

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS *Scenedesmus* sp. EM
EFLUENTE DE BOVINOCULTURA BIODIGERIDO

CURITIBA

2013

AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS *Scenedesmus* sp. EM
EFLUENTE DE BOVINOCULTURA BIODIGERIDO

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

Orientador: André Bellin Mariano, D.Sc.

CURITIBA

2013

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

O48p

Oliveira, Amanda Cristina de

Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido [recurso eletrônico] / Amanda Cristina de Oliveira. – Curitiba, 2013.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2013.

Orientador: André Bellin Mariano .

1. Biodiesel. 2. Biomassa. 3. Microalgas. 4. Bovinocultura. 5. *Scenedesmus* sp. . I. Universidade Federal do Paraná. II. Mariano, André Bellin. III. Título.

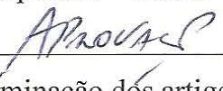
CDD: 665.37

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



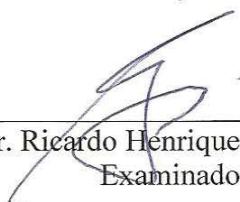
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais- PIPE
Setor de Tecnologia

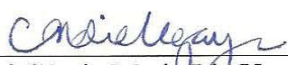
RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos nove dias do mês de agosto de 2013, na Salão Nobre - no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pelo Prof. Dr. Dante Homero Mosca Jr., coordenador do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, a Banca Examinadora para a ducentésima quadragésima sétima defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais. Estiveram presentes no ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, foi constituída pelos professores doutores: Prof. Dr André Bellin Mariano (UFPR), Ricardo Henrique Moreton Godoi (UFPR), Cássia Maria Lie Ugaya (UTFPR). Às 09:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada “**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS *Scenedesmus* sp. EM EFLUENTE DE BOVINOCULTURA BIODIGERIDO.**” Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de argüição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a argüição, a banca decidiu pela  do candidato, (de acordo com a determinação dos artigos 68 e 69 da resolução 65/09 de 09.11.2009).

Curitiba, 09 de agosto de 2013.


Prof. Dr. André Bellin Mariano
Orientador


Prof. Dr. Ricardo Henrique Moreton Godoi
Examinador


Prof. Dr.ª Cássia Maria Lie Ugaya
Examinadora

*A todos aqueles que acreditam que a
persistência é o caminho do êxito.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades diárias de trabalhar, crescer e servir;

Ao meu orientador Dr André Bellin Mariano.

Ao Prof. PhD. José Viriato Coelho Vargas pela oportunidade em fazer parte de uma grande equipe.

A todos os técnicos e colegas de laboratório do NPDEAS, em especial Diego Correa, Beatriz Santos, Cassiana Batista.

Aos Técnicos do Curso de Petróleo e Gás Aline Martins, Nayelli Lopes, Douglas Nardi.

À colega e aluna de iniciação científica Kassiana Ribeiro pelo constante ajuda e apoio.

Às minhas queridas amigas Marisa Scherer, Luiza Shroeder pela amizade, lealdade, companheirismo e trabalho em equipe, em especial à minha amiga Jacqueline por toda ajuda e apoio, fundamental para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos que mesmo indiretamente proporcionaram através de sua existência que mais uma etapa de minha vida acadêmica fosse completada.

Muito obrigada!!!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

RESUMO

As microalgas vêm sendo consideradas como uma fonte alternativa para diversificar as matérias-primas utilizadas para produção de energia renovável. Atualmente, os elevados custos da produção de microalgas são um dos fatores limitantes para sua utilização comercial na produção de biodiesel. A utilização de efluente bovino biodigerido para substituição do meio de cultivo das microalgas aparece como uma alternativa para reduzir os custos da produção de microalgas em plantas comerciais, já que sua composição apresenta parte dos nutrientes necessários para o desenvolvimento das microalgas. Com o objetivo de reduzir o custo da produção de matéria-prima utilizada na síntese de biodiesel selecionou-se viabilizar a produção de microalga *Scenedesmus* sp. em efluente da bovinocultura biodigerido como substituto do meio de cultivo sintético *CHU*. Desta forma buscou-se alcançar uma produtividade de biomassa e lipídios igual ou superior ao do meio sintético *CHU*, utilizando cinco concentrações de efluente de bovino cultura (10%, 15%, 20%, 25% e 30%) diluído em água. Para isso os experimentos foram realizados em balão Erlenmeyer com capacidade para 2 L, os cultivos foram mantidos em ambiente climatizado com temperatura controlada em 22 ± 2 °C, a iluminação de aproximadamente $111,5 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes, com fotoper\u00edodo 12:12, aera\u00e7\u00e3o constante realizada por bombas de ar, com fluxo de ar de aproximada 0.076 L.s^{-1} por litro de cultivo. Os cultivos iniciaram com aproximadamente $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e foram mantidos durante um per\u00edodo de 10 dias. A produtividade di\u00e1ria dos cultivos foi avaliada a partir da determina\u00e7\u00e3o da biomassa seca e teor de lip\u00eddios totais no \u00faltimo dia dos cultivos. A maior produtividade de biomassa seca em rela\u00e7\u00e3o ao meio sint\u00e9tico *CHU*, correspondeu ao experimento realizado com a condi\u00e7\u00e3o de 30% do efluente de bovinocultura biodigerido, atingindo $0,48 \text{ g.L}^{-1}$. Com rela\u00e7\u00e3o ao teor lip\u00eddico, o melhor resultado obtido foi com o experimento contendo 15% efluente com 88 mg.L^{-1} . Tamb\u00e9m foram realizadas an\u00e1lises de DBO, DQO, nitrog\u00eanio total, fosforo e pot\u00e1ssio a fim de avaliar a capacidade da microalga na remo\u00e7\u00e3o desses nutrientes, para os cultivos com 30% de efluente houve uma redu\u00e7\u00e3o de 22% a 100%, indicando efici\u00eancia na depura\u00e7\u00e3o do efluente como um benef\u00edcio adicional ao processo de produ\u00e7\u00e3o de biomassa de microalgas. A an\u00e1lise da composi\u00e7\u00e3o de \u00e1cidos graxos da *Scenedesmus* sp. cultivada no meio *CHU* e com 30% de efluente consistiu respectivamente em 31% e 36% de \u00e1cidos graxos saturados, 45% e 42% de monoinsaturados e 14% e 17% de poli-insaturados, sendo os teores de insaturados obtidos no \u00f3leo de microalga menores que o encontrado no \u00f3leo de soja e a canola. Esse trabalho apresenta grande potencial em termos econ\u00f4micos e ambientais, pois o cultivo de microalgas com efluente de bovinocultura biodigerido mostrou-se uma \u00f3tima op\u00e7\u00e3o para redu\u00e7\u00e3o dos custos na produ\u00e7\u00e3o de biomassa microalgal e uma alternativa na redu\u00e7\u00e3o da carga org\u00e2nica no tratamento desses efluentes.

Palavras chaves: Biodiesel, *Scenedesmus* sp., efluente, biomassa.

ABSTRACT

Microalgae are being considered as an alternative source to diversify the raw materials used to produce renewable energy. Currently, the high production cost of microalgae is one of the limiting factors for their commercial use in biodiesel production. The use of biodigested bovine effluent for replacement of the culture medium of microalgae appears as an alternative to reducing the costs of microalgae production in commercial plants, since it has the nutrient composition necessary for the growth of microalgae. Aiming to reduce the cost of production of the raw material used in the synthesis of biodiesel it was selected to enable production of microalgae *Scenedesmus* sp. in biodigested effluent from cattle as a substitute for synthetic culture medium *CHU*. Thus we tried to achieve a productivity of biomass and lipids equal to or higher than the synthetic media *CHU* using five bovine culture (10%, 15%, 20%, 25% and 30%) effluent concentration diluted in water. For this, the experiments were performed in Erlenmeyer flask with a capacity of 2 L, cultures were maintained in air-conditioned environment with controlled temperature at 22 ± 2 °C, lighting of approximately 111.5 micromol photons.m⁻².s⁻¹ obtained using fluorescent lamps with a photoperiod 12:12 h, constant aeration maintained with air pumps, with air flow of approximately 0.076 Ls⁻¹ per liter of culture. The cultures initiated with approximately 0.1 gL⁻¹ biomass and were maintained for a period of 10 days. The daily productivity of cultivation was assessed by determining the dry weight and total lipid content in the last day of the cultivation. The highest dry biomass productivity compared with the synthetic *CHU* media, was obtained in the experiment with 30% dilution of the biodigested effluent, reaching 0.48 gL⁻¹. With respect to lipid content, the best result was obtained in the experiment with 15% effluent with 88 mg L⁻¹. Effluent samples were analyzed for BOD, COD, total nitrogen, phosphorus and potassium in order to assess the ability of microalgae for removal of these nutrients for cultivation with 30% of wastewater, reductions between 22% and 100% were obtained, indicating efficient removal from the effluent as an additional benefit to the process microalgal biomass production. Analysis of fatty acid composition of *Scenedesmus* sp. *CHU* and grown in medium with 30% effluent comprised respectively 31% and 36% of saturated fatty acids, 45% and 42% monounsaturated, 14% and 17% poly-unsaturated, with the levels of unsaturated oil obtained in microalgae smaller than that found in soybean oil and canola. This work presents great potential in economic and environmental terms. The cultivation of microalgae with biodigested dairy effluent proved to be a great option for cost reduction in the production of microalgal biomass and an alternative the reduction of the organic load in the treatment of these effluents.

