjee *et al.*, 2002).

Na TABELA 2.4 é possível observar as funções resumidas dos diversos nutrientes presentes em um meio de cultura que são necessários para o crescimento e reprodução dos microrganismos (Simon, 1970).

B. braunii é identificado como um recurso inexplorado para a produção de hidrocarbonetos. O sucesso no uso deste organismo como fonte alternativa de energia depende da sua taxa de crescimento, a produtividade de hidrocarboneto e sua eficiência de combustível.

TABELA 2.4 FUNÇÕES DOS NUTRIENTES DE UM MEIO DE CULTURA.

Elementos	Funções físico-químicas
Hidrogênio	Constituinte da água e dos componente celulares. Doador de elétrons
Carbono	Constituinte dos componentes celulares Doador de elétrons (respiração) Aceptor de elétrons (fermentação)
Nitrogênio	Constituinte das proteínas, enzimas e dos ácidos nucleicos Doador de elétrons (bactérias nitrificantes) Aceptor de elétrons (bactérias denitrificantes)
Oxigênio	Constituinte da água Aceptor de elétrons na respiração aeróbica
Enxofre	Constituinte das proteínas e da coenzima A Doador e acceptor de elétrons nas sulfobactérias
Fósforo	Constituinte dos ácidos nucleicos, dos fosfolípidos e de algumas coenzimas Formação de ATP
Magnésio	Cofator de reações enzimáticas (ATP) Ligação das enzimas com os substratos
Ferro	Constituinte dos citocromos Cofator de reações enzimáticas
Potássio	Cofatores ou constituintes de algumas enzimas.
Manganês	
Cálcio	
Cobalto	
Cobre	
Molibdênio	
Zinco	

Fonte: Simon (1970)

Portanto, aumentar sua taxa de crescimento em termos de produção de biomassa é um parâmetro importante. Como outras microalgas o cultivo de *B. braunii* requer água, luz, CO₂ e nutrientes inorgânicos. A produtividade do cultivo é influenciada por fatores como pH, CO₂, irradiância, salinidade e temperatura, todos estes parâmetros podem ser testados para encontrar as melhores condições de cultivo para produção de biomassa e hidrocarbonetos.

Culturas fotossintéticas *B. braunii* requer CO₂. Enriquecimento com CO₂ favorece a formação de botriococenos baixos (C30–C32), por outro lado aquelas culturas aeradas com ar do ambiente acumulam botriococenos altos (C33–C34) (Banerjee *et al.*, 2002)

Uma deficiência de nitrogênio favorece acumulação de lipídeos, mas o nitrogênio beneficia o crescimento, por tanto é bom achar a concentração ótima para permitir o crescimento máximo da células e quando é nitrogênio acabar permitir o acumulo dos hidrocarbonetos. O nitrogênio geralmente o suplementado como sais de nitrato. Estudos realizados com nitrogênio suplementado com NO₃, NO₂ e NH₄ revelaram que o fator principal que regula o metabolismo de nitrogênio em *B. braunii* é o sistema de captação de nitrogênio. Já quando as células são expostas a 5mM de NH₄⁺ durante 24horas, a enzima nitrato reductase fica inativada. O uso de NH₄⁺ como fonte de nitrogênio provoca o declino o pH do cultivo a menos que pH 4 e como consequência as células são danificadas. Esta toxicidade relacionada a NH₄⁺ se manifesta na fase exponencial tardia de crescimento e o dano que provoca é irreversível (Lupi *et al.*, 1994; Banerjee *et al.*, 2002)

A fotossíntese e a produção de hidrocarbonetos são drasticamente diminuídas quando as células de *B. braunii* (raça B) são expostas a NH₃ (Banerjee *et al.*, 2002).

O fósforo é requerido para o crescimento de *B. braunii* e é suplementado geralmente como K₂HPO₄. Crescimento ativo continua após a completa exaustão do fosfato no meio. A pesar da diminuição de fosfato abaixo dos níveis detectáveis (0,5 g.m⁻³) na fase exponencial inicial (Casadevall *et al.*, 1985). Muitas algas tem a capacidade de absorver fosfato rapidamente em quantidades excessivas. Este

excesso de fosfato é armazenado em grânulos intracelulares. As células utilizam esta reserva de fosfato quando o suplemento de fosfato extracelular acaba. Um aumento importante de hidrocarbonetos foi reportado na presença de fosfato em excesso (Banerjee *et al.*, 2002). Este aumento causa mudanças na relação N:P no meio, e é conhecido que a relação N:P tem influência no conteúdo lipídico em várias algas (Casadevall *et al.*, 1985)

Estudos sobre os níveis de irradiância demonstraram que uma alta intensidade de luz incrementa a relação entre carotenoides-clorofila, e isso afeta a coloração das células. Sob uma iluminação intensa (10 Klx ou $140 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) as células das microalgas que tem se adaptado a altas irradiâncias durante os pre-cultivos podem atingir maiores concentrações de biomassa e conteúdo de hidrocarbonetos comparando com aquelas que foram adaptadas para níveis baixos de irradiância (3klx ou $42 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A baixa produção das microalgas adaptadas a escuridão pode ser devido a elas ter sofrido fotoinibição. O tamanho das colônias aumenta com o aumento da intensidade da luz, quando as concentração celular é baixa e tem luz suficiente disponível para fotossínteses. À medida que a concentração celular aumentava, a intensidade média da luz dentro do fotobiorreator diminuiu devido a sombreamento mútuo, levando a diminuição de tamanho da célula (Banerjee *et al.*, 2002).

O pH do meio de cultivo é geralmente ajustado entre 7.4 e 7.6 antes da inoculação. Um incremento de pH é observado durante o crescimento ativo seguido de um leve declino (Casadevall *et al.*, 1985). O aumento no pH é devido parcialmente ao consumo de CO_2 dissolvido para a fotossíntese. Mudanças similares acontecem no pH em cultivos enriquecidos com CO_2 durante a fase exponencial de crescimento (Banerjee *et al.*, 2002). A temperatura ótima de crescimento é de 25°C (Lupi *et al.*, 1994).

A produção de biomassa e composição celular de *B. braunii* raça A são afetados pela salinidade (concentração de NaCl) do meio de cultivo. Um pequeno incremento no conteúdo de lipídeos foi observado, resultado do incremento de salinidade, sempre que a salinidade seja igual a da água do mar (Banerjee *et al.*, 2002).

O efeito de 0,3 e 0,7 M de NaCl foi avaliado na produção de biomassa de conteúdo de nitrogênio total, lipídeos intracelulares e perfil de ácidos graxos da alga *Botryococcus braunii* Kützing IPPAS H-252, raça A, em diferentes fases do ciclo de cultivo. A presença de cloreto de sódio no meio inibiu o crescimento de células de algas os três primeiros dias do ensaio, provocando uma diminuição no nitrogênio total, aumentou a síntese de triacilgliceróis, e mudou consideravelmente o perfil de ácidos graxos. Em fases tardias da cultura, em 0,3M NaCl, o teor de ácidos polienoicos subiu para os valores característicos da fase de crescimento exponencial dessa alga. Em 0,7 M de NaCl, a proporção de ácidos polienoicos cresceu menos significativamente, mas a concentração de biomassa e de nitrogênio total aumentou, de forma semelhante à experiência com 0,3 M de NaCl (Zhila, Kalacheva e Volova, 2011).

2.5.2. Otimização das condições do cultivo

A otimização da composição do meio de cultivo para obter-se máximo rendimento em produto não é uma tarefa fácil. Tradicionalmente, abordagens empíricas têm sido adotadas, nas quais os efeitos de componentes individuais do meio sobre o rendimento em biomassa e produto são investigados em frascos cônicos agitados. As fontes de nutrientes são examinadas primeiro individualmente por exemplo as fontes de nitrogênio, até que todas as combinações dos componentes do meio sejam estudadas, atingindo-se um meio de “composição otimizada” (Pereira, 2008.)

A otimização de meios de cultura feita por métodos clássicos onde uma variável independente (nutrientes, pH, temperatura, concentração de inóculo, irradiância, concentração de CO₂, entre outras) é trocada enquanto todas as outras ficam fixas consome muito tempo e recursos devido ao grande número de amostra e variáveis. A estatística é utilizada como ferramenta para a otimização do processo de cultivo;

são muito utilizados para esta tarefa planejamentos fatoriais e planejamentos compostos onde podem ser avaliadas suas superfícies de resposta.

O planejamento fatorial é uma técnica bastante utilizada quando se tem duas ou mais variáveis independentes (fatores). Ele permite uma combinação de todas as combinações dos fatores experimentais. Planejamentos fatoriais são extremamente úteis para medir os efeitos (ou influências) de uma ou mais variáveis na resposta de um processo. O usual é realizar um planejamento com dois níveis, no máximo três; o uso de mais níveis aumentaria sobremaneira o número de pontos experimentais, fato esse que se quer evitar quando se propõe um planejamento. O planejamento fatorial é a única maneira de prever interação entre os fatores (Calado, 2003)

Usam-se superfícies de resposta quando as variáveis de resposta são influenciadas por muitas variáveis independentes e o objetivo é otimizar essas respostas. O procedimento de uso de superfícies de respostas é sequencial, isto é, quando se está longe do ponto ótimo da resposta, o modelo de primeira ordem ajusta bem os dados atuais. Mas como se quer determinar o ponto ótimo, deve-se procurar uma estratégia eficiente de rapidamente se encontrar as condições operacionais ideais que um modelo de segunda ordem deve ser adotado (Calado, 2003)

2.5.3. Fotobiorreatores utilizados para cultivo

Microalgas são organismos fotossintéticos por isso elas são cultivadas em fotobiorreatores (Singh e Sharma, 2012). Muitos tipos de fotobiorreatores encontram-se disponíveis para cultivo de microalgas (Molina Grima *et al.*, 1999) e a maioria destes tem sido avaliados para o cultivo de *B. braunii*. Esquemas de operação em batelada e contínuo tem sido testados em sistemas abertos e fechados. Devido a economia unicamente o cultivo contínuo é realmente viável para larga escala de produção de biomassa de algas (Banerjee *et al.*, 2002).

Para poder aproveitar toda a potencialidade das algas, fotobiorreatores eficientes são requeridos. Apesar de que um bom numero de fotobiorreatores tem sido propostos, unicamente poucos podem utilizados na pratica para a produção de algas. Um dos fatores limitantes para sua aplicação pratica em cultivo massivo de algas é transferência de massa (Ugwu, Aoyagi e Uchiyama, 2008)

O desenho e desenvolvimento de um fotobiorreator é feito com o objetivo de conseguir a máxima produtividade da alga, mas além disso outro fatores devem ser levados em conta como custo beneficio do reactor, pureza da alga, ser adequado ao usuário, precisar de pouca manutenção, espaço conveniente. Os biorreatores utilizados para o crescimento de algas são: fotobiorreator coluna de bolhas, fotobiorreator de elevação de ar, biorreator de painel plano, fotobiorreator tubular horizontal, fotobiorreator tanque agitado entre outros. Cada um de estes biorreatores tem suas vantagens e desvantagens. O trabalho que se esta realizando atualmente é o desenvolvimento de biorreatores híbridos que possam superar as limitações dos biorreatores existentes (Singh e Sharma, 2012).

Devido a algumas vantagens que oferece o cultivo em sistemas fechados comparado com tanques abertos, um bom numero de fotobiorreatores fechados tem sido propostos, eles atraíram muito atenção devido a que permitem um melhor controle das condições de cultivo que os sistemas abertos. Utilizando fotobiorreatores fechados a produtividade da biomassa foi maior e a contaminação pode ser facilmente prevenida (Ugwu, Aoyagi e Uchiyama, 2008).

Apesar de um numero grande de fotobiorreatores ter sido pesquisados, somente uns poucos deles podem efetivamente usar energia solar para produção de biomassa algal. Para otimizar a produtividade da alga o entendimento de aspectos de hidrodinamica e transferência eficiente de massa são requeridos (Ugwu, Aoyagi e Uchiyama, 2008).

As microalgas são potencialmente sustentáveis para a produção de biocombustíveis. Estas constituem um grupo peculiar de microrganismos fotossintéticos que crescem rapidamente devido à sua estrutura simples, o que

ressalta a viabilidade do seu uso como fonte para produção de bioenergia. Sua produção pode satisfazer a demanda crescente de energia que, por sua vez, não compromete a oferta de alimentos. Nesse sentido, a evolução das pesquisas, incluindo os avanços com relação aos meios de cultivo mais eficientes, como o uso de fotobiorreatores, tem sido de interesse global (Pereira *et al.*, 2012)

Cultivos de algas em tanques abertos tem sido estudados amplamente nos últimos anos. Os tanques abertos podem ser categorizado por: água natural (lagos, lagoas e tanques) e tanques artificiais. Os sistemas mais utilizados incluem grandes lagoas rasas, tanques, lagos circulares e race way (lagoas em formato de pista). Uma das vantagens de utilizar tanques abertos é que eles são mais fáceis de construir e operar que a maioria de sistemas fechados. Algumas das limitações nos tanques abertos inclui evaporação, difusão de CO₂ para a atmosfera e o requerimento de grandes áreas de terra, a vantagem é que pode ser terra que não seja utilizada para fins agrícolas. Cuidados especiais devem ser tomados para evitar contaminação por depredadores ou outros organismos heterotróficos, um inoculo inicial concentrado, além de utilização de organismos que possam crescer em condições extremas, evitando assim a competição por nutrientes (Ugwu, Aoyagi e Uchiyama, 2008).

2.6. PROCESSO DE DOWNSTREAM

A recuperação de produtos das fermentações e dos sistemas de cultivos celulares requerem uma série de operações unitárias que frequentemente controlam a viabilidade econômica de processo de produção. A seleção e desenho do esquema de recuperação varia com a natureza do organismo e as propriedades do produto (Banerjee *et al.*, 2002).

A produção de biomassa a baixo custo pode ter um impacto profundo no custo total da recuperação do produto, especialmente se o produto não precisa de uma purificação extensiva (Banerjee *et al.*, 2002).

Embora a extração lipídica nas microalgas seja relativamente fácil de ser executada, são usados vários processos para aumentar a eficiência e o rendimento, com baixos custos. O óleo pode ser extraído por processos químicos onde solventes como benzeno, éter ou hexano são usados para promover a extração de lipídios. O uso de enzimas é outro método de extração eficaz, que torna o fracionamento do óleo mais fácil. Além destes métodos, o tradicional choque osmótico também é usado para rompimento da alga (Pereira *et al.*, 2012).

Uma vez que a biomassa de *B. braunii* foi recuperada a partir do meio por filtração ou centrifugação, os hidrocarbonetos podem ser recuperados ou pressionando para fora ou por extração com solvente da biomassa. Prensagem dos óleos tem sido tentado em escala de laboratório, mas não há informações disponíveis sobre a extensão da recuperação. Devido a que *B. braunii* tem um parede celular grossa e a biomassa úmida contem 10 vezes mais água que hidrocarboneto, a recuperação por prensagem não é eficiente. Além disso, este método de recuperação não pode ser aplicado a cultivos contínuos com células imobilizadas (Banerjee *et al.*, 2002).

O processo de separação da biomassa de microalgas, secagem, extração e purificação e outras tecnologias de processamento são importantes para a viabilidade da implementação comercial de produtos dos hidrocarbonetos da microalga *B. braunii*. A avaliação dos parâmetros físico-químicos garantem a qualidade do produto obtido, tornando-o uma alternativa viável para a obtenção de energia.

2.7. USO DE EFLUENTES PARA CULTIVO DE MICROALGAS

O cultivo de microalgas mostra uma grande versatilidade o que permite utilizá-las em diferentes processos, como tratamento de efluentes que seriam usados como meio de cultivo e ao mesmo tempo produzir varias moléculas de interesse comercial, como ração, produção de fertilizantes, biocombustíveis, pigmentos, proteínas, entre outras.

Poucos anos atrás a utilização de efluentes para cultivo de microrganismos era opcional, mas agora é considerado necessário para diminuir os custos, especialmente na produção de biomoléculas de interesse comercial como os biocombustíveis onde seus correntes, os combustíveis fósseis são de baixo custo.

Tratamento de efluentes utilizando cultivos de microalgas tem varias vantagens, repousa sobre os princípios de ecossistemas naturais e, portanto, não são ambientalmente perigosos, e não causa poluição secundaria; cumpre o principio em quanto a biomassa seja reutilizada, permitindo a recirculação eficiente dos nutrientes (An *et al.*, 2003).

2.7.1. Esgoto Doméstico Tratado Secundariamente

Esgoto Doméstico Tratado secundariamente é um resíduo de interesse para produção de biocombustíveis utilizando microalgas, que podem ser utilizadas como parte do tratamento secundário ou terciário. Trazendo vantagens como custo beneficio, baixos requerimentos energéticos, redução de formação de lodos, mitigação de gases efeito estufa, diminuição da eutrofização de corpos receptores e produção de biomassa de microalga para vários fins (Banerjee *et al.*, 2002; Sydney *et al.*, 2011)

Além de ser uma vantagem o baixo requerimento energético, é parte de um princípio importante na produção de bioenergia, que é, não utilizar mais energia na produção da biomolécula do que vamos obter dela.

Algumas tentativas de montar um processo contínuo de produção de biomassa tem sido desenvolvidas utilizando esgoto tratado secundariamente como meio de cultivo. Um cultivo contínuo de 2 L em biorreactor operado com uma diluição de $0,57 \text{ d}^{-1}$ atingiu uma produtividade de 196 mg L^{-1} de biomassa por semana, com uma concentração de hidrocarbonetos de 49%; as concentrações de íons nitrato e fosfato presentes no esgoto tratado diminuíram de 5,5 a 4 mg nitrogênio L^{-1} e 0,08 a 0,03 mg de fósforo L^{-1} respectivamente sendo que as microalgas consumiram esses nutrientes, pode-se afirmar que o esgoto tratado pode ser utilizado como meio de cultivo e suprir as necessidades nutricionais de *B. braunii* como cultivo contínuo, além de remover efetivamente esses íons do efluente (Sawayama, Inoue e Yokoyama, 1994).

2.7.2. Estações de Tratamento de Esgoto

A Sanepar utiliza dois sistemas para o tratamento do esgoto em bruto coletado: o aeróbio e o anaeróbio. No processo aeróbio, utiliza-se uma aeração prolongada em fluxo orbital. O sistema "Carroussel", desenvolvido na Holanda, permite a obtenção de um efluente com alta qualidade, Garantindo uma eficiência acima de 95% no resultado do tratamento (Sanepar, 2010).

O processo de tratamento anaeróbio se dá pela estabilização de resíduos feita pela ação de microrganismos, na ausência de ar ou de oxigênio elementar.

Este tipo de processo é realizado no Reator Anaeróbio de Manto de Lodo e Fluxo Ascendente (Ralf). Apresenta uma série de vantagens em relação ao sistema aeróbio. Entre elas, não precisa de outros tipos de energia suplementar, e produz biogás, que pode ser utilizado como combustível, além de não requerer amplo espaço físico (Sanepar, 2010).

ETE Atuba Sul é a maior Estação de Tratamento de Esgoto do Paraná. Beneficia em torno de 580 mil habitantes de 14 bairros de Curitiba e parte dos municípios de Pinhais e São José dos Pinhais (Sanepar, 2010).



FIGURA 2.4 SISTEMA DE TRATAMENTO ANAERÓBIO ESTAÇÃO DE TRATAMENTO ATUBA SUL. CURITIBA. PR.
Fonte: (Sanepar, 2010)

Atualmente as estações de tratamento tratam os seguintes volumes de esgoto bruto:

- Na ETE Atuba Sul a capacidade atual é de 1120 Ls^{-1} , mas a partir de agosto de 2014, 1860 Ls^{-1} de esgoto serão tratados.
- ETE Belém 1000 Ls^{-1} , e se espera tratar 2520 Ls^{-1} para o ano 2016, já que vários projetos de ampliação estão sendo implementados.
- Na ETE Santa Quitéria são tratados atualmente 420 Ls^{-1} , e para o ano 2015 se projeta que serão tratados 560 Ls^{-1} .

Somando os volumes de esgoto por todas as ETE atualmente trata-se 2540 Ls^{-1} o que equivale $219456 \text{ m}^3\text{dia}^{-1}$ (Sanepar, 2013). O lodo é o resíduo sólido gerado durante o tratamento do esgoto. Após passar pelo processo de higienização e secagem, é destinado à agricultura (Sanepar, 2013)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMO

As cepas de *Botryococcus braunii* utilizadas para produção de hidrocarbonetos e sua procedência são apresentadas na TABELA 3.1 e nas FIGURAS 3.1 e 3.2.

TABELA 3.1. PROCEDÊNCIA DAS CEPAS DE *B. braunii* UTILIZADAS.

Cepa	Coleção de Cultura	Pais
UTEX LB 572	UTEX The Culture Collection of Algae. University of Texas	USA
CCAP 807/2 CCAP 807/1	Culture Collection of Algae and Protozoa	UK
SAG 30.81	Sammlung von Algenkulturen, Universitat Gottingen	Alemanha

Fonte: O autor (2012)

Os microrganismos foram mantidos rotineiramente por cultivos sucessivos em meios CHU₁₃ e BG₁₁ líquidos e sólidos. As cepas foram preservadas sendo congeladas a -80°C e nitrogênio líquido.

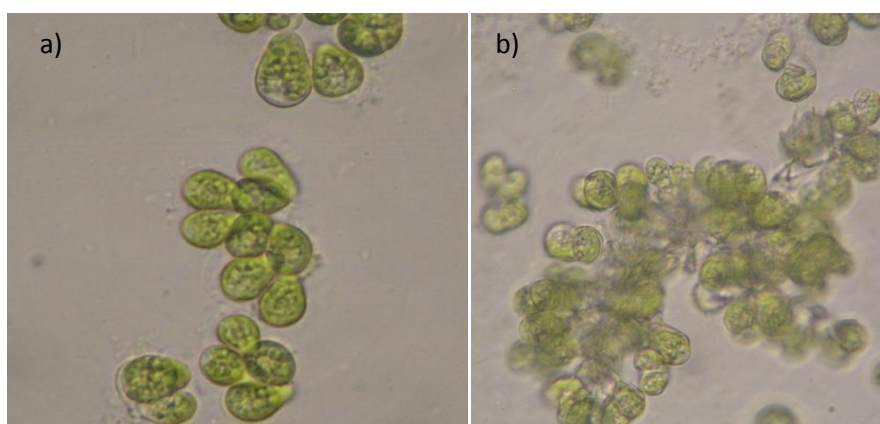


FIGURA 3.1. CEPAS DE *Botryococcus braunii* a) UTEX LB 572, b) CCAP 807/2.

Fonte: O autor (2013).

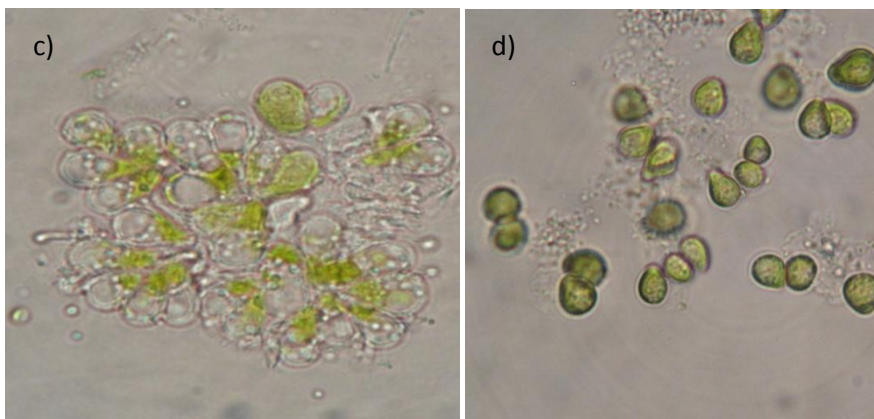


FIGURA 3.2. CEPAS DE *Botryococcus braunii* c) CCAP 807/1 e d) SAG 30.81.

Fonte: O autor (2013).

3.2. MEIOS DE CULTIVO

Na TABELA 3.2 é possível observar diferentes meios autotróficos utilizados para crescimento de *B. braunii* no conteúdo de sais e as suas concentrações. O meio 3N-BBM (Sydney *et al.*, 2010) é recomendado pelas Coleções de Cultivos de Algas. O meio CHU₁₃ (Largeau *et al.*, 1980) e o meio BG₁₁ (Dayananda *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2010) são encontrados na literatura.

Além dos meios sintéticos foi utilizado como meio de cultivo, esgoto doméstico tratado secundariamente (EDTS).

3.2.1. Coleta e Preparação do meio de cultivo alternativo EDTS

O esgoto doméstico tratado secundariamente (EDTS) foi coletado na SANEPAR ETE ATUBA SUL, Curitiba, Paraná (FIGURA 3.3). Transportado para o LBP II em galões plásticos previamente limpos. No laboratório o EDTS foi filtrado uma amostra foi utilizada para as determinações analíticas e o resto armazenado em a -18°C.

TABELA 3.2. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS AUTOTRÓFICOS *B. braunii*.

Sal	3N-BBM (gL ⁻¹)	BG ₁₁ modificado (gL ⁻¹)	CHU ₁₃ modificado (gL ⁻¹)
NaNO₃	0,75	0,5	-
KNO₃	-	-	0,2
K₂HPO₄	0,075	0,04	0,04
MgSO₄.7H₂O	0,075	0,075	0,1
CaCl₂.2H₂O	0,025	0,0036	0,051
Citrato	-	0,006	0,01
Férrico			
Acido	-	0,006	0,1
Cítrico			
KH₂PO₄	0,175	-	-
NaCl	0,025	-	-
EDTA-2Na	-	0,001	-
Na₂CO₃	-	0,02	-
pH	6,2	7,4	7,5

Fonte: Largeu (1980); Dayananda (2007); Sydney (2010); Tran (2010)



FIGURA 3.3. COLETA DE EDTS NA ETE ATUBA SUL, CURITIBA, PARANÁ
Fonte: O autor (2013).

3.3. PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Para a preparação do inóculo utilizaram-se cultivos na fase exponencial de crescimento, com uma concentração inicial de microalga de $0,1 \text{ gL}^{-1}$. Para conseguir esta concentração o inóculo foi centrifugado a $3465 \times g$ durante 15min em tubos estéreis seguido de leitura da absorbância em espectrofotômetro a 680nm (observar ponto 3.5.2.). O procedimento foi repetido até obter a concentração desejada.

3.4. CONDIÇÕES DE CULTIVO

3.4.1. Manutenção das cepas

Para a manutenção das cepas os cultivos foram mantidos em prateleiras (FIGURA 3.4). O repique foi feito uma vez por mês. A temperatura da sala foi de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A intensidade de luz utilizada foi de $40 \pm 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Foto-período de 12:12h. Para os cultivos sólidos foi preparado meio BG_{11} com Agar 2%. Para os cultivos líquidos foram preparados meios BG_{11} , CHU_{13} e Esgoto 50% em frascos Erlenmeyer de 1L e 2L estáticos, e de 6L providos de aeração $0,5\text{L de ar/L de meio/min}$. Todos os meios foram esterilizados em autoclave durante 15min a 121°C .



FIGURA 3.4. MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *B. braunii*.
Fonte: O autor (2013)

3.4.2. Experimentos em Shaker

Os experimentos tanto de seleção de cepas (25% de inóculo ou $0,1\text{gL}^{-1}$ de concentração inicial), conservação ($0,1\text{gL}^{-1}$ de concentração inicial), fonte de nitrogênio ($0,1\text{gL}^{-1}$ de concentração inicial), otimização ($0,05\text{gL}^{-1}$; $0,1\text{gL}^{-1}$; $0,2\text{gL}^{-1}$) e concentrações de esgoto (50%) para crescimento de *B. braunii* utilizando métodos estatísticos foi realizada em Erlenmeyers de 250ml. Os frascos com meio foram esterilizados em autoclave durante 15min a 121°C . Os frascos foram incubados a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ em shaker a 100 rpm (TECNAL, Modelo: TE-1401. Brasil) utilizando luz branca artificial como fonte de luz para o crescimento, com um foto-período de 12:12h com intensidade $30 \pm 1\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (FIGURA 3.5).



FIGURA 3.5. EXPERIMENTOS DO CRESCIMENTO DE *B. braunii* EM SHAKER.
Fonte: O autor (2013)

3.4.3. Experimentos utilizando Fotobiorreator

Os experimentos realizados em Fotobiorreator (Erlenmeyer de 6L) foram, a cinética de crescimento de *B. Braunii* (UTEX LB 572) e *B. Braunii* (CCAP 807/2) em esgoto 50% suplementado, 25% de inóculo ou $0,1\text{gL}^{-1}$ de concentração inicial. A temperatura da sala foi de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A intensidade de luz utilizada foi de $40 \pm 1\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foto-período de 12:12h. Aeração $0,5\text{L}$ de ar/L de meio (FIGURA 3.6)



FIGURA 3.6. CRESCIMENTO DE *B. braunii* EM FOTOBIOREATOR.
Fonte: O autor (2013)

3.5. ESTIMATIVA DA BIOMASSA

3.5.1. Peso Seco

O peso seco foi medido coletando as células por centrifugação (centrifuga: Sorvall Legend Mach 1.6 R) a 3465xg durante 15min, as células foram lavadas com água destilada. O pellet foi seco a 80°C durante 24h e pesado. O peso seco foi determinado gravimetricamente e o crescimento expressado em peso seco (gL^{-1}) (Tran *et al.*, 2010)

3.5.2. Método Espectrofotométrico

As absorbâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro, sendo que a emissão de luz foi medida em comprimento de onda $\lambda = 680 \text{ nm}$ recomendado pela literatura (Sim, An e Kim, 2001; An *et al.*, 2003). O branco utilizado é o meio de cultivo estéril. Uma curva padrão (figura 3.7) de absorbância versus peso seco de biomassa (gL^{-1}) foi feita, utilizando amostras com um volume conhecido da microalga

Botryococcus braunii em fase exponencial, correlacionando os valores da absorbância com aqueles obtidos do peso seco da mesma amostra.

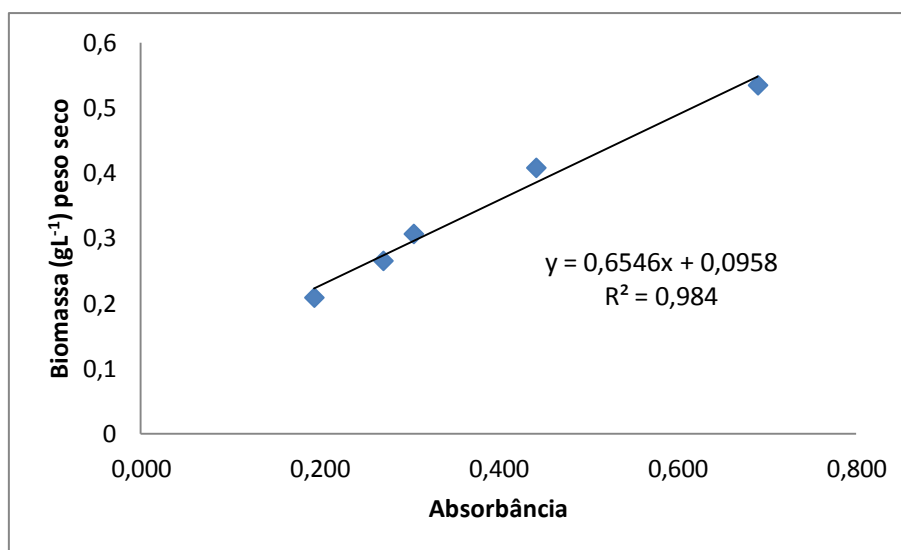


FIGURA 3.7. CURVA PADRÃO PARA *Botryococcus Braunii* (Utex LB 572). Fonte: O autor (2013)

A curva padrão foi utilizada para a determinação da biomassa dos experimentos e para a preparação do inoculo.

3.6. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

3.6.1. Hidrocarbonetos externos

A biomassa seca de *B. braunii* foi extraída com hexano a temperatura ambiente durante 1 hora, para 1 g de biomassa seca extrair com 25ml de hexano, a extração foi feita duas vezes (Achitouv *et al.*, 2004).

Para separar as fases sólida e solvente foi feito a centrifugação a 3465xg durante 15min. Juntou-se os extratos e eles foram concentrados a vácuo a uma temperatura de 40°C.

A quantidade de hidrocarbonetos externos foi obtida gravimetricamente e expressada em porcentagem (%) do peso seco da biomassa.

3.6.2. Hidrocarbonetos internos

A biomassa seca de *B. braunii* que foi extraída com hexano (Achitouv *et al.*, 2004) é a mesma biomassa foi utilizada para a extração dos hidrocarbonetos internos. A extração foi feita de acordo como método Folch. As células foram lisadas adicionando uma mistura de clorofórmio e metanol (2/1, v/v), utilizando um volume de solvente de 20 vezes a quantidade da amostra. (20ml de solvente para 1 g de biomassa).

Após a dispersão a mistura foi agitada durante 20min em shaker a temperatura ambiente. A mistura homogênea foi centrifugada para recuperar a fase líquida, que foi lavada com 0,2 volumes de uma solução de NaCl 0,9% (4ml para 20ml de mistura) e foi agitado no vortex durante 1min, depois o extrato foi centrifugado a baixa velocidade 554,5xg para separar as fases.