Keywords: Biodiesel, *Scenedesmus* sp., effluent, cattle.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIGLICERÍDIOS.....	23
FIGURA 02 – MICROSCOPIA ÓPTICA (AUMENTO DE 40 VEZES) DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp.....	23
FIGURA 03 – SISTEMA DE CULTIVO A CÉU ABERTO “ <i>RACEWAY PONDS</i> ”.....	25
FIGURA 04 – CULTIVO DE MICROALGAS EM SISTEMA FECHADO: A – KLÖTZE, SAXONY - ANHALT; B – NPDEAS.....	26
FIGURA 05 – FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO NPDEAS.....	27
FIGURA 06 – REAÇÕES DE FOTOSSÍNTESE.....	29
FIGURA 07 – FLUXOGRAMA DE OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ESTRATÉGIAS DE TRABALHO.....	37
FIGURA 08 – BIODIGESTOR ANAERÓBICO DO CTP DE CASTROLANDA (CASTRO – PR).....	39
FIGURA 09 – CULTIVOS COM MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp. EM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA.....	40
FIGURA 10 – FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO DA METODOLOGIA DE HARTMAN E LAGO (1973).....	44
FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL...	47
FIGURA 12 – CURVA DE CRESCIMENTO DE UMA CULTURA MICROALGAL.....	49
FIGURA 13 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA DO CULTIVO EM MEIO <i>CHU</i>	50
FIGURA 14 – PRODUTIVIDADE DIÁRIA DE BIOMASSA SECA EM MEIO <i>CHU</i>	52
FIGURA 15 – ASPECTOS FÍSICO DOS MEIOS DE CULTIVOS: SINTÉTICO (<i>CHU</i>) E ALTERNATIVO (10%, 15%, 20%, 25% E 30% DE EFLUENTE DE BOVINOCULTURA).....	53

FIGURA 16 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA 2º ETAPA DE EXPERIMENTO COM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA COM DILUIÇÕES 10% (A), 15% (B), 20% (C).....	54
FIGURA 17 – PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS TOTAIS NA BIOMASSA MICROALGAL CULTIVADA EM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA.....	56
FIGURA 18 – PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS OBTIDOS NOS CULTIVOS COM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA.....	57
FIGURA 19 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA 2º ETAPA DE EXPERIMENTO COM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA COM DILUIÇÕES 20% (A), 25% (B), 30% (C).....	58
FIGURA 20 – PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS TOTAIS NA BIOMASSA MICROALGAL CULTIVADA EM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA.....	60
FIGURA 21 – PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS OBTIDOS NOS CULTIVOS COM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA.....	61
FIGURA 22 – ASPECTO VISUAL DO MEIO DE CULTIVO COM EFLUENTE (30%) – (A) ANTES DE INOCULAR; (B) DURANTE O CULTIVO; (C) APÓS RECUPERAR A BIOMASSA.....	63
FIGURA 23 – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDIOS DA MICROALGA CULTIVADA EM MEIO <i>CHU</i> E 30% DE EFLUENTE.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – PRODUTIVIDADE DE BIODIESEL EM DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS.....	22
TABELA 02 – TEOR LIPÍDICO ENCONTRADO EM DIFERENTES ESPÉCIES DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i>	24
TABELA 03 – PRODUÇÃO DIÁRIA DE DEJETOS POR ANIMAL.....	35
TABELA 04 – COMPOSIÇÃO EM MEIO <i>CHU</i>	38
TABELA 05 – CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTE NO MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO.....	48
TABELA 06 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA DA MICROALGA CULTIVADA EM MEIO <i>CHU</i>	51
TABELA 07 – PORCENTAGEM DE EFLUENTE ADICIONADO AO MEIO ALTERNATIVO.....	52
TABELA 08 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA DOS CULTIVOS PREPARADOS COM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA DO 0 AO 10º DIA EM g.L ⁻¹	55
TABELA 09 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA DOS CULTIVOS PREPARADOS COM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA DO 0 AO 10º DIA g.L ⁻¹	59
TABELA 10 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EFLUENTE COLETADO E DILUÍDO EM 30%.....	62
TABELA 11 – DEPURAÇÃO DO EFLUENTE DE BOVINOCULTURA.....	63
TABELA 12 – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NA BIOMASSA DE MICROALGAS DO GÊNERO <i>SCENDESMUS</i> CULTIVADAS EM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE COM 30% EM COMPARAÇÃO A RELATOS DA LITERATURA.....	64
TABELA 13 – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDIOS DA MICROALGA CULTIVADA EM MEIO <i>CHU</i> E 30% DE EFLUENTE	

	COMPARADA	COM	OUTRAS	MATÉRIAS-
TABELA 14 – PRIMAS.....				66
	CUSTO DO MEIO DE CULTIVO <i>CHU</i> E EFLUEUNTE DE			
	BOVINOCULTURA.....			67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados;
AGPI – Ácidos graxos poliinsaturado;
AGS – Ácidos graxos saturados;
ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis;
ATP – Adenosina Trifosfato;
CEPPA - Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos;
CONAMA – Conselho nacional do Meio Ambiente;
CTP – Centro de treinamento de pecuarista;
DBO – Demanda bioquímica de oxigênio;
DQO – Demanda química de oxigênio;
ed – edição;
FBR – Fotobiorreator;
MAPA – Ministério da agricultura pecuária e abastecimento;
NPDEAS – Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Autosustentável;
pH – potencial hidrogênico;
PVC – policloreto de vinila;
rpm – Rotação por minuto;
sp – espécie;
UFPR – Universidade Federal do Paraná.

LISTA DE SÍMBOLOS

A_1 – concentração de nutrientes do meio clarificado;

A_2 – concentração de nutrientes do efluente;

B – Biomassa seca (g.L^{-1});

C – biomassa seca (g);

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius;

g – Grama;

ha – Alqueire (10.000 m^2);

L – Litro;

Lux – Iluminamento (lx);

L_1 – massa do *vial* vazio (g);

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

mg – Miligrama;

m^3 – Metro cúbico;

P_1 – Massa papel filtro úmido (g);

P_2 – Massa papel filtro seco (g);

P_3 – Massa do papel de filtro com biomassa seca;

t – Tempo;

U – Umidade (g);

V – Volume de amostra filtrada (mL);

μg – Micrograma;

% – Por cento.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 BIODIESEL.....	21
2.1.1 Matéria-prima para produção de biodiesel.....	22
2.1.2 Microalgas como matéria prima para produção de biodiesel.....	22
2.1.2.1 Microalgas <i>Scenedesmus</i> sp.	24
2.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGA	25
2.2.1 Produção de microalgas no NPDEAS – UFPR.....	27
2.3 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE MICROALGAS.....	28
2.3.1 Temperatura.....	29
2.3.2 Iluminação	29
2.3.3 Fotoperíodo.....	30
2.3.4 Aeração e agitação.....	30
2.3.5 pH	31
2.3.6 Nutrientes.....	32
2.4 MEIOS DE CULTIVO.....	34
2.4.1 Meio sintético para cultivo de microalgas.....	35
2.4.2 Meio alternativo para cultivo de microalgas	35
2.4.3 Meio alternativo com efluente de bovinocultura biodigerido	36
3 DESAFIOS E OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.1.1 Objetivos específicos.....	38

4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 MICROALGA	39
4.2 MEIO DE CULTIVO	39
4.2.1 Meio <i>CHU</i>	39
4.2.2 Meio com efluente de bovinocultura biodigerido	40
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	40
4.3.1 Produção de inóculo	41
4.4 ANÁLISES DOS CULTIVOS	41
4.4.1 Biomassa seca.....	42
4.4.2 Lipídios totais	42
4.5 DEPURAÇÃO DO EFLUENTE.....	43
4.5.1 Análise físico-química.....	44
4.6 ESTERIFICAÇÃO	44
4.6.1 Análise cromatográfica.....	45
4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO BOVINO BIODIGERIDO.....	48
5.2 CULTIVO DA MICROALGA EM MEIO <i>CHU</i>	49
5.3 DEFINIÇÃO DO PERÍODO DE CULTIVO DAS MICROALGAS EM MEIO <i>CHU</i>	51
5.4 CULTIVOS COM MEIO ALTERNATIVO.....	52
5.4.1 Porcentagem de efluente utilizado no cultivo	52
5.4.2 Primeira etapa - Meio alternativo com 10%; 15% e 20% de efluente	53
5.4.2.1 Produção de biomassa	53
5.4.2.2 Produção de lipídios	55
5.4.2.3 Segunda etapa - Meio alternativo com 20%; 25% e 30% de efluente	57