A fase superior (aquosa) foi removida, contendo moléculas polares. A fase inferior (clorofórmio), contem os hidrocarbonetos e outros compostos apolares (Gritti, Perdu e Guiochon, 2012). Este ultimo extrato foi concentrado em estufa a vácuo a 40°C.

A quantidade de hidrocarbonetos internos foi obtida gravimetricamente e expressada em porcentagem (%) do peso seco da biomassa.

3.7. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.7.1. Anions

A determinação de anions dos meios de cultivo utilizados foi feita utilizando o 761 Compact IC 817 Bioscan chromatograph. A Coluna utilizada foi METROSEP A Supp 5 250/4.0 (Metrohm), 250 ml x 4.0 mmID. As condições analíticas foram; fase móvel 1,0 mM NaHCO₃ e 3,2 mN Na₂CO₃, 0,7ml/min, temperatura ambiente 25°C, volume de amostra de 20 µl. A curva padrão foi preparada com uma solução de anions (F, Cl, Br, NO₃, PO₄, SO₄).

Esta metodologia foi utilizada para determinar os anions dos meios de cultivo sintéticos e o esgoto parcialmente tratado (Apha, Awwa e Wef, 1995).

3.7.2. Cátions

A determinação de cátions dos meios de cultivo utilizados foi feita utilizando o 761 Compact IC 817 Bioscan chromatograph. A Coluna utilizada foi METROSEP C3 250/4.0 (Metrohm), 250 ml x 4.0 mmID. As condições analíticas foram; fase móvel 3,5 mM HNO₃, 0,9ml/min, 40°C, volume de amostra de 20 µl. A curva padrão foi preparada com uma solução de cátions (Na, NH₄, K, Mg, Ca). Esta metodologia foi utilizada para determinar os cátions dos meios de cultivo sintéticos e o esgoto tratado secundariamente (Apha, Awwa e Wef, 1995).

3.7.3. Hidrocarbonetos

Os extratos obtidos da extração dos hidrocarbonetos internos e externos foram resuspendidos em n-hexano analisados preliminarmente por Cromatografia Gasosa, utilizando esqualeno como padrão.

3.8. CINÉTICA DAS CEPAS DE *B. braunii*

3.8.1. Cinética de crescimento

A cinética de crescimento foi feita utilizando as determinações de biomassa do item 3.5, as amostras foram colidas a cada 48 horas, durante o tempo de duração do experimento; as microalgas das quais foi feita cinética de crescimento foram: UTEX LB 572 e CCAP 807/2, pré-selecionadas com base no crescimento de biomassa em diluições de EDTS e meio CHU₁₃.

3.8.2. Cinética de consumo de nutrientes

A cinética de consumo de nutrientes foi feita por meio da cromatografia de íons, conforme os itens 3.7.1 para ânions e 3.7.2 para cátions. Diluindo a amostra 1:100. As amostras foram coletadas em intervalos de acordo a cada experimento.

3.9. ANALISES ESTATÍSTICAS

3.9.1. Seleção de Cepas.

A seleção de cepas foi realizada para escolher a cepa que produz maior quantidade de biomassa e maior porcentagem de hidrocarbonetos. Os meios utilizados foram CHU₁₃ e EDTS 100%. O planejamento utilizado foi de dois fatores: Cepa (com 4 níveis) e Meio (com 2 níveis). (TABELA 3.3) Todos os experimentos foram feitos em triplicata. O efeito foi avaliado no EXCEL (Microsoft ®Office Excel®2007).

TABELA 3.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA SELEÇÃO DE CEPA DE *B. braunii*.

Fatores	Meio de Cultivo	Cepas
Níveis	CHU ₁₃	Utex LB 572 CCAP 807/1 CCAP 807/2 SAG 30.81
	EDTS+0,5gL ⁻¹ de NaNO ₃	Utex LB 572 CCAP 807/1 CCAP 807/2 SAG 30.81

3.9.2. Estudo da Fonte de Nitrogênio

O estudo da fonte de nitrogênio foi realizado para escolher a melhor fonte de nitrogênio no crescimento da microalga *B. braunii*. As fontes utilizadas foram Nitrato de Sódio, Ureia e Fosfato de Amônio dibásico, na concentração de 0,164 gL⁻¹ de nitrogênio. O meio de cultivo utilizado foi o BG₁₁ substituindo a fonte a nitrogênio. O planejamento utilizado foi de dois fatores, Cepa (com 2 níveis) e Fonte de nitrogênio (com 3 níveis). (TABELA 3.4) Todos os experimentos foram feitos em triplicata. O efeito foi avaliado no EXCEL (Microsoft ®Office Excel®2007).

TABELA 3.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA FONTE DE NITROGÊNIO

Fatores	Cepas	Fonte de Nitrogênio	Quantidade adicionada
Níveis	Utex LB 572	Fosfato de Amônio dibásico	0,78 gL ⁻¹
		Nitrato de Sódio	1 gL ⁻¹
		Ureia	0,35 gL ⁻¹
	SAG 30.81	Fosfato de Amônio dibásico	0,78 gL ⁻¹
		Nitrato de Sódio	1 gL ⁻¹
		Ureia	0,35 gL ⁻¹

3.9.3. Seleção do meio e da taxa de inoculação

Este planejamento fatorial completo 2³ foi realizado para determinar a melhor condição de crescimento de *B. braunii* em relação a meio de cultivo sintético e concentração de inóculo. Os meios utilizados foram: BG₁₁, 3N-BBM e CHU₁₃ e as três taxas de inoculação: 0,05 gL⁻¹, 0,1 gL⁻¹ e 0,2 gL⁻¹. O planejamento com os níveis encontra-se na TABELA 3.5. com 9 experimentos. O efeito das variáveis foi analisada no software estatístico STATISTICA 7 (StatSoft 1984-2004, USA).

TABELA 3.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA SELEÇÃO DO MEIO E DA TAXA DE INOCULAÇÃO

Fatores	Meio de cultivo	Concentração do inóculo
Níveis	BG ₁₁	0,05 gL ⁻¹
		0,1 gL ⁻¹
		0,2 gL ⁻¹
	3N-BBM	0,05 gL ⁻¹
		0,1 gL ⁻¹
		0,2 gL ⁻¹
	CHU ₁₃	0,05 gL ⁻¹
		0,1 gL ⁻¹
		0,2 gL ⁻¹

3.9.4. Otimização do meio de cultivo

O Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi feito como parte da otimização do meio de cultura para crescimento de biomassa e produção de hidrocarbonetos. Três fatores foram avaliados (NaNO_3 , K_2HPO_4 e Citrato férrico) sendo testados 17 experimentos. (TABELA 3.6.) O efeito dos fatores foi avaliado no software estatístico STATISTICA 7 (StatSoft 1984-2004, USA). Os outros nutrientes necessários para o crescimento da microalga foram adicionados segundo a formulação do meio BG₁₁.

TABELA 3.6. PLANEJAMENTO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

Fatores	NaNO_3		K_2HPO_4		Citrato férrico	
	gL^{-1}	Código	gL^{-1}	Código	gL^{-1}	Código
Níveis	0,100	-1,68	0,04	-1,68	0,006	-1,68
	0,200	-1	0,072	-1	0,011	-1
	0,300	0	0,120	0	0,018	0
	0,400	1	0,168	1	0,025	1
	0,500	1,68	0,200	1,68	0,030	1,68

3.9.5. Concentração de Esgoto Doméstico Tratado Secundariamente

Este experimento foi feito em erlens de 250mL volume de trabalho de 50mL, inoculo de $0,2 \text{ gL}^{-1}$ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e foto período de 12h:12h, em shaker com agitação de 100rpm. Planejamento com único fator. O estudo foi realizado em 15 dias. Os efeitos de

cinco concentrações de EDTS foram avaliadas, utilizando um planejamento de um único fator com 5 níveis (0%, 25%, 50% 75% e 100%) de esgoto tratado diluído em meio BG₁₁ modificado (concentrações otimizadas dos sais), num total de 5 condições com três repetições (TABELA 3.7). O efeito foi avaliado no EXCEL (Microsoft ©Office Excel®2007).

TABELA 3.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EDTS

Fator	Concentração de EDTS
Níveis	0%
	25%
	50%
	75%
	100%

3.9.6. Influencia da concentração de CO₂ e da intensidade de luz

Os cultivos para este experimentos foram feitos em erlen meyer de 6 litros com volume de trabalho de 3 litros, o meio de cultivo utilizado foi 50% de EDTS e 50% de BG₁₁ modificado (concentrações otimizadas dos sais), inóculo de 0,2 gL⁻¹; aeração de 0,5 vvm, temperatura de 25°C±1°C; e foto período de 16h:8h.

Planejamento Box, Hunter & Hunter, com dois fatores, 4 corridas mais 3 pontos centrais, 7 experimentos no total, para irradiância 12,6 μmol m⁻² s⁻¹, 49 μmol m⁻² s⁻¹ e 70 μmol m⁻² s⁻¹, para o CO₂: 100mLL⁻¹min⁻¹, 50mLL⁻¹min⁻¹, e 0, (TABELA 3.8). Em nosso bioreactor a injeção de CO₂ foi feita separadamente do ar, a porcentagem de CO₂ injetada foi 3% do volume total de meio de cultivo, esta injeção foi realizada cada 2 horas durante as horas de luz do fotoperíodo. A duração do experimento foi de 25 dias

TABELA 3.8. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR A INFLUENCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ E A INTENSIDADE DE LUZ

Fatores	CO₂ (mL L⁻¹ min⁻¹)		Intensidade de Luz (μmol m⁻² s⁻¹)	
	0	-1	12,6	-1
Níveis	50	0	49	0
	100	1	70	1

3.10. VALIDAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EM FOTOBIOREATOR

Este experimento consistiu em avaliar se as condições testadas nos experimentos em shaker e erlen meyer podem ser reproduzidos em um volume maior.

A validação da otimização das condições de cultivo foi realizada em Biorreator New Brunswick com as condições descritas na TABELA 3.9

TABELA 3.9 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA VALIDAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO EM FOTOBIOREATOR.

Parâmetros	Condições de cultivo
Volume	9 Litros
Microrganismo	<i>Botryococcus braunii</i>
Cepa	CCAP 807/2
Meio de cultivo	50% EDTS, 50% BG ₁₁ modificado
Taxa de inóculo	0,2 gL ⁻¹
Irradiância	Aproximadamente 70μmol m ⁻² s ⁻¹
Foto período	16h:8h
Temperatura	25°C
Agitação	100rpm
Aeração	0,5 vvm
CO₂	33,33 mL ⁻¹ min ⁻¹
pH inicial	7,4 pH

Fonte: O autor (2013)

Foram coletadas amostras a cada 48h para determinação de biomassa (peso seco e absorvância), análises de consumo de NO_3 , análises de produção de hidrocarbonetos.

A biomassa foi determinada pelo peso, tomando 10mL de amostra em triplicata, e filtrando em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ secando em estufa a 80°C durante 24h, também foi analisado tomando 10mL de amostra em triplicata, centrifugando a 4000rpm secando em estufa a 80°C durante 24h (Tran *et al.*, 2010). As amostras foram medidas em espectrofotômetro em comprimento de onda $\lambda = 680 \text{ nm}$ (Sim, An e Kim, 2001; An *et al.*, 2003). O branco utilizado é o meio de cultivo estéril.

O análise de NO_3 encontra-se descrito no item 3.7.1, análise de anions, utilizando cromatografia de íons (Apha, Awwa e Wef, 1995).

Foram determinados unicamente hidrocarbonetos internos devido a pequena quantidade de amostra utilizando a metodologia do item 3.7.3 (Achitouv *et al.*, 2004). O tempo de duração do experimento foi de 36 dias.

3.11. ESTUDOS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos de crescimento foram medidos com base na curva de crescimento; a fase exponencial foi identificada como o intervalo linear traçando o logaritmo da concentração de biomassa em função do tempo.

Na fase exponencial foi calculada a velocidade específica de crescimento (μ_{max}) obtido pela equação 1,

$$\mu_{max} = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

Equação 1

a produtividade celular máxima foi determinada pela equação 2,

$$\gamma_{max} = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1}$$

Equação 2

e tempo de duplicação de biomassa pela equação 3,

$$\mu = \frac{\ln 2}{t} \rightarrow \rightarrow td \frac{\ln 2}{\mu}$$

Equação 3

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESGOTO DOMESTICO TRATADO SECUNDARIAMENTE

A caracterização do Esgoto Doméstico Tratado Secundariamente coletado na ETE Atuba Sul da SANEPAR no Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia, utilizando Cromatografia Iônica (Apha, Awwa e Wef, 1995), os análises de DQO e DBO5 foram cedidos pela SANEPAR e no LPH (Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas) da UFPR. A compilação dos resultados encontram-se na TABELA 4.1, os parâmetros encontram-se em ppm (mgL^{-1}) de esgoto doméstico tratado.

A importância de caracterizar o EDTS é devido a seu potencial para ser empregado como meio de cultivo para *B. Braunii* para a produção de biomassa e hidrocarbonetos. Utilizando o EDTS em Ralf como meio de cultura a intenção é diminuir os custos na produção de hidrocarbonetos como biomolécula de interesse, além de remover nutrientes da água pelo consumo das algas.

TABELA 4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EDTS.

Parâmetro	(ppm)
Cor *	50
Dióxido de Carbono*	887
Nitrogênio amoniacal*	33
DQO **	59-17 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$
DBO 5**	12- 2 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$
Cloreto	49,08
Fosfato	1,03
Sulfato	22,97
Nitrato	28,28
Cálcio	33,58
Magnésio	8,81
Sódio	23,19
Potássio	10,88
Amônio*	19,54

*Análises realizados no LPH (Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas)

**Análises cedidas pela SANEPAR

Fonte: O autor (2013)

Na TABELA 4.2 apresenta-se uma comparação dos meios de cultivo sintéticos recomendados na literatura com esgoto tratado. Os nutrientes foram comparados entre si em ppm, e as concentrações de cloreto e cálcio são maiores no esgoto doméstico tratado secundariamente que nos meios sintéticos, as concentrações de sulfato e magnésio são similares entre os meios sintéticos e o esgoto tratado, as concentrações de fosfato e nitrato encontram-se em níveis inferiores no EDTS, portanto seria importante suplementar esses dois nutrientes se o EDTS for utilizado como meio de cultivo para *B. braunii*.

Uma concentração inicial de nitrato menor ou igual a 200 ppm favorece a produção de hidrocarbonetos. Quantidades maiores a 1000 ppm de nitrato interferem na produção de hidrocarboneto (Banerjee *et al.*, 2002) já que se ainda tem nitrato no meio as células continuaram a se dividir e portanto não entraram na fase estacionária onde se produz o acúmulo dos hidrocarbonetos.

O aporte de nitrogênio do EDTS é de 41,16 ppm, já os meios sintéticos aportam; BG₁₁ 82,2 ppm de nitrogênio, CHU₁₃ 27,5 ppm de nitrogênio, e 3N-BBM 123,5 ppm de nitrogênio.

TABELA 4.2. COMPARAÇÃO DE NUTRIENTES DOS MEIOS SINTÉTICOS E O EDTS.

Parâmetro	EDTS (ppm)	BG₁₁ modificado (ppm)	CHU₁₃ modificado (ppm)	3N-BBM (ppm)
Cloreto	49,08	0,99	14,03	6,88
Fosfato	1,03	16,67	16,67	154,40
Sulfato	22,97	29,23	38,98	29,23
Nitrato	28,28	364,71	122,77	547,06
Cálcio	33,58	1,12	15,83	7,76
Magnésio	8,81	7,40	9,87	7,40
Sódio	23,19	141,01		212,78
Potássio	10,88	6,84	84,07	63,38
Amônio	19,54			
pH	6,7	7,4	7,5	6,2

Fonte: O autor (2013).

Outro ponto importante é a concentração de Amônio, quando as células são expostas a uma concentração de 5mM de NH_4^+ durante 24h, a enzima nitrato reductase é inativada. A presença de NH_4^+ produz uma queda de pH abaixo de 4, e isso é prejudicial para as células.

Esta toxicidade causada por NH_4^+ se manifesta durante a fase exponencial tardia e o dano provocado é irreversível (Lupi *et al.*, 1994; Banerjee *et al.*, 2002). Por esta razão a concentração de Amônio nos meios de cultivo é zero, mas no EDTS tem, só que a concentração equivale a 1mM de NH_4^+ que não afetaria significativamente o desenvolvimento da microalga utilizando esgoto tratado como meio de cultivo.

O fósforo é necessário para o crescimento de *B. braunii* e é suplementado usualmente como sais de K_2HPO_4 . O crescimento ativo persiste até o consumo completo do fosfato no meio (Casadevall *et al.*, 1985). A concentração contida no EDTS é muito baixa para permitir o crescimento da microalga sem suplementação de sais de fosfato como foi mencionado anteriormente.

4.2. SELEÇÃO DAS CEPAS

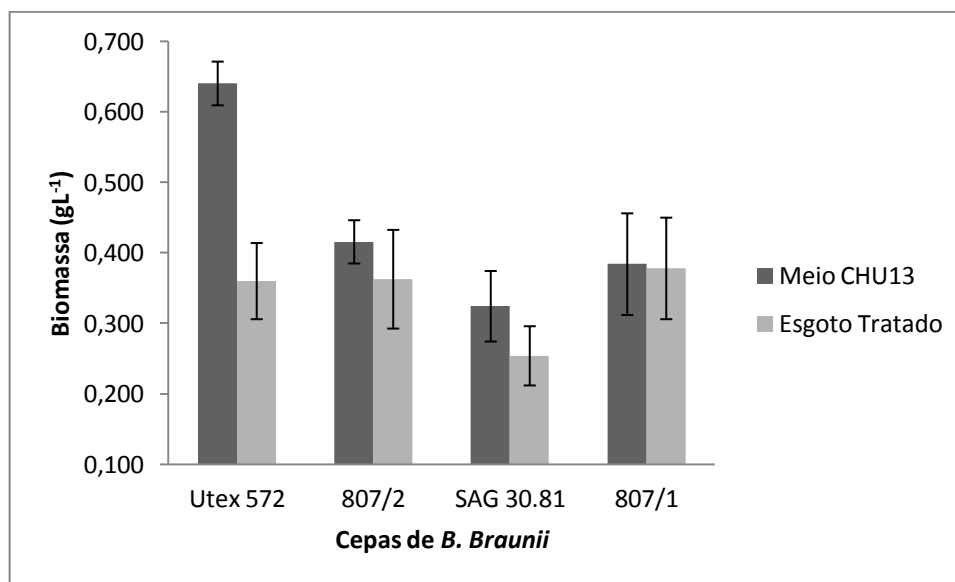
Este experimento foi feito com o objetivo de escolher as cepas que tenha melhor crescimento tanto no meio sintético quanto no esgoto tratado, na TABELA 4.3 observa-se a quantidade de biomassa produzida por cada uma das cepas de *B. braunii* nos dois meios de cultivo (meio sintético CHU_{13} e esgoto domestico tratado secundariamente), após 15 dias de cultivo.

A melhor concentração celular foi da cepa UTEX LB 572 em meio CHU_{13} de 0,640 gL^{-1} de biomassa seca, seguida pela cepa CCAP 807/2 em meio CHU_{13} 0,416 gL^{-1} .

TABELA 4.3. SELEÇÃO DE CEPAS EM MEIO CHU₁₃ E EDTS.

N exp.	Meio de Cultivo	Cepa	Biomassa peso seco (gL ⁻¹)
1	Meio CHU ₁₃	Utex LB 572	0,640
2	Meio CHU ₁₃	CCAP 807/2	0,416
3	Meio CHU ₁₃	SAG 30.81	0,324
4	Meio CHU ₁₃	CCAP 807/1	0,384
5	EDTS +0,5 gL ⁻¹ NaNO ₃	Utex LB 572	0,360
6	EDTS +0,5 gL ⁻¹ NaNO ₃	CCAP 807/2	0,363
7	EDTS +0,5 gL ⁻¹ NaNO ₃	SAG 30.81	0,254
8	EDTS +0,5 gL ⁻¹ NaNO ₃	CCAP 807/1	0,378

Na FIGURA 4.1 apresenta-se o crescimento das 4 cepas de *B. braunii* no meio CHU₁₃ e no EDTS, podemos observar uma diferença entre os dois meios, principalmente no crescimento da cepa Utex 572, que apresentou uma maior quantidade de biomassa no meio CHU₁₃.

FIGURA 4.1. CRESCIMENTO DAS CEPAS DE *B. braunii* EM MEIO CHU₁₃ E EDTS

Existe uma relação entre o meio de cultivo e a produção de biomassa pelas cepas *B. braunii* e há diferença significativa para a produção de biomassa entre as cepas, já que $F_{cal} > F_{crítico}$ e os valores-P $< 0,05$ (TABELA 4.4). O EDTS utilizado para este experimento foi 100% sem diluição, suplementado unicamente com nitrato de sódio $0,5 \text{ gL}^{-1}$, Provavelmente diluindo e suplementado como outros sais além do nitrato seja possível conseguir uma maior quantidade de biomassa utilizando esgoto doméstico tratado secundariamente.

TABELA 4.4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA SELEÇÃO DE CEPAS EM MEIO CHU_{13} E EDTS.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Amostra	0,0629	1	0,0629	9,209	0,0078	4,493
Cepas	0,1343	3	0,0447	6,551	0,0042	3,238
Meios de cultivo	0,0666	3	0,0222	3,250	0,0495	3,238
Erro	0,1093	16	0,0068			
Total	0,3732	23				

Além dos análises estatísticos foi feita a extração dos hidrocarbonetos da biomassa cultivada em EDTS, os resultados encontram-se na TABELA 4.5 e na FIGURA 4.2

TABELA 4.5. VALORES DA EXTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS (gL^{-1}).

	Utex 572	807/2	SAG 30.81	807/1
Biomassa peso seco (gL^{-1})	0,360	0,363	0,254	0,378
Hidrocarbonetos (gL^{-1})	0,106	0,038	0,050	0,048

Neste experimento a maior quantidade de hidrocarbonetos foi extraída da cepa Utex LB 572 com 29,54% do peso seco da biomassa (FIGURA 4.2).

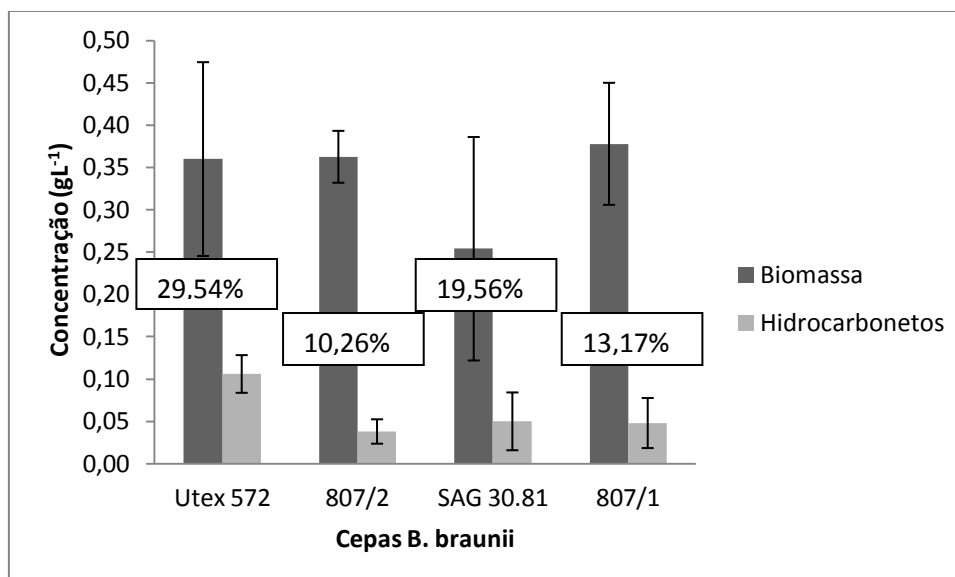


FIGURA 4.2. PESO SECO DA BIOMASSA CULTIVADA EM EDTS É OS HIDROCARBONETOS EXTRAÍDOS PORCENTAGEM DA BIOMASSA SECA.

4.3. CINÉTICA DE CRESCIMENTO INICIAL DE *B. braunii*

Cinética de crescimento das cepas Utex LB 572 e CCAP 807/2 em esgoto suplementado.

Na TABELA 4.6 estão os valores obtidos durante a cinética de crescimento das cepas de *B. braunii* Utex LB 572 e CCAP 807/2 em EDTS suplementado com 0,5 g L^{-1} de Nitrato de Sódio.

Os estudos cinéticos do crescimento antes da otimização do processo para a cepa Utex LB 572 foram, a concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$) foi 0,30 g L^{-1} , a velocidade específica do crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) 0,073 dia $^{-1}$ determinado durante a fase exponencial (0 a 15 dias), a produtividade máxima ($\gamma_{m\acute{a}x}$) 0,013 g L^{-1} d $^{-1}$, e o tempo de duplicação de biomassa (Td) 9,49 dias.

TABELA 4.6. BIOMASSA DE *B. braunii* Utex LB 572 e CCAP 807/2.

Dia	Utex 572 (gL ⁻¹)	Ln X	807/2 (gL ⁻¹)	Ln X
0	0,10	-2,302	0,10	-2,302
3	0,14	-1,966	0,19	-1,660
6	0,20	-,1609	0,26	-,1347
9	0,22	-1,51	0,26	-1,347
12	0,27	-1,309	0,40	-0,916
15	0,30	-1,203	0,48	-0,733

Os estudos cinéticos do crescimento antes da otimização do processo para a cepa CCAP 807/2 foram, a concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$) foi 0,48 gL⁻¹, a velocidade específica do crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) 0,104 dia⁻¹ determinado durante a fase exponencial (0 a 15 dias), a produtividade máxima ($\gamma_{m\acute{a}x}$) 0,025 gL⁻¹ d⁻¹, e o tempo de duplicação de biomassa (Td) 6,62 dias.

Na FIGURA 4.3 apresenta-se a curva de crescimento da microalga *B. braunii* Utex LB 572 e *B. braunii* CCAP 807/2

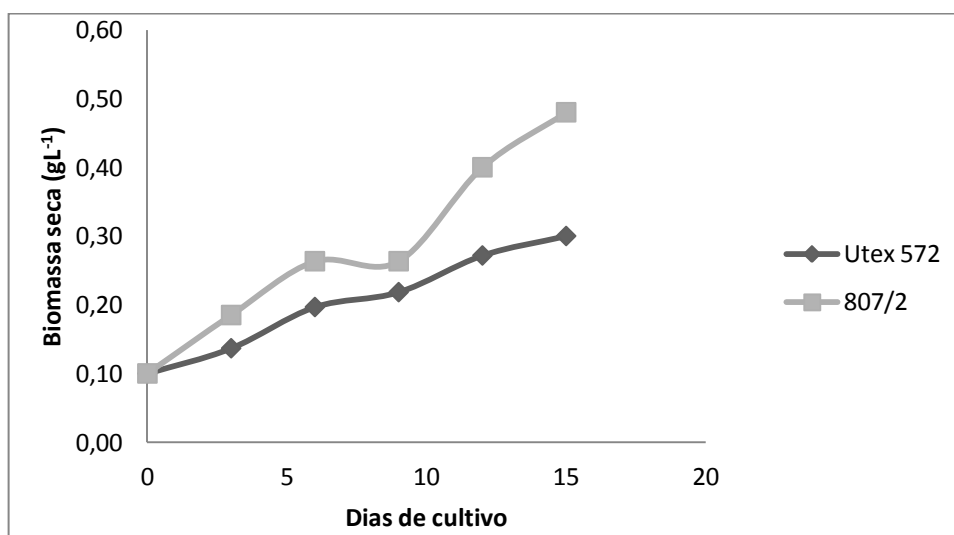


FIGURA 4.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *B. braunii* Utex LB 572 e CCAP 807/2 EM MEIO EDTS SUPLEMENTADO

Os valores obtidos de concentração celular máxima são baixos comparando com resultados obtidos na literatura um dos motivos pode ser, que a cepa não esteve adaptada ao meio de cultivo utilizado, EDTS suplementado com $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de nitrato de sódio.

4.4. ESTUDO DA FONTE DE NITROGÊNIO

Apesar de que uma deficiência de nitrogênio favoreça o acúmulo de lipídeos, o nitrogênio é necessário para o crescimento celular (Banerjee *et al.*, 2002). O objetivo deste estudo é avaliar a melhor fonte de nitrogênio na produção de biomassa; o preço de 1 tonelada de Nitrato de Sódio grau industrial no mercado está entre R\$ 700 a R\$ 2000, o preço da tonelada de Ureia encontra-se da faixa de R\$850 a R\$2040, e o preço da tonelada de fosfato de amônio dibásico esta entre R\$1000 e R\$2500 segundo sites de venda de produtos agrícolas, como fertilizantes nitrogenados. Os preços não variam muito entre as fontes, então a escolha é principalmente focada na produção de biomassa.

Na TABELA 4.7 observamos que existe uma maior concentração de biomassa quando se usa como fonte de nitrogênio o NO_3 comparando com as outras duas fontes de nitrogênio.

TABELA 4.7. PLANEJAMENTO COM DOIS FATORES CEPA E FONTE DE NITROGÊNIO.

Cepa	Resposta Biomassa (gL^{-1})		
	Ureia	NO_3	NH_4
SAG 30.81	0,15	0,34	0,21
	0,19	0,28	0,25
Utex 572	0,06	0,41	0,23
	0,12	0,35	0,20

Com o Análise de Variância apresentado na TABELA 4.8 confirmamos que existe uma relação entre a fonte de nitrogênio e a produção de biomassa pelas cepas *B. braunii* e há diferença significativa para a produção de biomassa entre fonte de nitrogênio, já que $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítico}}$ e o valor-P $<0,05$. Mas entre as cepas não há diferença significativa já que o valor-P é maior que 0,05 e o $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítico}}$.

TABELA 4.8. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ESTUDO DA FONTE DE NITROGÊNIO.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Amostra	0,0002	1	0,0002	0,167	0,6963	5,987
Fonte de Nitrogênio	0,0930	2	0,0465	37,469	0,0004	5,143
Cepas	0,0113	2	0,0056	4,557	0,0625	5,143
Erro	0,0074	6	0,0012			
Total	0,1120	11				

Na FIGURA 4.4 observa-se a produção de biomassa, das duas cepas em cada fonte de nitrogênio e a usualmente o Nitrato de Sódio foi a melhor para as duas cepas e a ureia foi a mais baixa. Como já foi mencionado anteriormente quando as células de *B. braunii* são expostas a uma concentração de 5mM de NH_4^+ durante 24h, a enzima nitrato reductase é inativada e isso é prejudicial para as células. Esta toxicidade causada por NH_4^+ se manifesta durante a fase exponencial tardia e o dano provocado é irreversível (Lupi *et al.*, 1994). Isso explica a baixa produção de biomassa utilizando fosfato de amônio e ureia, já que as concentrações de NH_4^+ no meio são 15,14 mM e 16,11 mM respectivamente o que poderia ter ocasionado uma toxicidade para as células, que atingiram uma baixa concentração. A fotossíntese e a produção de hidrocarbonetos diminuí drasticamente quando as células de *B. braunii* são expostas a amônio (Banerjee *et al.*, 2002).

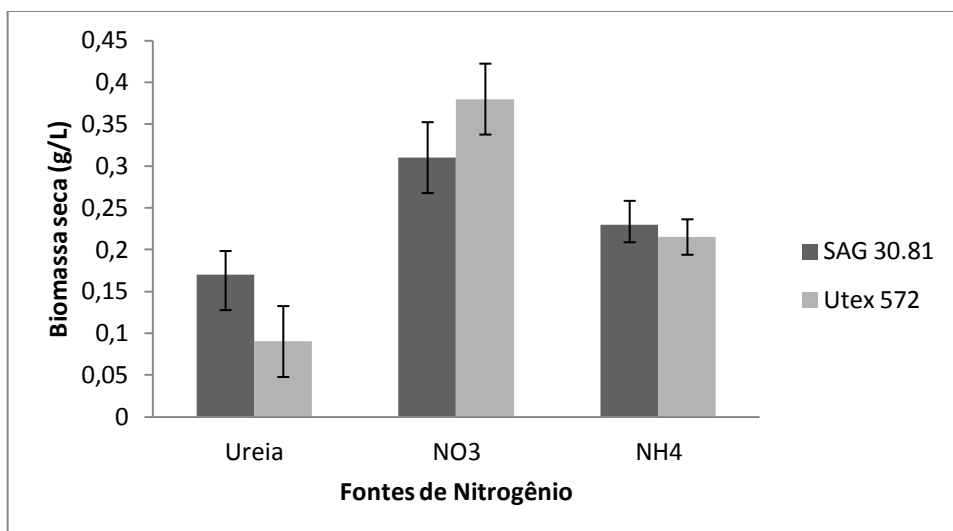


FIGURA 4.4. PRODUÇÃO DE BIOMASSA COM TRÊS FONTES DE NITROGÊNIO.