5.4.2.4 Produção de Biomassa.....	58
5.4.2.5 Produção de lipídios	59
5.5 CAPACIDADE DAS MICROALGAS EM DEPURAR O EFLUENTE DE BIODIGESTOR.....	61
5.5.1 Análise do efluente bovino biodigerido	61
5.5.2 Análise do efluente do cultivo de microalgas	62
5.6 PERFIL LIPÍDICO DAS MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO <i>CHU</i> E EFLUENTE	64
6 CONCLUSÕES.....	68
6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	68
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	79

1 INTRODUÇÃO

Devido ao excelente potencial biotecnológico da biomassa de microalga, para a produção de compostos de alto valor comercial nas indústrias alimentícias, químicas e farmacêuticas, o desenvolvimento de pesquisas com microalgas tem aumentado (DERNER *et al.*, 2006).

Dentro das diversas aplicações biotecnológicas que possuem as microalgas, estudos recentes têm explorado seu uso para obtenção de biocombustíveis (CHISTI, *et al.*, 2007), pois, a elevada dependência energética e a crescente preocupação com questões ambientais, envolvendo os problemas do aquecimento global e as alterações climáticas, têm levado a procura intensiva de fontes alternativas de energias renováveis (BOROWITZKA, 1995; CHEN *et al.*, 2009).

As microalgas constituem alternativas interessantes para produção de biocombustíveis, devido à sua elevada eficiência fotossintética, duplicação da biomassa em um intervalo de tempo relativamente curto, utilizando um espaço físico menor do que as plantas oleaginosas, por exemplo, não são necessárias áreas aráveis ou água potável, não competindo portanto com a agricultura, maior sequestro de CO₂/ha em comparação com qualquer outra oleaginosa e à sua produção não ser sazonal permitindo a obtenção de matéria-prima continuamente durante todo o ano, fatores esses que permitem atingir elevada produção em óleo.

Estas vantagens permitem obter uma produção média de biodiesel de microalgas, de 100 a 200 vezes superior ao obtido com sementes de plantas oleaginosas. Apesar de promissora a produção de lipídios de microalgas para biocombustíveis, em escala industrial, ainda tem altos custos (CHISTI *et al.*, 2007).

Do valor total do custo da produção de biomassa, aproximadamente 35% está relacionado com o gasto para a produção do meio de cultivo (GRIMA *et al.*, 2003).

Assim, este trabalho procurou encontrar em um abundante resíduo da agropecuária, sem valor econômico, um substituto para os meios de cultivos sintéticos e assim, reduzir o custo da produção de lipídios de microalga para síntese de biodiesel.

1.1 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em seis seções:

- Primeira sessão: apresenta uma breve introdução e organização do trabalho;
- Segunda sessão: revisão bibliográfica sobre os temas abordados neste trabalho desenvolvido;
- Terceira sessão: busca elucidar os desafios e objetivos pretendidos na elaboração do projeto;
- Quarta sessão: são apresentadas as metodologias e materiais utilizados para a execução dos experimentos;
- Quinta sessão: apresenta a obtenção dos resultados, juntamente com as discussões;
- Sexta sessão: são apresentadas as conclusões da pesquisa e as considerações para futuros trabalhos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIODIESEL

O biodiesel é definido como um biocombustível derivado de biomassa renovável que pode substituir total ou parcialmente os combustíveis de origem fóssil utilizados em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia e pode ser usado em qualquer motor diesel sem adaptação do mesmo, é biodegradável e renovável (DEMIRBAS, 2008; ANP, 2012).

Tecnicamente o biodiesel é um combustível composto de aquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, derivados de gorduras de origem vegetal ou animal, e deve atender a especificação contida no Regulamento Técnico nº 4/2012 da Resolução ANP Nº 14, de 11/5/2012.

O biodiesel pode ser usado puro ou misturado ao diesel convencional em diversas proporções, a mistura de 5% de biodiesel ao Diesel de petróleo, que atualmente é o percentual mínimo obrigatório comercializado em território nacional, é chamada de B5 e assim sucessivamente, até o biodiesel puro, denominado B100 (SHAHID; JAMAL, 2008).

Com a escassez das reservas e a busca pela diminuição da dependência em relação aos combustíveis fósseis, o biodiesel vem ganhando maior importância como uma alternativa capaz de substituir total ou parcialmente os combustíveis de origem fóssil, pois apresenta vantagens significativas tais como: benefícios socioeconômicos e ambientais relacionados à redução da emissão de diversas substâncias prejudiciais, encontradas nas emissões dos combustíveis de origem fóssil, como dióxido de carbono, monóxido de carbono, hidrocarbonetos aromáticos, óxidos de enxofre e fuligens (FANGRUI; HANNA, 1999; MONYEM *et al.* 2000).

Alguns problemas inerentes ao biodiesel estão relacionados como o alto custo da sua produção quando comparado com a produção do diesel comum e de outros combustíveis fósseis, a produção de maior quantidade de óxidos de nitrogênio (NO_x), que são prejudiciais à saúde (BAN-WEISS *et al.*, 2008; ANP, 2012).

Apesar das vantagens ambientais que o biodiesel apresenta para ser uma alternativa viável, deve garantir ganho energético, competitividade econômica e potencial de ser produzido em grandes quantidades sem ameaçar a produção de bens alimentares (HILL *et al.*, 2006).

2.1.1 Matéria-prima para produção de biodiesel

Entre as matérias-primas utilizadas para obtenção de biodiesel, destacam-se plantas oleaginosas (mamona, soja, algodão, girassol, dendê, amendoim, entre outras) óleos vegetais residuais, gorduras e sebos animais (KOWALSKI, 2010).

A escolha da matéria-prima é de grande importância no processo de produção do biodiesel, caso seja produzido em quantidades suficiente para atender a demanda energética, uma vez que representa 50 a 85% do custo total do biodiesel e o impacto significativo que gera na produção de alimentos. Assim, levando em conta a disponibilidade, o rendimento, a não utilização de solos destinados a agricultura, as microalgas apresentam grande potencial como matéria-prima da produção de biodiesel (RAMOS *et al.*, 2003; TEIXEIRA; MORALES, 2006; SUAREZ *et al.*, 2009).

2.1.2 Microalgas como matéria prima para produção de biodiesel

As microalgas são organismos pertencentes ao reino vegetal que compreendem um grupo muito diverso de organismos fotossintetizantes, são microscópicos, unicelulares, presentes tanto nos meios aquáticos (doce ou salino), como no solo. Fisiologicamente podem ser procarióticos ou eucarióticos, podem variar em tamanho, morfologia e outras características (HOEK *et al.* 1995). São compostas basicamente de proteínas, carboidratos, vitaminas e lipídios (SPOLAORE *et al.*, 2006).

A biomassa de microalga pode ser destinada às mais diversas aplicações, tais como a produção de lipídios, corantes, enzimas, antibióticos, carboidratos e vitaminas (BECKER, 1994; BERTOLDI *et al.*, 2008).

O óleo presente em células de microalgas apresenta algumas propriedades físicas e químicas similares às dos óleos vegetais, e, portanto, pode ser considerada uma matéria-prima potencial para a produção de biodiesel (CHISTI *et al.*, 2007).

Entre as principais vantagens de utilizar microalgas na produção de biodiesel quando comparadas a outras fontes de matéria-prima está, o uso de áreas impróprias para a agricultura; maior capacidade de fixação de dióxido de carbono (CO₂), não sazonal, maior síntese de lipídios; possibilidade de utilização de águas impróprias para o consumo humano (efluentes e águas residuais), possibilidade de serem cultivadas em fotobiorreatores compactos (CHISTI *et al.*, 2007; RODOLFI *et al.*, 2009).

A biomassa de microalgas apresenta grande potencial para ser utilizada como matéria-prima na produção de biodiesel, pois é rica em lipídios, o rendimento de óleo por hectare em algumas espécies de microalgas é consideravelmente maior do que as culturas oleaginosas tradicionais, como mostra a TABELA 01 (MATA *et al.*, 2010).