Utilizando fosfato de amônio dibásico obteve-se uma maior quantidade de biomassa comparando com a ureia, uma possível explicação é que o fosfato esteja fornecendo um nutriente extra que ajuda no crescimento. Quando em solução aquosa o fosfato de amônio dibásico pode se dissociar completa ou parcialmente, dependendo do pH. A dissociação completa libera um íon hidrogênio (H^+), que acidifica levemente a água, dois íons amônia (NH_4^+) e um íon fosfato (PO_4^{3-}), que estão na forma iônica, ideais para pronta absorção.

4.5. SELEÇÃO DO MEIO E DA TAXA DE INOCULAÇÃO

Este experimento foi o primeiro passo na otimização das condições de cultivo de *B. braunii*, que é conhecida por sua capacidade de acumulo de hidrocarbonetos de cadeia longa, mas uma desvantagem citada na literatura e descoberta na pratica é seu crescimento lento e baixa produção de biomassa. Na TABELA 4.9 esta descrito o planejamento fatorial completo, com as respostas de quantidade de biomassa em peso seco. As melhores respostas foram aquelas com a taxa de inóculo de $0,2gL^{-1}$.

TABELA 4.9. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2³ PARA SELAÇÃO DO MEIO E TAXA DE INOCULAÇÃO

N° exp	Concentração do Inóculo		Meio Sintético		Biomassa (peso seco)
	Codificado	Real	Codificado	Real	gL ⁻¹
1	-1	0,05 gL ⁻¹	-1	MBM	0,145
2	-1	0,05gL ⁻¹	0	BG ₁₁	0,128
3	-1	0,05gL ⁻¹	1	CHU ₁₃	0,200
4	0	0,1 gL ⁻¹	-1	MBM	0,474
5	0	0,1 gL ⁻¹	0	BG ₁₁	0,407
6	0	0,1 gL ⁻¹	1	CHU ₁₃	0,478
7	1	0,2 gL ⁻¹	-1	MBM	0,693
8	1	0,2 gL ⁻¹	0	BG ₁₁	0,507
9	1	0,2 gL ⁻¹	1	CHU ₁₃	0,604

O $F_{\text{crítico}}$ da tabela da Distribuição F para $\alpha=0,05$ para 1 gl da fonte variação e 4 gl para erro é 7,71 (Montgomery e Runger, 2011). Na TABELA 4.10 é apresentado a análise de variância, onde observa-se que existe diferença significativa entre as taxas de inóculo já que há $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítico}}$ e o valor- $P < 0,05$, mas entre os meios de cultivo sintéticos não há diferença significativa $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítico}}$ e o valor- $P > 0,05$, isto quer dizer que a microalga *B. braunii* pode se adaptar a qualquer um desses meios testados e que quanto maior a taxa de inóculo maior será a produção de biomassa.

TABELA 4.10. ANOVA PLANEJAMENTO 2³ SELAÇÃO DO MEIO E TAXA DE INOCULAÇÃO $R^2=0,97352$.

Fonte da variação	SQ	gl	MS	F	p
(1) Taxa de Inoculação (L)	0,2952	1	0,2952	135,388	0,0003
Taxa de Inoculação (Q)	0,0108	1	0,0108	4,954	0,0900
(2)Meio de Cultura(L)	0,0001	1	0,0001	0,068	0,8060
Meio de Cultura(Q)	0,0144	1	0,0144	6,625	0,0617
Erro	0,0087	4	0,0021		
Total SS	0,3293	8			

Na FIGURA 4.5 observa-se a diferença entre a biomassa produzida utilizando as três taxas de inóculo. Depois de 15 dias de cultivo a concentração biomassa de $0,1\text{gL}^{-1}$ e $0,2\text{gL}^{-1}$ duplicou. Já para $0,05\text{gL}^{-1}$ inicial demorou para sair da fase de latência e não houve boa produção de biomassa.

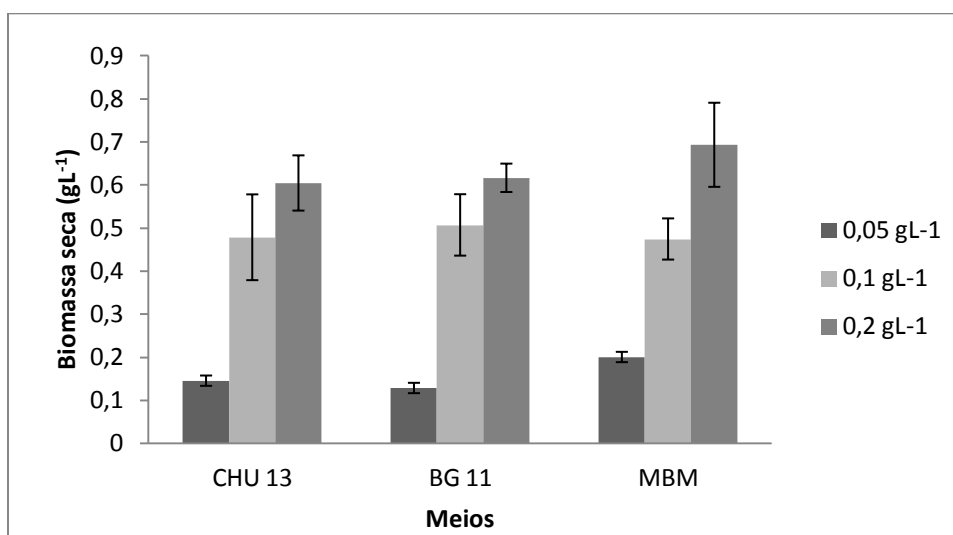


FIGURA 4.5. PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM TRÊS MEIOS DE CULTIVO COM TRÊS TAXAS DE INOCULAÇÃO DIFERENTES

Na FIGURA 4.6 observa-se o gráfico de Pareto onde o inóculo foi significativo para um nível de significância de 95%. Os meios de cultura não apresentam diferença entre eles.

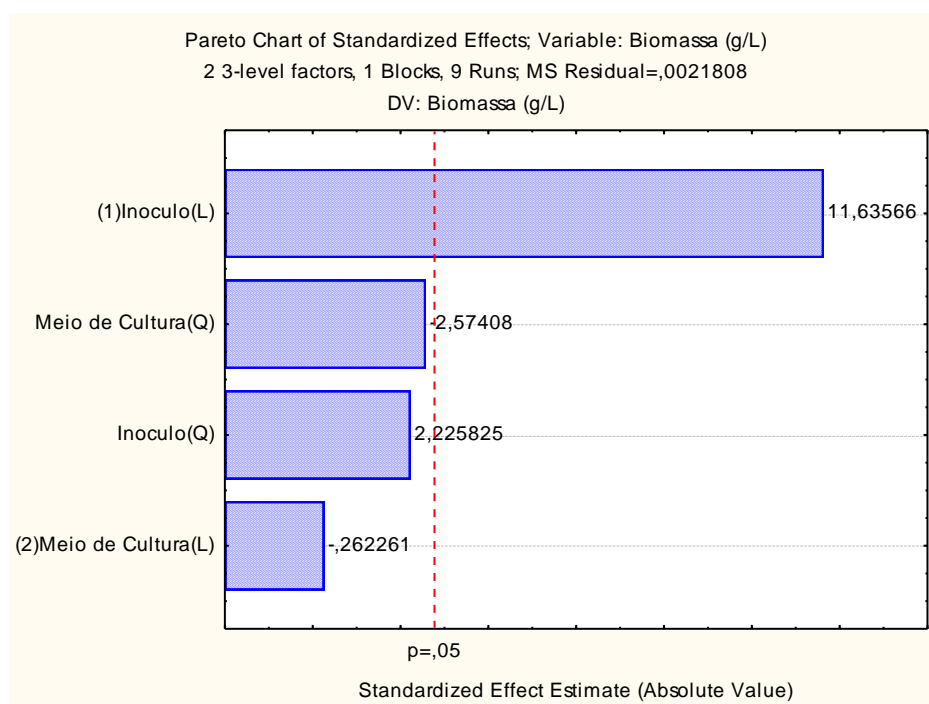


FIGURA 4.6. GRÁFICO DE PARETO PARA SELAÇÃO DE MEIO E TAXA INOCULAÇÃO (FATORIAL COMPLETO 2³).

Por ser *Botryococcus braunii* uma microalga de crescimento lento é lógico garantir uma boa quantidade de inóculo, por exemplo começar com 20% de inóculo v/v (Dayananda *et al.*, 2006) 25% de inóculo para todos os experimentos (Dayananda *et al.*, 2007), a concentração inicial do inóculo deve ser 0,2 g de peso seco por litro (Eroglu, Okada e Melis, 2011)

4.6. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO (DDCR)

Com base na literatura (Banerjee *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2010) e em experiências previas no laboratório o nitrato de sódio o citrato férrico e o fosfato de potássio foram escolhidos para este experimento devido a sua importância para crescimento da microalga citado na literatura. Na TABELA 4.11 apresenta-se o planejamento experimental com os três fatores, com seus cinco níveis e a resposta Biomassa. As

concentrações ótimas dos três sais testados foram $0,3 \text{ gL}^{-1}$ de nitrato de sódio; $0,03 \text{ gL}^{-1}$ de citrato férrico e $0,12 \text{ gL}^{-1}$ de fosfato de potássio, para produção de biomassa

TABELA 4.11. PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL PARA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO.

	NaNO ₃		K ₂ HPO ₄		Citrato Fe		Biomassa	%HC	%HC
								externos	internos
1	-1	0,200	-1	0,072	-1	0,011	0,646	9,29	8,36
2	-1	0,200	-1	0,072	1	0,025	0,726	4,41	7,99
3	-1	0,200	1	0,168	-1	0,011	0,714	8,96	7,28
4	-1	0,200	1	0,168	1	0,025	0,666	3,90	7,21
5	1	0,400	-1	0,072	-1	0,011	0,568	2,46	9,15
6	1	0,400	-1	0,072	1	0,025	0,592	2,03	7,77
7	1	0,400	1	0,168	-1	0,011	0,484	12,81	5,37
8	1	0,400	1	0,072	1	0,025	0,664	6,02	9,04
9	-1,68	0,100	0	0,120	0	0,018	0,962	11,23	5,82
10	1,68	0,500	0	0,120	0	0,018	0,868	11,75	4,84
11	0	0,300	-1,68	0,040	0	0,018	0,564	7,09	9,22
12	0	0,300	1,68	0,200	0	0,018	0,604	8,94	5,96
13	0	0,300	0	0,120	-1,68	0,006	0,960	9,79	5,62
14	0	0,300	0	0,120	1,68	0,030	1,050	5,14	6,10
15	0	0,300	0	0,120	0	0,018	0,674	6,82	7,12
16	0	0,300	0	0,120	0	0,018	0,834	7,67	9,83
17	0	0,300	0	0,120	0	0,018	0,670	1,49	8,96

O $F_{\text{crítico}}$ da tabela da Distribuição F para $\alpha=0,1$ para 1 gl da fonte variação e 7gl para o erro é 3,59. (Montgomery e Runger, 2011). Há uma relação entre concentração de fosfato de potássio e a produção de biomassa já que $(3,612) F_{\text{cal}} > F_{\text{crítico}}$ e o valor- $P < 0,1$, há diferença significativa entre as concentrações avaliadas. Quanto aos outros sais não existe uma relação entre eles e a produção de

biomassa utilizando as concentrações avaliadas em este planejamento, já que não há diferença significativa $F_{cal} < F_{crítico}$ e o valor $p > 0,1$ (TABELA 4.12).

TABELA 4.12. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL, $R^2=0,641$, PARA RESPOSTA BIOMASSA.

Fonte da variação	SQ	gl	MS	F	p
(1)NaNO ₃ (L)	0,0121	1	0,0121	0,580	0,4711
NaNO ₃ (Q)	0,0191	1	0,0191	0,911	0,3715
(2)K ₂ HPO ₄ (L)	0,0054	1	0,0054	0,258	0,6266
K ₂ HPO ₄ (Q)	0,0758	1	0,0758	3,612	0,0991
(3)Citrato (L)	0,0188	1	0,0188	0,898	0,3747
Citrato (Q)	0,0446	1	0,0446	2,126	0,1881
Error	0,1469	7	0,0209		
Total SS	0,4091	16			

Na FIGURA 4.7 observa-se a superfície de resposta correspondente a produção da biomassa entre as diferentes concentrações de nitrato de sódio e fosfato de potássio testadas neste experimento, onde podemos observar que concentrações muito baixas de fosfato favorecem a produção de biomassa, o crescimento persiste depois da completa exaustão de fosfato no meio, as células absorvem quantidades de fosfato em grânulos intracelulares que continuam a usar até a fonte de nitrogênio acabar. A melhor condição encontrada para o fosfato de potássio encontra-se entre 0,04 e 0,12gL⁻¹; esta faixa pode ser devido a que as microalgas segundo Banerjee (2002) tem capacidade de absorver fosfato rapidamente em grandes quantidades, armazenado em grânulos intracelulares, por tanto o consumo vai variar dependendo de se a microalga tem fosfato ou não acumulado em seu interior. Enquanto o nitrato de sódio foi de 0,2 gL⁻¹, O nitrato é um dos nutrientes mais importantes para o crescimento de *B. braunii* porem a sua quantidade no meio não deve ser exagerada, já que por ser uma microalga de crescimento lento, o nitrato é consumido devagar e uma quantidade equivalente 0,2 gL⁻¹ pode ser consumida em 15 dias, e o acumulo de hidrocarbonetos que é um dos nossos objetivos será atingido quando a microalga entra em fase estacionaria.

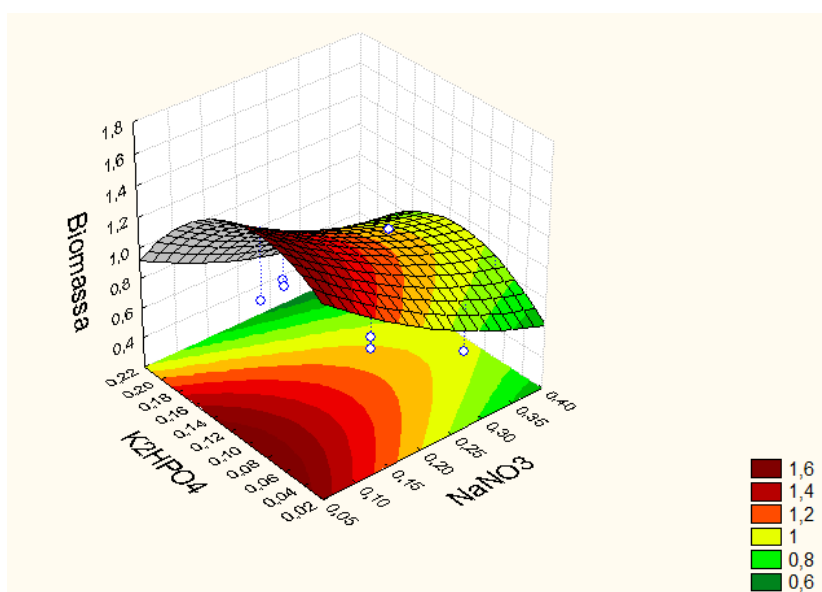


FIGURA 4.7. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A VARIÁVEL BIOMASSA, K_2HPO_4 E $NaNO_3$.

A melhor condição para o citrato férrico foi uma concentração de 0,004 até 0,006 gL^{-1} e para o K_2HPO_4 de igual forma que na figura anterior a melhor concentração foi de 0,08 (FIGURA 4.8).

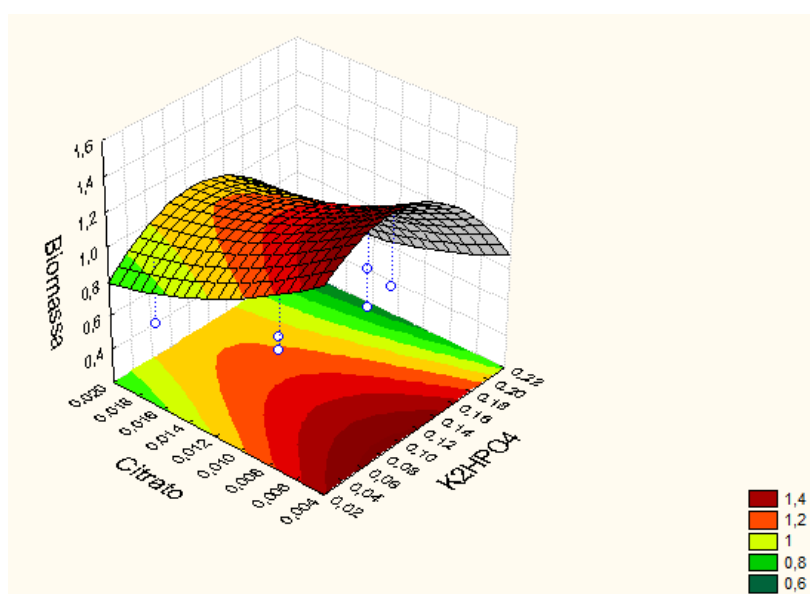


FIGURA 4.8. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA CITRATO FÉRRICO VS K_2HPO_4 .