TABELA 01 – PRODUTIVIDADE DE BIODIESEL EM DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS

MATÉRIA-PRIMA	TEOR DE ÓLEO (%)	PRODUTIVIDADE EM ÓLEO (L.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)	ÁREA NECESSÁRIA (m ² .ano ⁻¹ .kg ⁻¹)	PRODUTIVIDADE EM BIODIESEL (kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
Pinhão-manso	28	741	15	656
Canola	41	1.190	12	862
Girassol	40	1.070	11	946
Mamona	48	1.307	9	1.156
Palma	36	5.366	2	4.747
	10	19.566	0,6	17.309
Microalga	30	58.700	0,2	51.927
	50	97.800	0,1	86.515
	70	136.900	0,1	121.104

FONTE: ADAPTADO DE MATA *et al.*, 2010.

A TABELA 01 indica que mesmo uma microalga com reduzido teor de óleo permitirá produzir uma quantidade de biodiesel, aproximadamente 3 vezes superior à palma, cultura rica em óleo, e amplamente explorada para a produção de biodiesel.

O óleo contido nas microalgas, depois de extraído, pode ser convertido em biodiesel por transesterificação (FIGURA 01), tecnologia mais utilizada no processamento de óleos vegetais para produção de ésteres graxos (JANAUN; ELLIS, 2010).

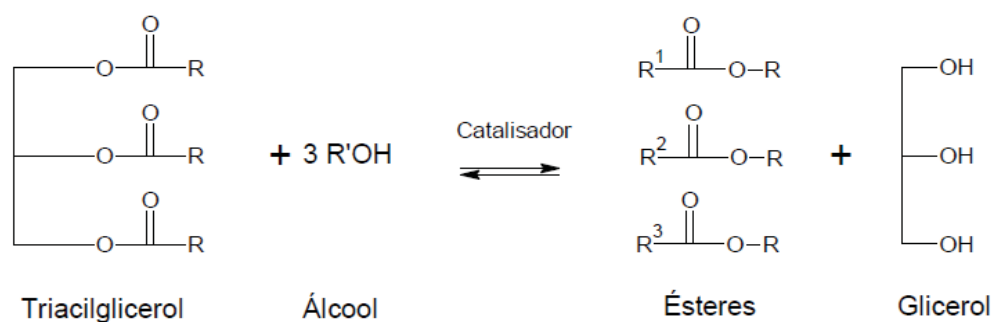


FIGURA 01 – REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIGLICERÍDIOS

2.1.2.1 Microalgas *Scenedesmus* sp.

As microalgas *Scenedesmus* sp., (FIGURA 02), muito comum no plâncton de águas doces e menos frequente em águas salobras, são clorofiladas, unicelulares e uninucleadas, são pertencentes à família Scenedesmaceae, gênero *Scenedesmus*.

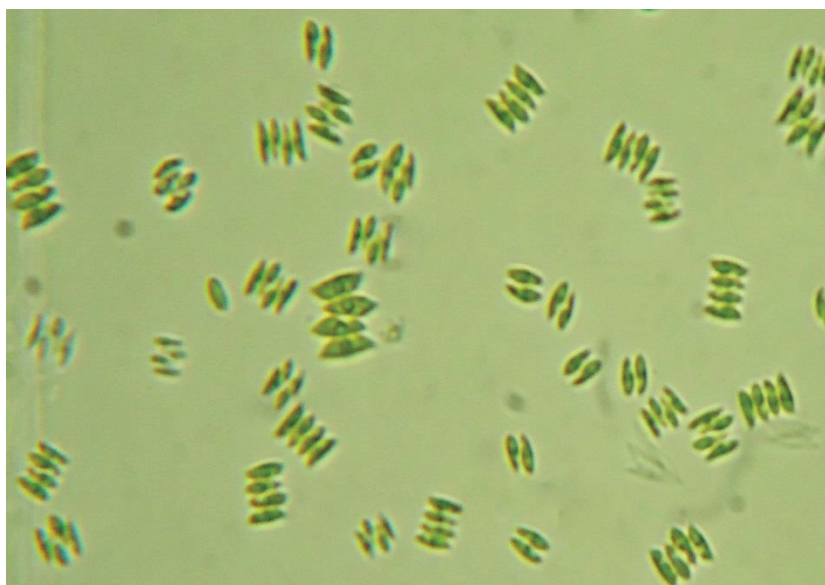


FIGURA 02 – MICROSCOPIA ÓPTICA (AUMENTO DE 40 VEZES) DA MICROALGA *Scenedesmus* sp.

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

Porém, em certas circunstâncias as células podem não estar organizadas em colônias, o que acontece em cultivos sob aeração (EGAN; TRAINOR, 1989)

O teor de lipídios das microalgas *Scenedesmus* sp. podem variar de 11 a 20 %, em cultivos padrões, entretanto esse teor de lipídios pode ser superior a 70% em meio de cultivo otimizado (TABELA 02).

TABELA 02 – TEOR LIPÍDICO ENCONTRADO EM DIFERENTES ESPÉCIES DA MICROALGA *Scenedesmus*

MICROALGA	LIPÍDIOS (%)	FONTE
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11– 55	Mata <i>et al.</i> , 2010
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9 – 18,4	
<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6 – 21,1	
<i>Scenedesmus</i> sp. DM ^a	21,1	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16 – 40	Becker, 1994
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	12	Sánchez <i>et al.</i> , 2008
<i>Scenedesmus rubescens</i> ^b	73	Matsunaga, 2009

NOTA – ^a microalga de água doce; ^bmicroalga marinha

2.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGA

A obtenção de biomassa e de produtos metabólicos das microalgas podem influenciados pelas interações entre fatores biológicos, físicos e químicos (FALKOWSKI; RAVEN, 1997). Os fatores biológicos estão relacionados às taxas metabólicas características da espécie cultivada, e a influência de outros microrganismos sobre o crescimento microalgal. Os principais fatores físico-químicos são, iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes no meio (GUILLARD 1975; RICHMOND, 2004).

A produção de biomassa de microalgas pode ser realizada em diversos sistemas, com volume variando desde mililitros até bilhões de litros.

Para fins de pesquisa ou manutenção de coleção de microalgas, são realizados em ambientes climatizados que permite maior controle dos fatores que influenciam no crescimento, em pequenos volumes. Já os sistemas de cultivo em escala industrial

podem ser realizados em lagoas abertas, conhecidos como “*raceway ponds*”, ou em sistemas fechados, chamados de fotobiorreatores (LOURENÇO, 2006; ERIKSEN, 2008; SOARES 2008).

As lagoas ou tanques abertos (FIGURA 03) são os mais utilizados na produção comercial de microalgas, devido ao seu baixo custo de construção e operação em relação aos fotobiorreatores. A maior vantagem de utilizar os tanques ou lagoas abertas consiste na simplicidade da sua estrutura, com uma produção de biomassa de baixo custo e gestão operacional. No entanto, os sistemas abertos apresentam algumas desvantagens, tais como, evaporação acentuada, variação da temperatura, salinidade, pH, baixa eficiência na absorção de CO₂, alta taxa de contaminação por microrganismos, entre outros, o que faz com que a produtividade seja muito reduzida comparada aos fotobiorreatores (ERIKSEN, 2008; SCHENK *et al.*, 2008).

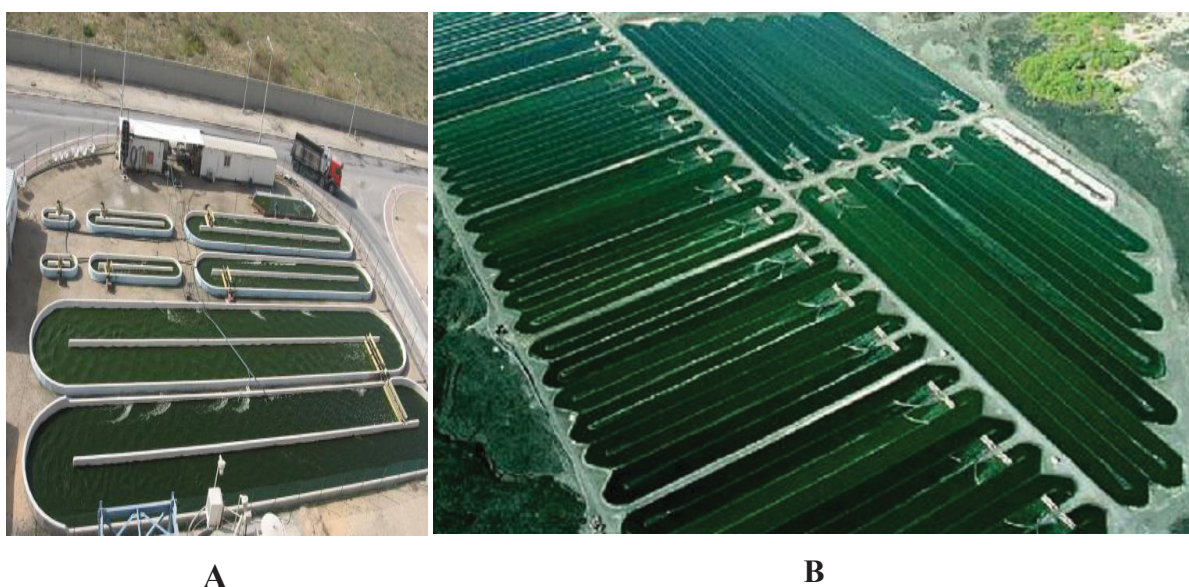


FIGURA 03 – SISTEMA DE CULTIVO A CÉU ABERTO “*RACEWAY PONDS*”
FONTE: A – SEAMBIOTIC LTD, 2013; B –; MUÑOZ e GUIEYSSE, 2006.

Os fotobiorreatores, (FIGURA 04), construídos a partir de tubos de vidro, de plástico, policarbonato, dentre outros, permitindo controlar as condições de cultivo necessárias para manter uma maior variedade de espécies, manter a cultura sem contaminações, permitem ajustar fatores que potencializam o crescimento e acumulação de produtos de interesse comercial como, pH, concentração de gases, temperatura,

nutrientes, redução da área superficial quando comparado com os tanques abertos. Essas vantagens permitem alcançar uma maior produtividade de biomassa em comparação aos sistemas abertos. Por outro lado, os elevados custos de construção dos fotobiorreatores têm constituído uma grande limitação à aplicação destes sistemas em plantas comerciais (ERIKSEN, 2008; SCHENK *et al.*, 2008; PACKER, 2009).

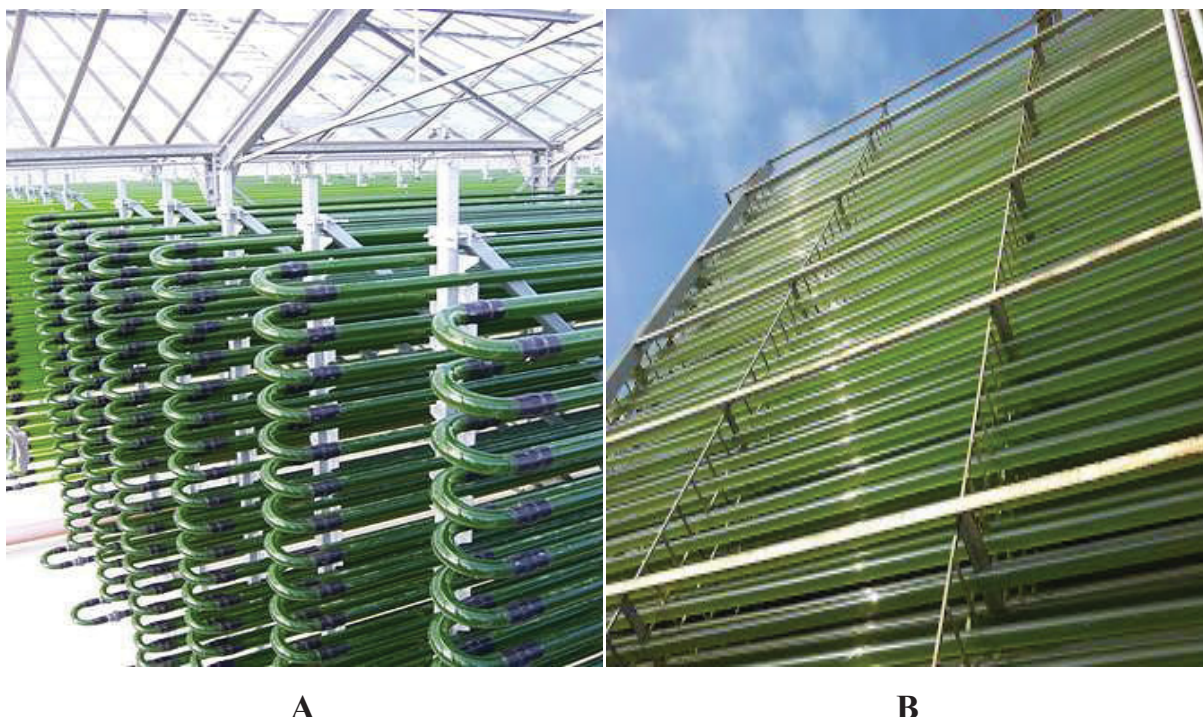


FIGURA 04 – CULTIVO DE MICROALGAS EM SISTEMA FECHADO: A – KLÖTZE, SAXONY-ANHALT; B – NPDEAS
FONTE: (A) UMWELT (2013); (B) O AUTOR (2013)

2.2.1 Produção de microalgas no NPDEAS – UFPR

O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) da Universidade Federal do Paraná desenvolveu um fotobiorreator (FBR) tubular compacto para cultivo de microalgas com objetivo de produção de biomassa e óleo a ser utilizado na produção de biodiesel.

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

O processo produtivo, conforme apresentado na FIGURA 05, inicia-se com a produção de microalgas em um fotobiorreator compacto, após o período de cultivo vêm etapas de colheita, recuperação da biomassa, secagem, extração de lipídios e estes seguem para a produção do biodiesel.

Os cultivos são inoculados com meio de cultivo sintético, *CHU* (CHIU *et al.*, 2009), e a espécie de microalgas cultivada é gênero *Scenedesmus*. Uma das dificuldades para viabilizar essa tecnologia é o alto custo da composição do meio de cultivo sintético, desta forma, para o NPDEAS é de grande importância à busca por um meio de cultivo alternativo de modo a reduzir o custo da produção.

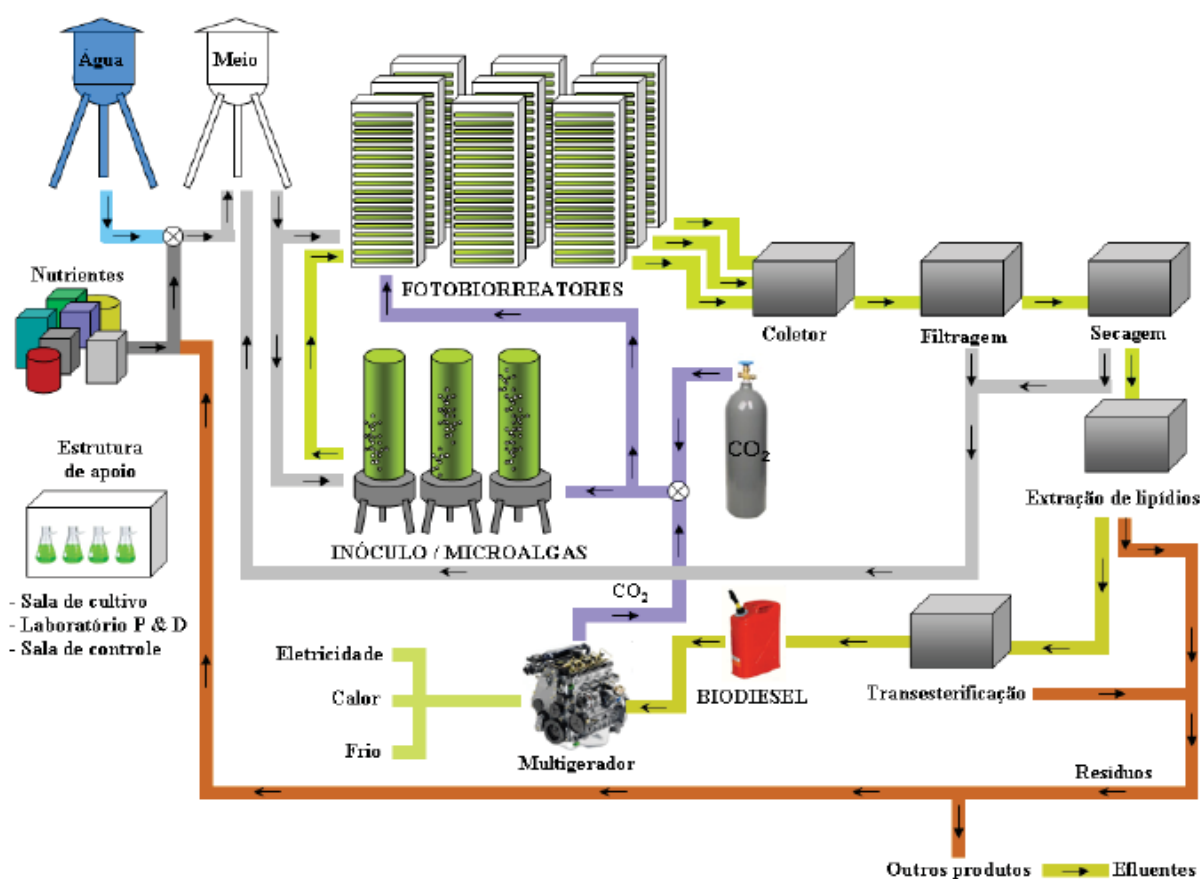


FIGURA 05 – FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO NPDEAS
 FONTE: ADAPTADO DE SATYANARAYANA *et al.*, 2010

2.3 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE MICROALGAS

Independente do sistema utilizado para produzir microalgas, diversos fatores podem influenciar a concentração e a composição da biomassa microalgal. Estes

fatores são principalmente a intensidade luminosa, temperatura, pH, aeração, concentração de nutrientes e concentração de CO₂ (CHISTI *et al.*, 2007).