A quantidade de biomassa obtida antes da otimização foi $0,128 \text{ gL}^{-1}$ para a cepa Utex 572 em 15 dias de cultivo, começando com uma concentração de $0,01 \text{ gL}^{-1}$. Depois da otimização a produção da biomassa aumentou 8,2 vezes, chegando a $1,05 \text{ gL}^{-1}$ em 15 dias de cultivo começando com uma concentração $0,1 \text{ gL}^{-1}$. No meio otimizado para crescimento de biomassa a produtividade foi de $0,07 \text{ gL}^{-1}/\text{dia}$.

O F_{critico} da tabela da Distribuição F para $\alpha=0,1$ para 1 gl da fonte variação e 7gl para o erro é 3,59. (Montgomery e Runger, 2011). Há uma relação entre concentração de nitrato de sódio e fosfato de potássio e a produção de hidrocarbonetos externos já que $F_{\text{cal}} > F_{\text{critico}}$ e o valor-P $< 0,1$, há diferença significativa entre as concentrações avaliadas. (TABELA 4.13).

TABELA 4.13. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL, $R^2=0,752$, PARA RESPOSTA HIDROCARBONETOS EXTERNOS.

Fonte da variação	SQ	gl	MS	F	p
(1)NaNO ₃ (L)	1,362	1	1,362	0,200	0,667
NaNO ₃ (Q)	39,370	1	39,370	5,801	0,046
(2)K ₂ HPO ₄ (L)	26,632	1	26,632	3,924	0,088
K ₂ HPO ₄ (Q)	4,597	1	4,597	0,677	0,437
(3)Citrato (L)	19,943	1	19,943	2,938	0,130
Citrato (Q)	2,312	1	2,312	0,340	0,577
Error	47,507	7	6,786		
Total SS	191,630	16			

Na FIGURA 4.9 observa-se a superfície correspondente a resposta de hidrocarbonetos externos para as variáveis experimentais nitrato de sódio e fosfato de potássio, onde é possível identificar que quando mais baixa a concentração destes dois sais maior será a produção de hidrocarbonetos internos

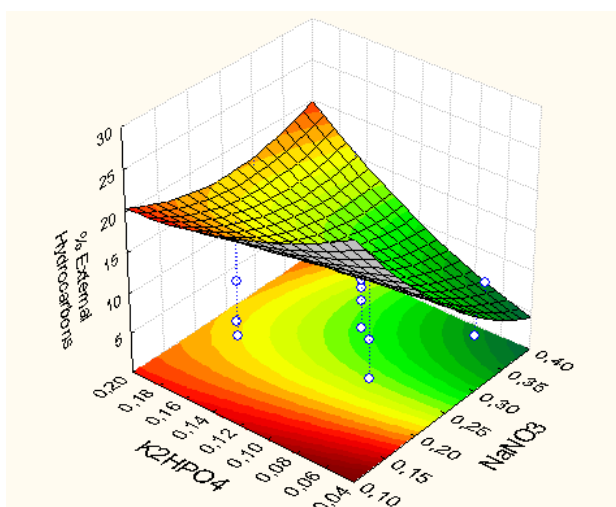


FIGURA 4.9. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A VARIÁVEL HIDROCARBONETOS EXTERNOS, K_2HPO_4 E $NaNO_3$.

A FIGURA 4.10 e a FIGURA 4.11 apresentam duas superfícies correspondentes à resposta de hidrocarbonetos externos para as variáveis nitrato de sódio, fosfato de potássio e citrato férrico e suas interações.

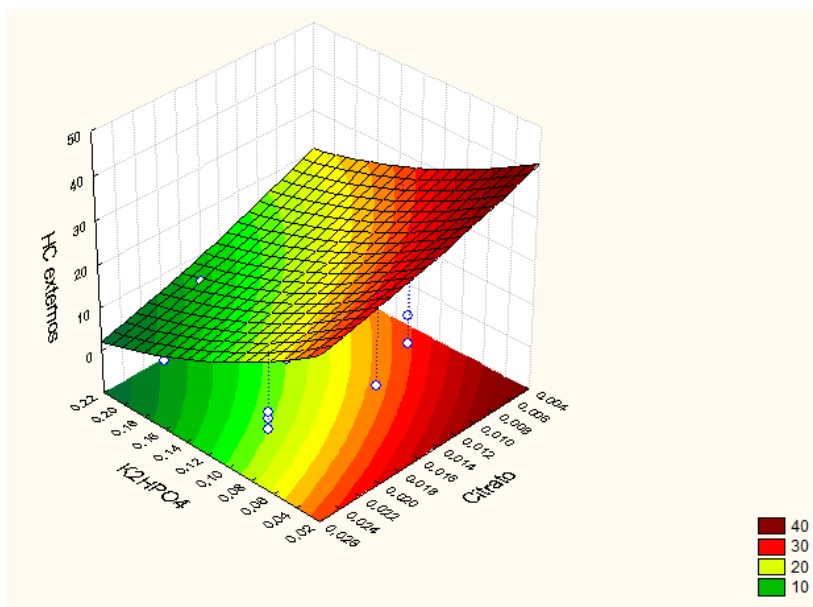


FIGURA 4.10. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A VARIÁVEL HIDROCARBONETOS EXTERNOS, FÉRRICO E K_2HPO_4 .

Nas duas figuras observa-se que o citrato férrico é requerido em concentrações baixas para a produção de hidrocarbonetos externos. Os hidrocarbonetos externos, como os botryococenos, esqualenos metilados, triterpenos de cadeia longa são metabolitos secundários (Metzger e Largeau, 2005), portanto eles são produzidos na fase estacionaria de crescimento, quando a maioria dos nutrientes são esgotados, isso explica os resultados dos analises estatísticos, que demonstram que quantidades muito pequenas dos sais analisados são necessárias para a produção dos hidrocarbonetos.

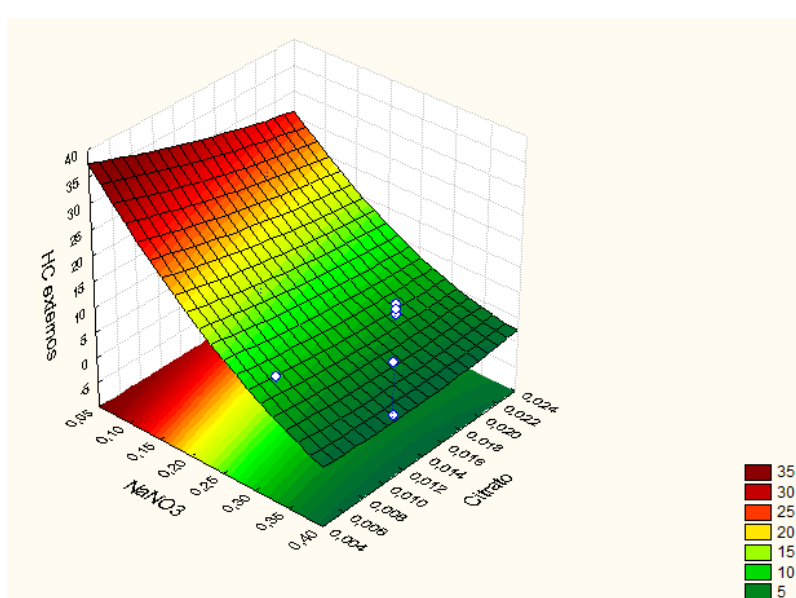


FIGURA 4.11. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A VARIÁVEL HIDROCARBONETOS EXTERNOS, CITRATO FÉRRICO VS NaNO_3 .

Existe uma relação entre concentração de nitrato de sódio, fosfato de potássio e citrato férrico a produção de hidrocarbonetos internos já que $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítico}}$ e o valor-P $< 0,1$, há diferença significativa entre as concentrações avaliadas. (TABELA 4.14). Uma observação deve ser feita neste ponto, já que os hidrocarbonetos internos englobam também outro tipo de lipídeos pelo método de extração; estes podem ser lipídeos intracelulares que formam parte de organelas e suas membranas, ácidos graxos entre outros.

TABELA 4.14. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL, $R^2=0,798$, PARA RESPOSTA HIDROCARBONETOS INTERNOS.

Fonte da variação	SQ	gl	MS	F	p
(1)NaNO ₃ (L)	1,431	1	1,431	1,272	0,296
NaNO ₃ (Q)	11,120	1	11,120	9,883	0,016
(2)K ₂ HPO ₄ (L)	14,229	1	14,229	12,646	0,009
K ₂ HPO ₄ (Q)	0,413	1	0,413	0,367	0,563
(3)Citrato (L)	0,064	1	0,064	0,057	0,817
Citrato (Q)	6,977	1	6,977	6,201	0,041
Error	7,876	7	1,125		
Total SS	39,025	16			

A FIGURA 4.12 apresenta a superfície de resposta para a produção de hidrocarbonetos internos em função das variáveis nitrato de sódio e fosfato de potássio, onde a concentração ótima dos sais para a produção de hidrocarbonetos internos de nitrato de sódio foi de 0,3 a 0,4 gL⁻¹, e o fosfato de potássio de 0,04 a 0,12 gL⁻¹.

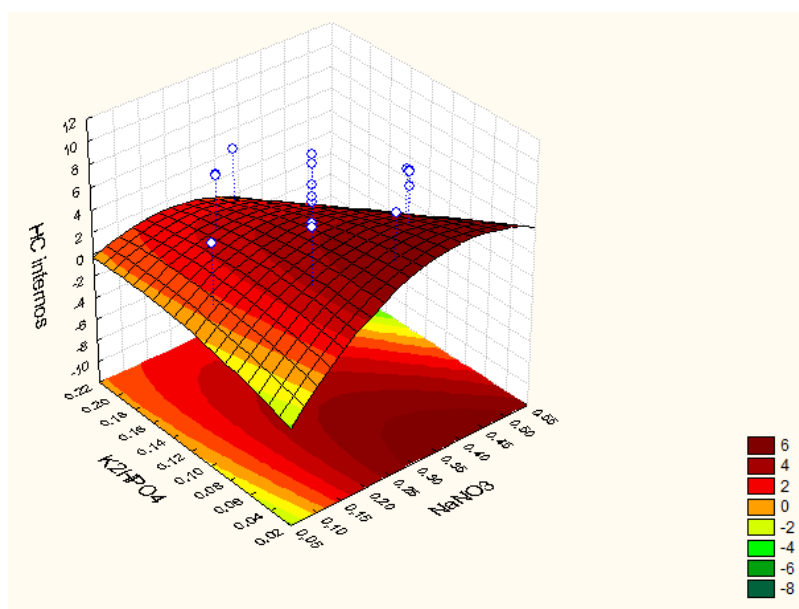


FIGURA 4.12. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A VARIÁVEL HIDROCARBONETOS INTERNOS, K₂HPO₄ E NANO₃.

A FIGURA 4.13 apresenta a superfície de resposta para a produção de hidrocarbonetos internos em relação as variáveis citrato férrico e fosfato de potássio, as melhores concentrações foram $0,018 \text{ gL}^{-1}$ e de $0,14 \text{ gL}^{-1}$ respectivamente

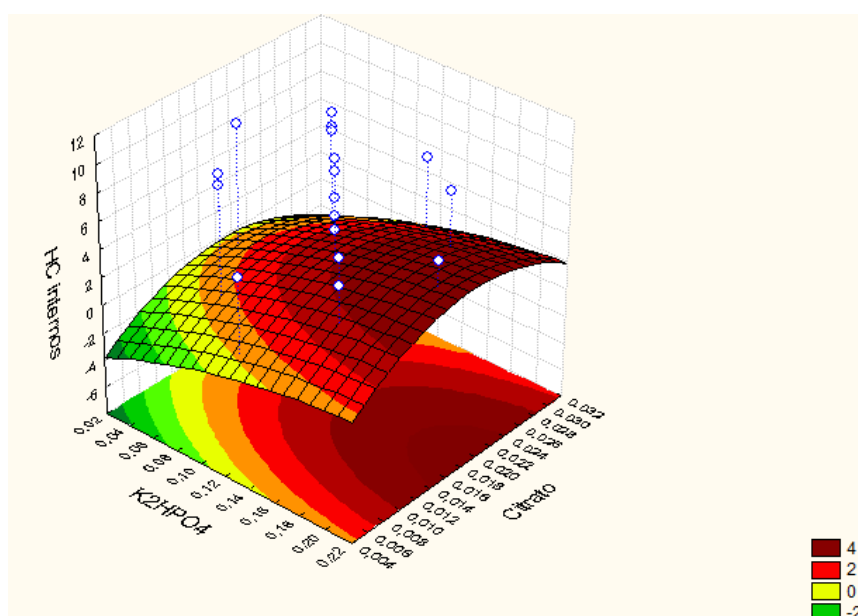


FIGURA 4.13. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A VARIÁVEL HIDROCARBONETOS INTERNOS, CITRATO FÉRRICO VS K_2HPO_4 .

Na FIGURA 4.14 observa-se a superfície de resposta para a produção de hidrocarbonetos internos em função das variáveis nitrato de sódio e citrato férrico, melhores condições $0,4 \text{ gL}^{-1}$ e $0,016 \text{ gL}^{-1}$ respectivamente.

Como já foi mencionado anteriormente os hidrocarbonetos internos, são produzidos durante a fase ativa de crescimento já que formam parte algumas estruturas celulares ou são os precursores dos hidrocarbonetos externos, por tanto ao final do cultivo sua quantidade é baixa; por exemplo, Achitouv (2004) conseguiu $0,58 \text{ g}$ ($3,6\%$) de hidrocarbonetos internos de uma biomassa seca de $15,8 \text{ g}$ de *B. braunii*, em quanto de hidrocarbonetos externos foi maior de $2,1 \text{ g}$ ($13,2 \%$). Na melhor condição do experimento foram obtidos $11,2\%$ de hidrocarbonetos externos da biomassa seca e $9,8\%$ de hidrocarboneto internos da biomassa seca.

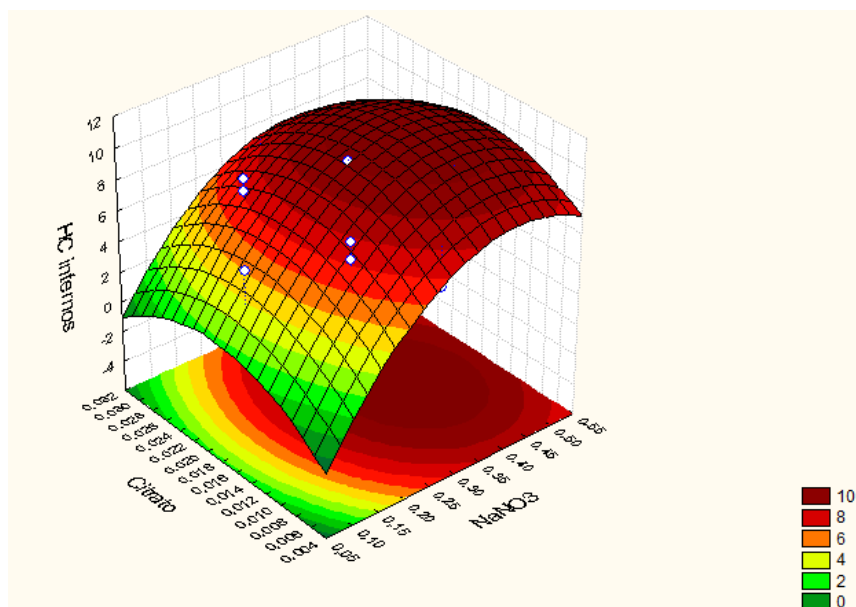


FIGURA 4.14. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A VARIÁVEL HIDROCARBONETOS INTERNOS, CITRATO FÉRRICO VS NaNO_3 .

A produção de biomassa encontra-se ligada a produção de hidrocarbonetos internos e externos durante as diferentes etapas de crescimento. A raça A de *B. braunii* produz hidrocarbonetos alcadienos e trienos. (Banerjee *et al.*, 2002). Esta microalga é rica fonte de lípidos, incluindo os ácidos graxos, epóxidos, alquilfenóis, éteres lipídicos (Achitouv *et al.*, 2004). Existem semelhanças estruturais (locais de ligações duplas), e estereoquímica de alcadienos com a de ácido oléico (18:1 e cis- ω 9). Estas características e outras evidências sugerem que o ácido oleico é o precursor directo dos n-alcadienos. A concentração intracelular de ácido oleico permanece relativamente baixa durante a rápida produção de hidrocarbonetos (Banerjee *et al.*, 2002). Isto explica a produção mais baixa de hidrocarbonetos internos em comparação com os externos.