Para os sistemas abertos, tipo lagoas, que representam o ambiente natural, podem ser controlados apenas as concentrações de nutrientes e aeração. Porém, em laboratórios e fotobiorreatores, a temperatura e luminosidade também podem ser controladas (LEMOS, 2012).

2.3.1 Temperatura

Um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos é a temperatura. Há perigo em se fazer generalizações da temperatura, pois esta varia de espécie para espécie, ainda que pertencentes à mesma região. Temperaturas constantes são desejáveis, pois proporcionam mais estabilidade nos experimentos e nas operações de rotinas, permitindo maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies. Para salas de cultivos, temperaturas constantes são alcançadas por meio de sistemas de refrigeração, porém, para grandes sistemas a dificuldade de se manter a temperatura constante é maior (LOURENÇO, 2006).

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

2.3.2 Iluminação

A iluminação é um dos fatores que requer atenção especial para o êxito dos cultivos. A condição ótima para o crescimento das microalgas dependerá da intensidade da luz, do comprimento de onda e duração aos quais as células estão expostas. Em

cultivos de pequena escala, recomenda-se o uso de luz artificial, uma vez que pode ser controlada de acordo com as necessidades das culturas. As lâmpadas mais comumente utilizadas são fluorescentes do tipo luz do dia, por simular comprimentos de ondas de 350 a 700 nm, necessários para a fotossíntese.

A fotossíntese ocorre por meio de um conjunto de reações (FIGURA 06), que podem ser agrupadas em duas etapas interligadas: fotoquímica - dependente de luz, e química - independente de luz, mas dependente dos produtos formados na etapa fotoquímica (LOPES, 2004).

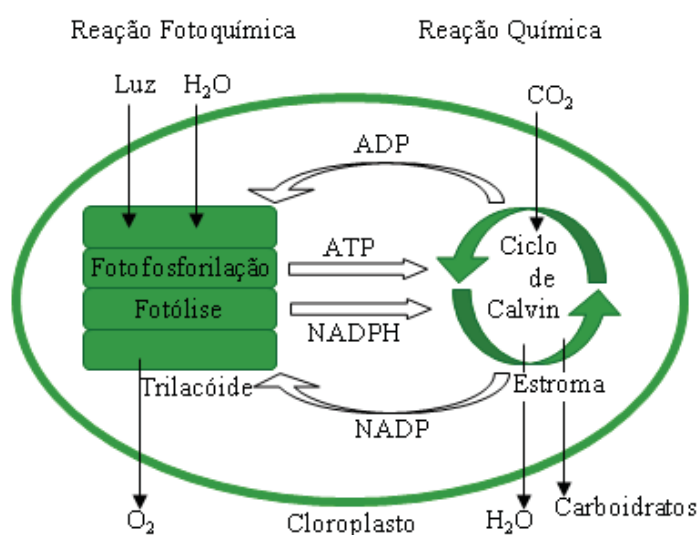


FIGURA 06 – REAÇÕES DE FOTOSSÍNTESE
 FONTE: MODIFICADO DE LOPES (2004)

2.3.3 Fotoperíodo

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

2.3.4 Aeração e agitação

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

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

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

2.3.5 pH

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

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

O uso de tampões permite uma variação discreta no pH (0,3), entretanto para sistemas de produção de microalgas de grande escala o uso de tampões aumenta o custo

da produção. Uma forma de regular as variações de pH é a aeração dos cultivos, com bombeamento de ar atmosférico (0,03% de CO₂) ou com ar enriquecido de CO₂, em concentração ideal para a espécie cultivada (LOURENÇO, 2006).

2.3.6 Nutrientes

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

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

O carbono, por ser o componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídios, entre outros), é o elemento necessário em maiores concentrações para as algas, a proporção do consumo de carbono, nitrogênio e fósforo é de 106:16:1, para algas marinhas.

Dependendo da velocidade de crescimento das microalgas, pode ocorrer um rápido consumo do carbono disponível, tornando-se um fator limitante da multiplicação celular, além da significativa elevação do pH do cultivo para valores superiores a 9, caso o meio de cultivo não seja tamponado (LOURENÇO, 2006).

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

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

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

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

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

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

A deficiência de fósforo no meio, afeta o perfil lipídico da célula com mais intensidade do que afeta a quantidade de lipídios produzidos por biomassa seca. Como

o fósforo faz parte dos fosfolipídios, uma limitação deste nutriente direciona o metabolismo da microalga para a produção de triglicerídeos saturados e lipídios neutros, e ainda causa uma diminuição de ácidos graxos poliinsaturados (SIRON *et al.*, 1989).

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

A limitação de ferro no meio pode limitar o crescimento, e alterar a concentração de clorofila. Em cultivos da microalga *Cylindrotheca closterium* com concentração de 10 nmol.L⁻¹ de ferro, o crescimento celular foi reduzido em 60%, em relação aos cultivos com 20 nmol.L⁻¹ e 11,7 μmol.L⁻¹ de ferro, para estas concentrações não ocorre variações significativas. Entretanto a taxa de clorofila *a* nas células apresentou variações significativas, proporcionais à variação do ferro no meio (PANKOWSKI; MCMINN, 2009).

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

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

2.4 MEIOS DE CULTIVO

Os meios de cultivo utilizados são desenvolvidos para obter crescimento ótimo das microalgas, com a finalidade de isolar, manter e propagar as microalgas

O meio pode ser sólido ou líquido, o meio sólido contém agentes solidificantes, como o ágar, e é geralmente utilizado para o isolamento, o meio líquido é utilizado para a manutenção das cepas e para produção de biomassa (JACINAVICIUS *et al.*, 2006).

2.4.1 Meio sintético para cultivo de microalgas

Os meios sintéticos são compostos por macronutrientes (C, N, P, S) e micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Mo, Co), algumas microalgas também necessitam de concentrações de vitaminas (complexo B) no meio (GUILLARD, 1975).

Os custos com nutrientes sintéticos para elaboração dos meios de cultura representam aproximadamente 35% do valor total para a produção de biomassa de microalgas (GRIMA *et al.*, 2003).

2.4.2 Meio alternativo para cultivo de microalgas

Uma forma de reduzir o custo do meio de cultivo é utilizar substituto dos nutrientes, como leveduras, fertilizantes, esgoto doméstico e principalmente resíduo e efluente agroindustriais com alta taxa orgânica. Esses resíduos podem ser utilizados como fonte de nutrientes porque em sua composição estão presentes os nutrientes básicos necessários ao metabolismo das microalgas.

Dentre os meios de culturas alternativos utilizados para a produção de biomassa de microalgas destacam-se: vinhaça, efluentes da bovinocultura e suinocultura, dentre outros (BERTOLDI *et al.*, 2008). Existe um esforço da comunidade científica em valorizar esses materiais, como neste caso fonte de nutrientes para cultivos de algas, pois esses resíduos são produzidos em largas quantidades e constituem um grave problema ambiental. Um exemplo disso está representado na TABELA 03 que descreve a média de produção de dejetos por tipo de animal.

As composições dos efluentes variam de acordo com sua origem, muitos efluentes podem conter grande quantidade de matéria orgânica, ou ainda apresentar altas concentrações de metais tóxicos (DAL MAGRO *et al.*, 2011).

Contudo, o uso de meios de cultivos alternativos formulados a partir de resíduos pode apresentar fatores limitantes, como por exemplo, a redução da intensidade luminosa disponível para a fotossíntese das microalgas devido à alta turbidez do meio final, ou ainda um desequilíbrio no fornecimento de nutrientes devido à altas ou baixas concentrações (BARROCAL *et al.*, 2010).

2.4.3 Meio alternativo com efluente de bovinocultura biodigerido

Devido à grande concentração de animais por área, em sistemas de confinamento de bovinos, um volume considerável de dejetos é gerado diariamente como mostra a TABELA 03. A disposição final, ambientalmente correta, destes efluentes é um dos principais desafios para criadores e pesquisadores, pois envolvem aspectos técnicos, econômicos e ambientais.

Uma forma para valorizar os resíduos gerados pela bovinocultura e reduzir o impacto ambiental, é a geração de energia a partir da fermentação do efluente em biodigestor anaeróbico. Este sistema permite produzir biogás e estabilizar o efluente, reduzindo até 60% da carga orgânica (LUCAS. *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2001).