4.7. PLANEJAMENTO COM ÚNICO FATOR: CONCENTRAÇÃO DE EDTS

Depois de caracterizar e comparar o EDTS com os meios sintéticos observa-se que existe uma deficiência de alguns nutrientes e excesso de outros por tanto é necessário achar uma concentração ideal que EDTS para ser suplementada com sais para maximar o crescimento da microalga *B. braunii*. Na TABELA 4.15 apresenta-se o planejamento com um único fator, a concentração de EDTS que para este experimento foi diluído em meio BG₁₁, observa-se a produção de biomassa em peso seco onde a melhor condição de crescimento foi com uma concentração de 50% de EDTS e 50% de meio BG₁₁; com uma produção de 0,41 gL⁻¹ de biomassa.

TABELA 4.15. EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EDTS DILUÍDO EM MEIO BG₁₁.

Concentração EDTS	Concentração meio BG₁₁	Biomassa gL⁻¹ (peso seco)
0%	100%	0,25
25%	75%	0,38
50%	50%	0,41
75%	25%	0,37
100%	0%	0,37

Na FIGURA 4.15 apresenta-se a produção de biomassa para cada concentração de esgoto tratado, sendo o 50% a melhor condição para crescimento da microalga *B. braunii* com uma media de 0,41 gL⁻¹ de biomassa seca, após 15 dias de cultivo. Existem registro de que o esgoto doméstico tratado por lodos ativados pode ser utilizado como meio de cultivo para produção de hidrocarbonetos por *B. braunii*; aproveitar esgoto doméstico tratado secundariamente pode reduzir o custo da produção de hidrocarbonetos (Banerjee *et al.*, 2002). O EDTS foi testado para

produção de hidrocarbonetos em batelada e o resultado foi similar ao do crescimento utilizando o meio sintético CHU₁₃, o conteúdo de hidrocarbonetos foi de 40% do peso seco, além disso a microalga removeu o nitrato e fosfato presentes no esgoto tratado a níveis abaixo a concentração de detecção $<0,01 \text{ mgL}^{-1}$ (Sawayama *et al.*, 1992). O crescimento e produção de hidrocarbonetos também foram avaliados em biorreator contínuo com uma produção de biomassa de $0,8 \text{ gL}^{-1}$ em 30 dias e conteúdo de hidrocarbonetos de 49% (Sawayama, Inoue e Yokoyama, 1994).

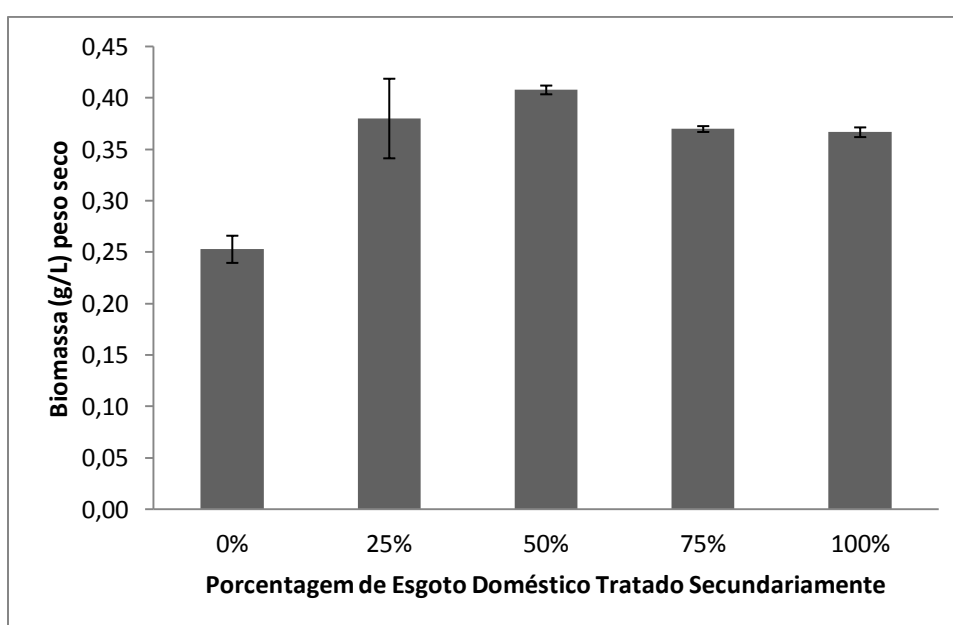


FIGURA 4.15. PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM PESO SECO PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EDTS.

Na TABELA 4.16 apresenta-se o análise de variância para o planejamento de um fator, concentração de EDTS. Existe uma relação entre a concentração de EDTS e a produção de biomassa já que o $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítico}}$ e o valor-P $< 0,1$, há diferença significativa entre as concentrações avaliadas.

TABELA 4.16. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O PLANEJAMENTO DE UM FATOR (CONCENTRAÇÃO DE EDTS)

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Concentração de EDTS	0,057	4	0,014	2,865	0,060	2,361
Erro	0,074	15	0,004			
Total	0,132	19				

A diluição de esgoto tratado em meio de cultivo BG₁₁ modificado (contendo as quantidades de sais otimizadas no item 4.6.) serve como uma suplementação de nutrientes que são encontrados em baixas concentrações no EDTS, favorecendo o crescimento da microalga *B. braunii*, em escala de laboratório água destilada é utilizada para a preparação do meio, mas em escala industrial ou piloto pode ser utilizada água potável decolorada o que diminuiria os custos de produção em larga escala. Ao ser 50% da composição do meio cultivo EDTS ajuda muito na economia, porém o crescimento é baixo. Portanto mais otimizações das condições do cultivo são necessárias.

4.8. INFLUENCIA DA CONCENTRAÇÃO CO₂ E DA INTENSIDADE DE LUZ

Segundo a Banerjee (2002) a concentração de CO₂ e intensidade de luz são fatores de grande importância para atingir uma produção de biomassa considerável da microalga *B. braunii*. A TABELA 4.17 apresenta o planejamento Box, Hunter & Hunter, dois fatores, 4 corridas mais 3 pontos centrais, 7 experimentos, sendo que EDTS para este experimento foi diluído a 50% com meio BG₁₁; observa-se que as respostas foram biomassa seca (gL⁻¹), porcentagem de hidrocarbonetos externos e internos, onde a melhor condição de crescimento foi com uma concentração de CO₂ de 100mL L⁻¹min⁻¹, e 70 μmol m⁻²s⁻¹ com uma produção de 1,77 gL⁻¹ de biomassa

seca, 21,66 % de hidrocarbonetos externos da biomassa seca e 1,39% de hidrocarbonetos internos.

TABELA 4.17. PLANEJAMENTO BOX, HUNTER & HUNTER PARA INFLUENCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ E DA INTENSIDADE DE LUZ.

N°	CO₂ (mL L⁻¹min⁻¹)		Luz (μmol m⁻²s⁻¹)		Biomassa (gL⁻¹)	% HC externos	% HC internos
1	-1	0	-1	12,6	0,539	10,202	2,597
2	1	100	-1	12,6	0,519	8,330	2,700
3	-1	0	1	70	1,442	17,066	2,934
4	1	100	1	70	1,772	21,667	1,399
5	0	50	0	49	1,274	11,078	1,939
6	0	50	0	49	0,838	11,329	2,662
7	0	50	0	49	0,967	15,475	2,462

Na FIGURA 4.16 observa-se a produção de biomassa *B. braunii* em gL⁻¹, onde o melhor experimento foi o 4, os outros experimentos apresentaram concentrações de biomassa mais baixas, especialmente os tratamentos 1 e 2 onde a intensidade de luz foi a mais baixa do planejamento. Os cultivos de algas requerem que a iluminação seja natural ou artificial para crescer; estes experimentos foram iluminados artificialmente, usando diferentes intensidades, identificando que quanto mais iluminado mais concentração de biomassa será produzida.

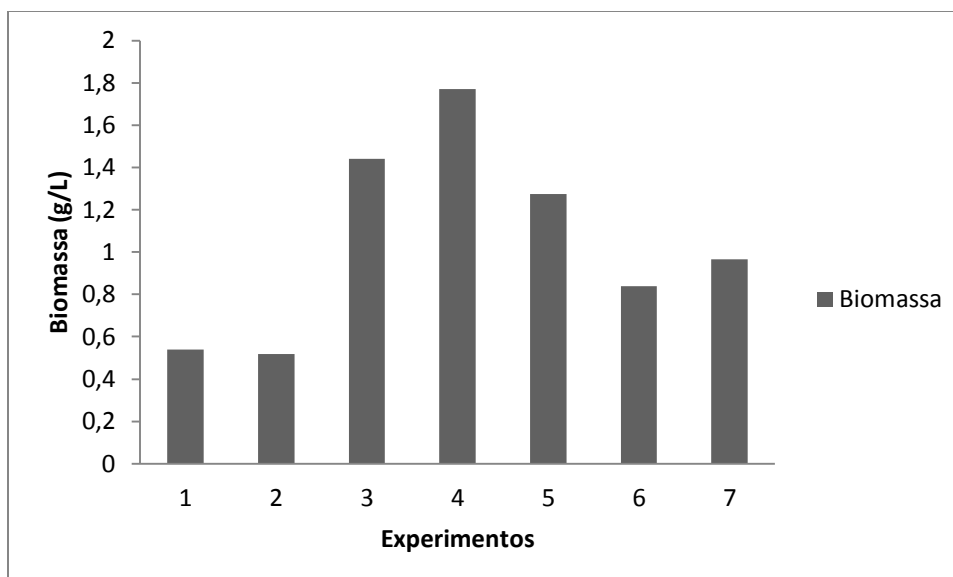


FIGURA 4.16. PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM PESO SECO PARA O PLANEJAMENTO BOX, HUNTER & HUNTER.

O $F_{\text{crítico}}$ da tabela da Distribuição F para $\alpha=0,05$ para 1 gl da fonte variação e 3gl para o erro é 10,13. (Montgomery e Runger, 2011). Na TABELA 4.18 apresenta-se o análise de variância para o planejamento Box, Hunter & Hunter. Para a produção de biomassa existe uma relação entre a intensidade de luz já que o $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítico}}$ e o valor- $P < 0,05$, há diferença significativa entre as intensidades de luz avaliadas. Mas para as concentrações de CO_2 testadas não achou-se diferença significativa.

TABELA 4.18. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO PLANEJAMENTO BOX, HUNTER & HUNTER, $R^2=0,922$, PARA RESPOSTA BIOMASSA.

Fonte da variação	SQ	gl	MS	F	p
(1)CO ₂	0,024	1	0,024	0,698	0,464
(2)Lux	1,162	1	1,162	33,74	0,010
1 by 2	0,030	1	0,030	0,895	0,413
Error	0,103	3	0,034		
Total SS	1,320	6			

O $F_{\text{crítico}}$ da tabela da Distribuição F para $\alpha=0,05$ para 1 gl da fonte variação e 3gl para o erro é 10,13. (Montgomery e Runger, 2011). Na TABELA 4.19 apresenta-se o análise de variância para o planejamento Box, Hunter & Hunter. Para a produção de hidrocarbonetos externos existe uma relação entre a intensidade de luz já que o $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítico}}$ e o valor- $P < 0,05$, há diferença significativa entre as intensidades avaliadas, enquanto as concentrações de CO_2 utilizadas não foram significativas para a produção de hidrocarbonetos externos.

TABELA 4.19. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO PLANEJAMENTO BOX, HUNTER & HUNTER, $R^2=0,869$, PARA RESPOSTA HIDROCARBONETOS EXTERNOS.

Fonte da variação	SQ	gl	MS	F	p
(1) CO_2	1,862	1	1,862	0,326	0,607
(2)Lux	102,010	1	102,010	17,909	0,024
1 by 2	10,475	1	10,475	1,839	0,268
Error	17,087	3	5,695		
Total SS	131,435	6			

Na TABELA 4.20. apresenta-se o análise de variância para o planejamento Box, Hunter & Hunter. Para a produção de hidrocarbonetos internos não existe relação entre as variáveis avaliadas já que o $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítico}}$ e o valor- $P > 0,05$.

TABELA 4.20. ANÁLISE DE DO PLANEJAMENTO FATORIAL BOX, HUNTER & HUNTER, $R^2=0,833$, PARA RESPOSTA HIDROCARBONETOS INTERNOS.

Fonte da variação	SQ	gl	MS	F	p
(1) CO_2	0,512	1	0,512	5,429	0,102
(2)Lux	0,231	1	0,231	2,452	0,215
1 by 2	0,670	1	0,670	7,097	0,076
Error	0,283	3	0,094		
Total SS	1,698	6			

Cultivos fotossintéticos como os que foram feitos em estes experimentos com *B. braunii* requerem CO₂; segundo Banerjee (2002) quando os cultivos são aerados com ar enriquecido com 3% de CO₂, as células têm um tempo mais curto de duplicação.

Sob iluminação intensa de 140 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, as células de microalga que têm se adaptado a essa alta irradiância produzem concentrações maiores de biomassa por tanto de hidrocarbonetos (Banerjee *et al.*, 2002).

Comparando com experimentos anteriores percebe-se que há um aumento na concentração de biomassa e a produção dos hidrocarbonetos encontra-se dentro da faixa citada na literatura. Para a produção de biomassa e de hidrocarbonetos a intensidade de luz tem influência, portanto é necessário que os cultivos tenha sempre as condições de luz necessárias ou o desenho do fotobiorreator favoreça uma boa superfície de exposição. Apesar da concentração de CO₂ ter dado não significativo estatisticamente para este experimento, não significa que não seja necessário para aumentar a produção de biomassa e hidrocarbonetos. A vazão utilizada não foi significativa para identificar uma diferença significativa nas respostas.

4.9. VALIDAÇÃO DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM FOTOBIORREATOR

Na TABELA 4.21 apresenta-se os valores obtidos durante 36 dias de cultivo de microalga *B. braunii* CCAP 807/2 em um fotobiorreator de 9L; estes dados correspondem a determinação de biomassa por peso seco (gL^{-1}) e absorvância (nm), também encontra-se dados sobre os consumo do ion nitrato em gL^{-1} . No ultimo dia de cultivo foi atingida uma concentração de biomassa de $1,8\text{gL}^{-1}$, o nitrato ficou em uma concentração muito baixa, inferior ao valor de detecção.

TABELA 4.21. VALORES OBTIDOS DA VALIDAÇÃO DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM FOTOBIOREATOR.

Dias cultivo	Absorbância (nm)	peso seco (gL⁻¹)	Ln X	NO₃ (gL⁻¹)
1	0,098	0,15	-1,89	0,16
3	0,114	0,18	-1,71	0,13
5	0,176	0,32	-1,14	0,14
7	0,270	0,40	-0,91	0,13
9	0,357	0,49	-0,71	0,12
11	0,440	0,64	-0,44	0,10
13	0,531	0,67	-0,40	0,10
15	0,604	0,87	-0,14	0,10
17	0,683	0,89	-0,12	0,11
19	0,771	1,09	0,086	0,09
21	1,003	1,07	0,069	0,04
23	1,191	1,129	0,121	0,03
30	1,574	1,43	0,357	0,03
32	1,694	1,573	0,452	0,02
36	1,955	1,88	0,631	0,04

Os estudos cinéticos do crescimento de *B braunii* depois da otimização do processo para a cepa 807/2 foram os seguintes: a concentração celular máxima ($X_{máx}$) foi 1,88 gL⁻¹, a velocidade específica do crescimento ($\mu_{máx}$) 0,1 dia⁻¹ determinado durante a fase exponencial (5 a 15 dias), a produtividade máxima ($\gamma_{máx}$) 0,055 gL⁻¹ d⁻¹, e o tempo de duplicação de biomassa (Td) 6,93 dias (FIGURA 4.17).

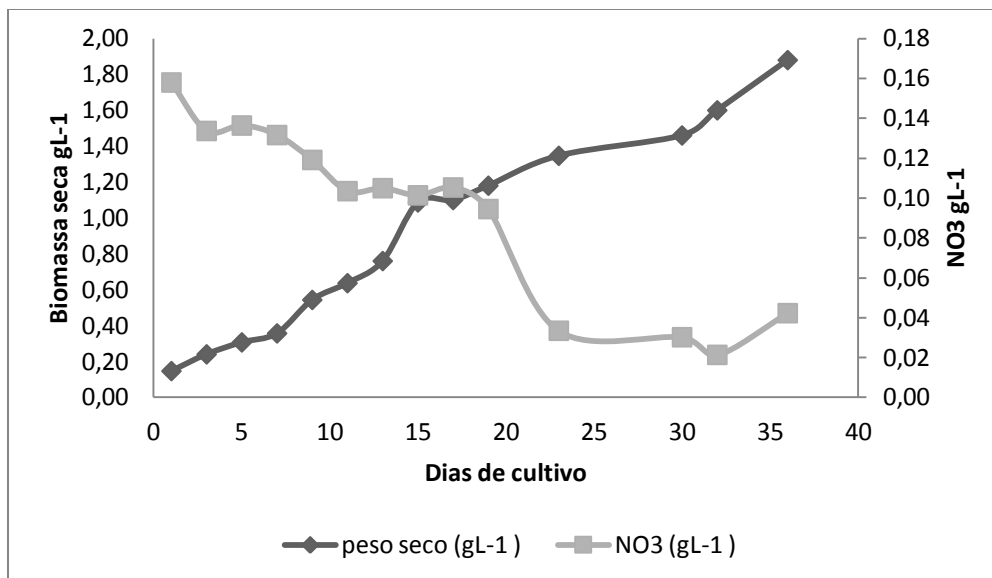


FIGURA 4.17. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE BIOMASSA DE *B. braunii* 807/2 E CONSUMO DE NO_3 PARA A VALIDAÇÃO EM FOTOBIORREATOR.