Como o efluente biodigerido apresenta um elevado teor de nitrogênio e fosfato, este pode ser utilizado como meio alternativo para cultivo de microalgas (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; BERTOLDI *et al.*, 2008).

O uso de efluente bovino no cultivo de microalgas representa uma alternativa ambiental e econômica para o tratamento de efluente, pois além de permitir a redução do potencial poluidor e dos riscos sanitários dos dejetos, reduz o custo da produção de biomassa como matéria-prima para síntese de biodiesel, reduzindo o gasto com nutrientes e água na produção de microalgas.

TABELA 03 – PRODUÇÃO DIÁRIA DE DEJETOS POR ANIMAL

TIPO DE ANIMAL	NUMERO DE CABEÇAS NO BRASIL	MEDIA DA PRODUÇÃO DE DEJETOS POR CABEÇA (kg dia ⁻¹)
Aves	5,5 bilhões	1
Bovinos	200 milhões	30
Equinos	5,75 milhões	10
Suínos	32 milhões	2,3

FONTE: MAPA (2013)

3 DESAFIOS E OBJETIVOS

Apesar das vantagens que apresentam em relação às plantas oleaginosas o uso de microalgas como matéria-prima da produção de biodiesel, para se tornar um sistema economicamente competitivo no mercado é necessário reduzir os custos de produção.

A geração de resíduos da bovinocultura no país é elevada, aproximadamente 6.10^6 t.dia⁻¹, (MAPA, 2013) causando impacto sobre o meio ambiente contaminando o solo e corpos hídricos. Uma alternativa para tratar este resíduo é sua biodegradação por microrganismos.

Portanto o uso de efluentes de biodigestores como fonte de nutrientes para o crescimento das microalgas representa uma alternativa economicamente viável para a produção de microalgas, em razão da elevada carga de nutrientes que este resíduo apresenta e, levando em conta os altos custos dos nutrientes dos meios de cultura sintéticos. Além disso, a destinação desses resíduos para o cultivo de microalgas permite a redução da carga de nutrientes do efluente facilitando seu descarte conforme legislação vigente.

A produção de biomassa de microalgas como fonte de matéria prima para produção de biocombustíveis precisa superar grandes obstáculos, como reduzir o custo dos meios de cultivo, desenvolvimento de tecnologias simples e custo reduzido para isolamento do óleo e síntese do biodiesel, melhorar as configurações dos fotobiorreatores para aumentar o rendimento e reduzir as contaminações.

3.1 OBJETIVO GERAL

Assim o presente trabalho procurou desenvolver um sistema de produção de microalga em efluente da bovinocultura biodigerido, como substituto do meio de cultivo sintético, buscando uma produtividade de biomassa e lipídios semelhante ao do meio sintético, a fim de reduzir o custo da produção de biodiesel.

3.1.1 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, o trabalho foi dividido em diferentes objetivos específicos:

1. Coletar e caracterizar o resíduo bovino biodigerido;
2. Padronizar o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em meio sintético *CHU* para definição do período de cultivo e produção de biomassa;
3. Cultivar microalgas em meio de cultivo alternativo formulado a partir de diluições do efluente bovino biodigerido em água;
4. Comparar a produtividade de biomassa e lipídios totais dos cultivos em meio *CHU* com o meio alternativo;
5. Avaliar a eficiência da depuração do resíduo bovino em relação à sua composição original;
6. Analisar o perfil lipídico da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em meio *CHU* e efluente biodigerido.

Na FIGURA 07 são ilustradas as estratégias necessárias para alcançar os objetivos específicos desta pesquisa.

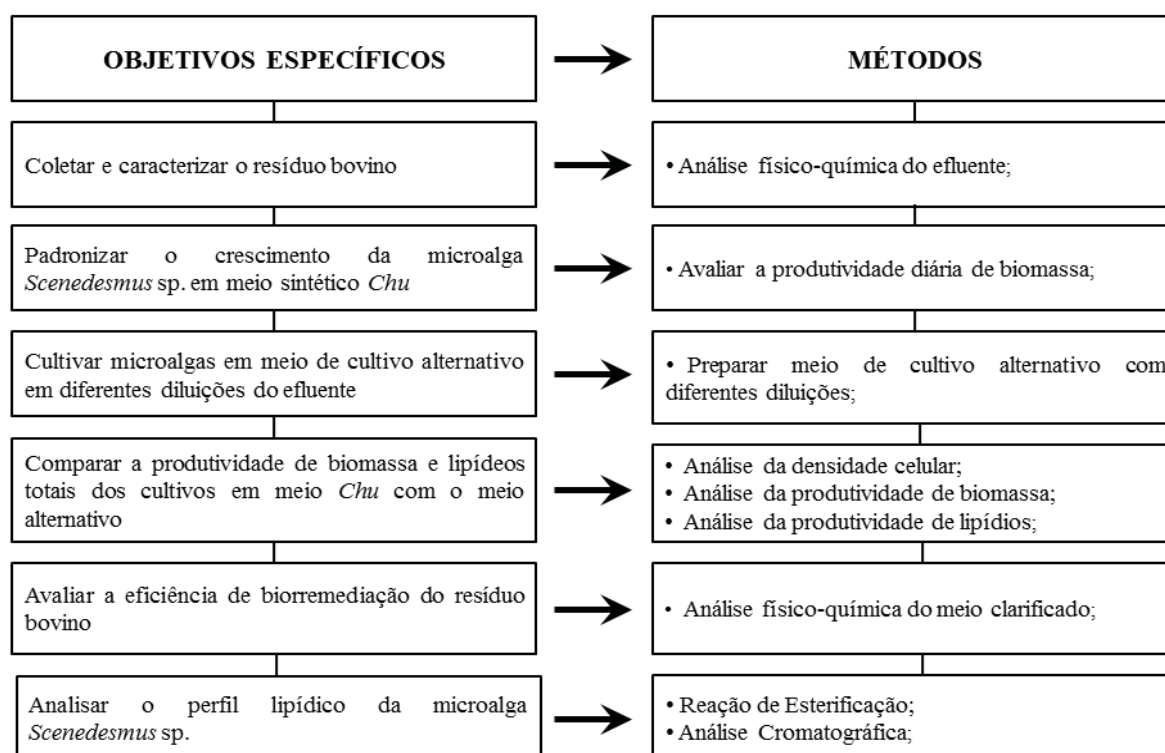


FIGURA 07 – FLUXOGRAMA DE OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ESTRATÉGIAS DE TRABALHO

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICROALGA

A espécie de microalga utilizada neste estudo foi uma *Scenedesmus* sp. isolada no NPDEAS, Universidade Federal do Paraná (UFPR) a partir da rede de abastecimento de água.

4.2 MEIO DE CULTIVO

4.2.1 Meio *CHU*

A microalga foi cultivada em meio *CHU* de acordo com a NBR 12648 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As soluções descritas na TABELA 04 foram preparadas com reagentes analíticos e água destilada, armazenadas em frascos âmbar e mantidos refrigerados a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$.

TABELA 04 – COMPOSIÇÃO DO MEIO *CHU*

SOLUÇÃO	FÓRMULA	MEIO DE CULTIVO (g.L ⁻¹)
MACRONUTRIENTES	NaNO ₃	$2,50 \cdot 10^{-2}$
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	$2,50 \cdot 10^{-3}$
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	$7,50 \cdot 10^{-3}$
	K ₂ HPO ₄	$7,50 \cdot 10^{-3}$
	KH ₂ PO ₄	$1,75 \cdot 10^{-2}$
	NaCl	$2,50 \cdot 10^{-3}$
	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	$5,00 \cdot 10^{-2}$
	KOH	$3,10 \cdot 10^{-2}$
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	$4,98 \cdot 10^{-3}$
	H ₃ BO ₃	$1,14 \cdot 10^{-2}$
MICRONUTRIENTES	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	$8,82 \cdot 10^{-5}$
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	$1,44 \cdot 10^{-5}$
	MoO ₃	$7,10 \cdot 10^{-6}$
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	$1,57 \cdot 10^{-5}$
	Co (NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	$4,90 \cdot 10^{-6}$

4.2.2 Meio com efluente de bovinocultura biodigerido

O efluente utilizado nesta pesquisa para substituir o meio de cultivo sintético, foi coletado de um biodigestor anaeróbico, coberto com lona de PVC, volume de 150 m³, com tempo de residência hidráulica de 30 dias e afluente bovino. O biodigestor está instalado no Centro de Treinamento de Pecuaristas de Castrolanda, Castro – PR (FIGURA 08).

O efluente coletado foi transportado para Curitiba – PR em reservatórios plásticos de 20 litros e armazenados em frascos de plástico, mantidos em refrigerador (-10 °C), para uma conservar suas características físico-químicas (sessão 4.5.1).