Na FIGURA 4.18 observa-se uma curva padrão de absorbância e biomassa seca para *B. braunii* 807/2, esta curva é útil já que nos permite utilizando a formula $y=0,8239+0,2121$ obter o valor de biomassa seca, de uma leitura de absorbância. Em caso de ter cultivos pequenos onde não possível coletar uma amostra grande para realizar a cinética ou não se dispõe equipamentos, esta curva pode ser útil.

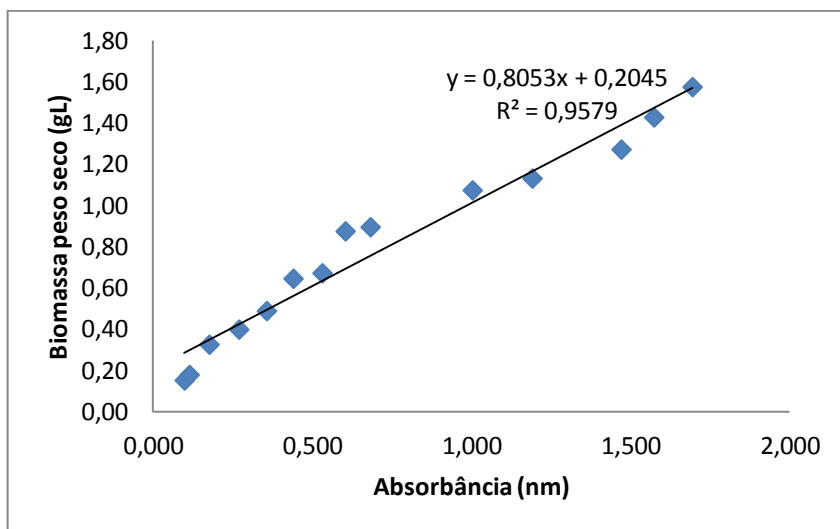


FIGURA 4.18. CURVA PADRÃO DE ABSORBÂNCIA E BIOMASSA SECA PARA *B. braunii* 807/2.

A TABELA 4.22 apresenta um resumo do processo de extração de hidrocarbonetos de uma alíquota do Biorreator em diferentes tempos de cultivo, um aos 24 dias e outro aos 36 dias de cultivos; aos 36 dias a porcentagem de hidrocarbonetos externos foi de 13,24 % dentro da faixa citada na literatura, porém é inferior a quantidade de hidrocarbonetos extraídos aos 24 dias de cultivo que foi de 27,49%, uma explicação possível para este fenômeno é a liberação de gotículas de óleo para o meio de cultivo no final da fase estacionária, além muitas células são lisadas por morte celular liberando os hidrocarbonetos dificultando assim a recuperação total dos hidrocarbonetos. Por tanto seria recomendável cultivos de máximo 25 dias onde a porcentagem de hidrocarbonetos tanto internos como externos é elevada.

TABELA 4.22. EXTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DA VALIDAÇÃO CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM FOTOBIOREATOR.

Produção no Fotobiorreator	Valores	
Tempo de cultivo (dias)	24	36
Volume utilizado para análise (L)	1	2,5
Biomassa Seca (g)	1,29	4,4
% de Hidrocarbonetos Externos	27,49	13,24
% de Hidrocarbonetos Internos	11,56	3,71
% Total de Hidrocarbonetos	39,05	16,95

Na TABELA 4.23 observa-se um resumo das otimizações realizadas sequencialmente, até chegar na validação de todas as otimizações; depois da validação a porcentagem de biomassa aumentou em 514%. Um dos experimentos chave é a otimização das condições do cultivo, CO₂ e intensidade de luz, que se forem incrementadas simulando as condições ambientais de luz natural e incrementando a superfície de contato a concentração de biomassa pode incrementar em futuros trabalhos.

TABELA 4.23. RESUMO DAS OTIMIZAÇÕES DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *B braunii*.

Parámetro	sem otimizar	Otimização inoculo	Otimização sais do meio	Otimização Luz e CO₂	Validação em Fotobioreactor (9L)
Biomassa seca (gL⁻¹)	0,35	0,60	1,05	1,77	1,8
porcentagem %		171	300	506	514

5. CONCLUSÕES

O esgoto doméstico tratado secundariamente pode ser utilizado como meio de cultivo, e fonte parcial de nutrientes para crescimento e produção de biomassa da microalga verde *B. braunii*.

A microalga *Botryococcus braunii* pode produzir aproximadamente $1,8 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa seca, sendo cultivada nas condições adequadas de temperatura, aeração, suplementação de CO_2 , foto período, irradiância, concentração de inóculo.

A microalga *B. braunii* pode crescer em vários meios sintéticos citados na literatura como CHU_{13} , BG_{11} e MBM, sem apresentar diferença significativa entre eles, mas quanto a taxa de inoculação o melhor produção de biomassa no planejamento foi utilizando $0,2 \text{ gL}^{-1}$.

As melhores cepas de *B. braunii* avaliadas neste trabalho foram a Utex 572 e a CCAP 807/2, que posteriormente foram utilizadas em vários experimentos devido a seu bom crescimento e produção de hidrocarbonetos medidos gravimetricamente.

A melhor fonte de nitrogênio para produção de biomassa de *B. braunii* são os sais de nitrato, já que sistema de captação de nitrogênio é a enzima nitrato reductase, que fica inativada quando exposta quantidades moderadas de amônio.

As condições otimizadas para o cultivo de *B. braunii* são: taxa de inóculo de $0,2 \text{ gL}^{-1}$, irradiância de $70 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ou mais,

Otimização das condições do cultivo de *B. braunii*, concentração de inóculo e meio de cultivo para produção de biomassa e hidrocarbonetos.

A melhor concentração de esgoto doméstico tratado secundariamente foi de 50% diluído com 50% de meio sintético BG_{11} modificado (com os sais otimizados), em essa concentração apresentou a melhor concentração celular, sem apresentar toxicidade pela presença de amônio, além de suprir a falta de nitrato no esgoto o meio BG_{11} complementa outros nutrientes necessários, como potássio, fósforo, ferro, magnésio e cálcio

6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Identificação dos hidrocarbonetos externos e internos utilizando um kit de padrões específicos em processo de compra pelo PPEBB

Aumento de escala, de bancada para escala piloto, utilizando um tanque agitado (race way) do PPEBB.

Sugiro a utilização de outro tipo de Efluentes que podem ser outros efluentes domésticos ou industriais. O esgoto doméstico tratado secundariamente utilizado neste trabalho foi obtido do tratamento anaeróbico em Ralf. Seria interessante utilizar esgoto doméstico tratado aerobicamente.

Melhorar outras condições de cultivo como, salinidade, superfície de absorção de luz, para produzir mais biomassa e porcentagem de hidrocarbonetos.

Comparar a produção de biomassa e hidrocarbonetos de *B. braunii* em diferentes estações do ano ou diferentes temperaturas.

REFERÊNCIAS

ACHITOUV, E. et al. C-31-C-34 methylated squalenes from a Bolivian strain of *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 23, p. 3159-3165, Dec 2004. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225575900014 >.

AN, J. Y. et al. Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 2-3, p. 185-191, Mar-Jun 2003. ISSN 0921-8971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183045600014 >.

ANP. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2012.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Baltimore, Maryland: United Book Press, Inc, 1995.

BANERJEE, A. et al. *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 3, 2002 2002. ISSN 0738-8551. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178740200002 >.

CALADO, V. M., D. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-papers Servicios Editoriales, 2003.

CASADEVALL, E. et al. STUDIES ON BATCH AND CONTINUOUS CULTURES OF *BOTRYOCOCCUS-BRAUNII* - HYDROCARBON PRODUCTION IN RELATION TO PHYSIOLOGICAL-STATE, CELL ULTRASTRUCTURE, AND PHOSPHATE NUTRITION. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 3, p. 286-295, 1985 1985. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1985ADM6100011 >.

DAYANANDA, C. et al. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. **Biomass & Bioenergy**, v. 31, n. 1, p. 87-93, Jan 2007. ISSN 0961-9534. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243709700010 >.

_____. Presence of methyl branched fatty acids and saturated hydrocarbons in *botryococcene* producing strain of *Botqococcus braunii*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 28, n. 3, p. 251-256, 2006 2006. ISSN 0137-5881. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238904700008 >.

EROGLU, E.; OKADA, S.; MELIS, A. Hydrocarbon productivities in different Botryococcus strains: comparative methods in product quantification. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 4, Aug 2011. ISSN 0921-8971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293163500015 >.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. El desarrollo de los biocombustibles no debe comprometer la seguridad alimentaria 2013.

GRITTI, F.; PERDU, M.-A.; GUIOCHON, G. Gradient HPLC of samples extracted from the green microalga Botryococcus braunii using highly efficient columns packed with 2.6 μ m Kinetex-C-18 core shell particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1229, p. 148-155, Mar 16 2012. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000301606600019 >.

LARGEAU, C. et al. SITES OF ACCUMULATION AND COMPOSITION OF HYDROCARBONS IN BOTRYOCOCCUS-BRAUNII. **Phytochemistry**, v. 19, n. 6, p. 1043-1051, 1980. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1980KA49600007 >.

LUPI, F. M. et al. INFLUENCE OF NITROGEN-SOURCE AND PHOTOPERIOD ON EXOPOLYSACCHARIDE SYNTHESIS BY THE MICROALGA BOTRYOCOCCUS-BRAUNII-UC-58. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 7, p. 546-550, Jul 1994. ISSN 0141-0229. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994NR96600001 >.

METZGER, P. et al. ALKADIENE-PRODUCING AND BOTRYOCOCCENE-PRODUCING RACES OF WILD STRAINS OF BOTRYOCOCCUS-BRAUNII. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2305-2312, 1985. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985ATF5900032 >.

_____. ALKADIENE-PRODUCING AND BOTRYOCOCCENE-PRODUCING RACES OF WILD STRAINS OF BOTRYOCOCCUS-BRAUNII. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, 1985. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985ATF5900032 >.

METZGER, P.; CASADEVALL, E. LYCOPADIENE, A TETRATERPENOID HYDROCARBON FROM NEW STRAINS OF THE GREEN-ALGA BOTRYOCOCCUS-BRAUNII. **Tetrahedron Letters**, v. 28, n. 34, p. 3931-3934, 1987. ISSN 0040-4039. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987J707400014 >.

METZGER, P.; CASADEVALL, E.; COUTE, A. BOTRYOCOCCENE DISTRIBUTION IN STRAINS OF THE GREEN-ALGA BOTRYOCOCCUS-BRAUNII. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1383-1388, 1988. ISSN 0031-9422. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988N377300028 >.

METZGER, P.; LARGEAU, C. Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 5, Feb 2005. ISSN 0175-7598. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226104200003 >.

MOLINA GRIMA, E. et al. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1–3, p. 231-247, 4/30/ 1999. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165699000784> >.

MONTOGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. Rio de Janeiro: TLC, 2011.

PEREIRA, C. M. P. et al. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, p. 2013-2018, 2012. ISSN 0100-4042.

PEREIRA, J., PINTO DA SILVA, E. & FERRARA, M. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro.: Séries em Biotecnologia, v. 1, 2008.

RAZEGHIFARD, R. Algal biofuels. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1-3, p. 207-219, Nov 2013. ISSN 0166-8595. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000326604900014 >.

SANEPAR. **Companhia de Saneamento do Paraná** 2010.

_____. **Companhia de Saneamento do Paraná** 2013.

SAWAYAMA, S.; INOUE, S.; YOKOYAMA, S. CONTINUOUS-CULTURE OF HYDROCARBON-RICH MICROALGA BOTRYOCOCCUS-BRAUNII IN SECONDARILY TREATED SEWAGE. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 6, Aug 1994. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PB63900017 >.

SAWAYAMA, S. et al. GROWTH OF THE HYDROCARBON-RICH MICROALGA BOTRYOCOCCUS-BRAUNII IN SECONDARILY TREATED SEWAGE. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, Oct 1992. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992JU75200025 >.

SCHMIDELL W., L. U., AQUARONE E. & BORZANI W. **Biotecnologia industrial. Volume II. 1a edição**. . São Paulo: Editora Blucher, 2001.

SIM, S. J.; AN, J. Y.; KIM, B. W. Two-phase extraction culture of Botryococcus braunii producing long-chain unsaturated hydrocarbons. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 3, p. 201-205, Feb 2001. ISSN 0141-5492. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166354000007 >.

SIMON, R. M., D. **Microbiologie Industrielle et Génie Biochimique**. Paris: Masson et Cie Éditeurs, 1970.

SINGH, R. N.; SHARMA, S. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2347-2353, 5// 2012. ISSN 1364-0321. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032112000275> >.

STANBURY, P., WHITAKER, A. & HALL, S. **Principles of fermentation technology. 2ed.** Reino Unido: Elsevier Science Ltd, 1995.

SYDNEY, E. B. et al. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3291-3294, Oct 2011. ISSN 0306-2619. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292808400004 >.

_____. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 5892-5896, Aug 2010. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278035900022 >.

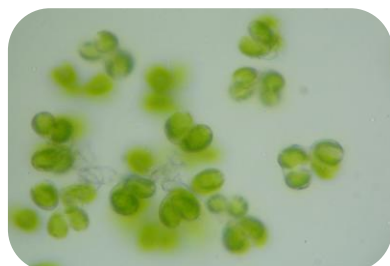
TRAN, H.-L. et al. Statistical Optimization of Culture Media for Growth and Lipid Production of *Botryococcus braunii* LB572. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 2, p. 277-284, Mar-Apr 2010. ISSN 1226-8372. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000277388300011 >.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4021-4028, Jul 2008. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255109900008 >.

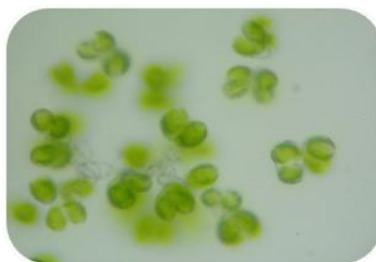
ZHILA, N. O.; KALACHEVA, G. S.; VOLOVA, T. G. Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 1, p. 47-52, Feb 2011. ISSN 0921-8971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287330400006 >.

APÊNDICE

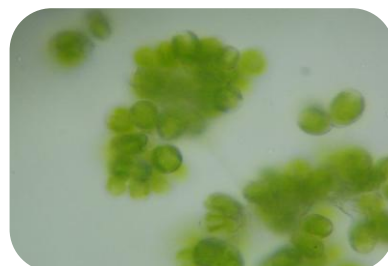
APÊNDICE 1. FOTOGRAFIAS DE MICROSCOPIA DE LUZ DO CULTIVO DE *B BRAUNII* EM FOTOBIOREATOR DURANTE 30 DIAS



inóculo



Dia 1



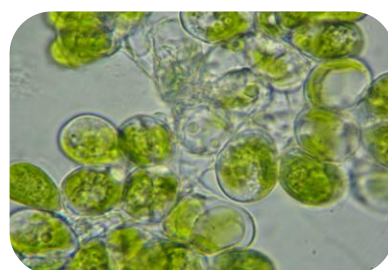
Dia 5



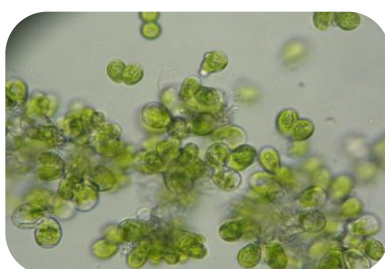
Dia 10



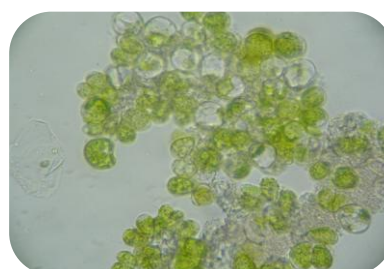
Dia 15



Dia 20



Dia 25



Dia 30