FIGURA 08 – BIODIGESTOR ANAERÓBICO DO CTP DE CASTROLANDA (CASTRO – PR)

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos de microalgas foram realizados em escala laboratorial, como mostra a FIGURA 09, realizados em balão Erlenmeyer com capacidade de 2 L. O volume utilizado em cada balão Erlenmeyer foi de 1,8 L. Os cultivos foram mantidos em ambiente climatizado com temperatura controlada a $22^{\circ} \pm 2$ °C, a iluminação de aproximadamente $111,5 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes, com fotoper\u00edodo 12:12, aera\u00e7\u00e3o constante realizada por bombas de ar usadas em aqu\u00e1rio, regulada com fluxo de ar com aproximadamente 0.076 L.s^{-1} por litro de cultivo.



FIGURA 09 – CULTIVOS COM MICROALGA *Scenedesmus* sp. EM MEIO *CHU* E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA

4.3.1 Produção de inóculo

O preparo do inóculo seguiu o procedimento descrito na seção 4.2.1, e 4.3 adicionando $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa inicial, sendo mantidos até o terceiro dia, quando se iniciava a inoculação dos experimentos.

Para determinar a quantidade de inóculo (mL) a ser adicionada nos experimentos, foi quantificada a biomassa em g.L^{-1} , em seguida calculado o volume necessário para inocular 1,8 L de cultivo com uma biomassa inicial de aproximadamente $0,1 \text{ g.L}^{-1}$.

4.4 ANÁLISES DOS CULTIVOS

Para a determinação, em triplicata, da biomassa seca, foram retiradas alíquotas diariamente. As análises de lipídios foram realizadas no último dia de cultivo.

4.4.1 Biomassa seca

A concentração de biomassa seca em (g.L^{-1}) dos cultivos foi determinada diariamente, em triplicata, com base na metodologia de sólidos totais, adaptada do *Standard Methods* (2005). Para eliminar a influência da umidade presente nos papéis de filtro, estes foram secos em estufa a 60°C por aproximadamente 24 horas, transferidos para um dessecador até que atingisse temperatura ambiente, e quantificados em balança analítica. Após este procedimento 25 mL da amostra de cultivo foi filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo, e transferida para estufa a 60°C até que a massa ficasse constante.

A determinação da biomassa seca foi feita através da diferença entre a massa inicial (P_1) e final (P_2) dos papéis filtro conforme a Equação 1.

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

onde:

B = Biomassa seca (g.L^{-1});

P_1 = Massa do papel filtro úmido (g);

P_2 = Massa do papel de filtro com biomassa seca;

V = Volume de amostra filtrada (mL);

4.4.2 Lipídios totais

Para a determinação dos lipídios totais foi utilizada a metodologia de extração a frio desenvolvida por *Bligh e Dyer* por Rodrigues *et al.* (2007).

Foi separada 50 mg de amostra de microalga liofilizada em tubos de ensaio de 12 mL, onde adicionou-se 3 mL de clorofórmio:metanol (2:1, v:v) e 10 μL de butil-hidroxitolueno – BHT (1% em metanol). As amostras foram sonicadas por 3 ciclos de 15 minutos cada e em seguida incubados por 24 horas sob refrigeração a 4°C e protegidas da luz (envolvidos em papel alumínio), para evitar a foto-oxidação.

Os tubos contendo as amostras foram novamente submetidos ao ultrassom durante 3 ciclos de 15 minutos e centrifugadas a 5.000 rpm a 5 °C, a fase líquida foi recuperada e reservada (tubo 2).

Adicionou-se 1,5 mL de solução clorofórmio/metanol à biomassa sedimentada e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores, a fase líquida foi recuperada e transferida ao reservado (tubo 2).

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

Determinação dos lipídios totais em mg.L⁻¹:

$$Lipídios = \frac{(L_2 - L_1)}{C} \cdot 1000 \quad (2)$$

onde:

L_1 – massa do *vial* vazio (g);

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

C – biomassa seca (g);

Determinação dos lipídios totais em %:

$$(\%)Lipídios = \frac{(L_2 - L_1)}{C} \cdot 100 \quad (3)$$

4.5 DEPURAÇÃO DO EFLUENTE

A avaliação da depuração do efluente através do consumo de nutrientes pelas microalgas foi realizada através de análises físico-químicas, fósforo, potássio, DBO, DQO, nitrogênio amoniacal, nitrato e nitrito, do efluente coletado e do meio clarificado, para a melhor concentração de efluente no cultivo, em relação a produção de biomassa e acúmulo de lipídios.

A eficiência, porcentagem de remoção dos nutrientes, foi calculada por meio da equação 4.

Determinação da eficiência em porcentagem (%):

$$E(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_2}\right) \cdot 100 \quad (5)$$

onde:

A_1 – concentração de nutrientes do meio clarificado;

A_2 – concentração de nutrientes do efluente;

4.5.1 Análise físico-química

As análises físico-químicas, fósforo, potássio, DBO, DQO, nitrogênio amoniacal, nitrato e nitrito, foram realizadas a partir do efluente coletado e do meio clarificado foram realizadas pelo CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos), conforme metodologia do *Standard Methods* (2005).

4.6 ESTERIFICAÇÃO

Para realizar a identificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa, esses foram convertidos a metil-éster através de esterificação ácida na presença de H_2SO_4 , conforme a metodologia de Hartman e Lago (1973), modificada por Menezes *et al.* (2012), ilustrada na FIGURA 10.

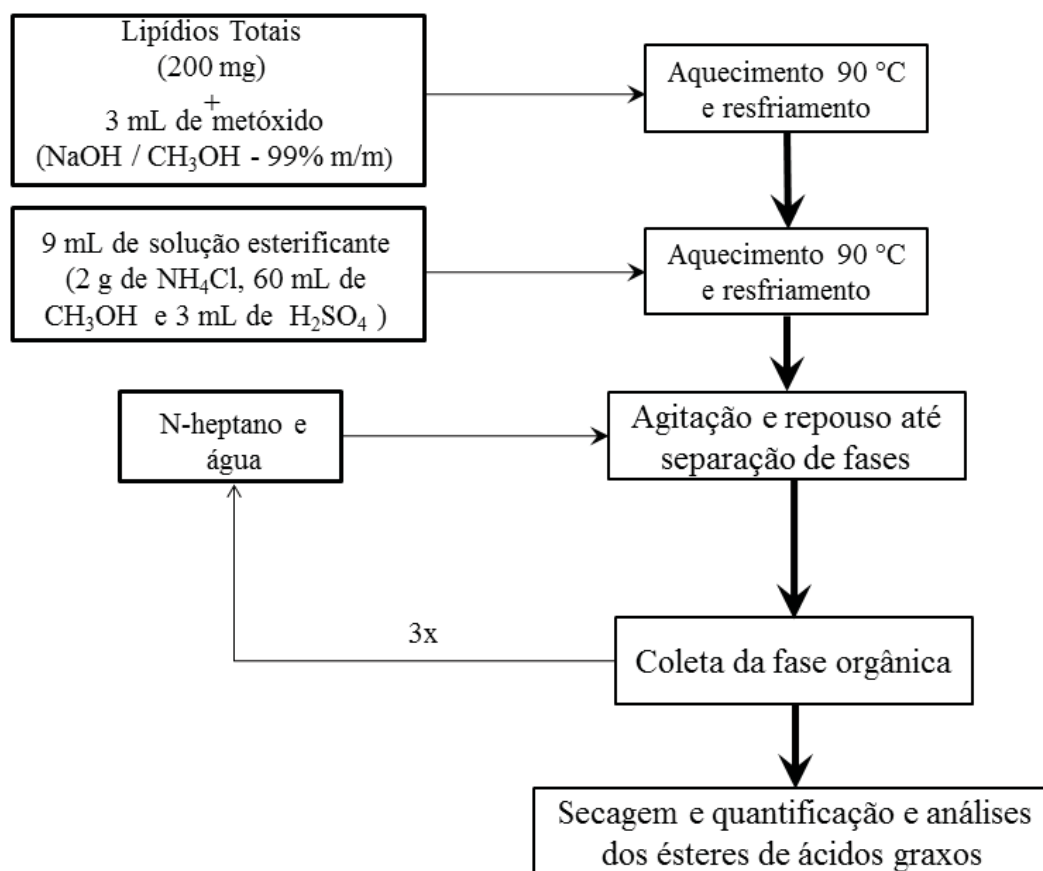


FIGURA 10 - FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO DA METODOLOGIA DE HARTMAN e LAGO (1973)

Para cada 200 mg de amostra, foram utilizados 3 mL de uma solução de Metóxido ($\text{NaOH} / \text{CH}_3\text{OH} - 99\% \text{ m/m}$) ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), em seguida, os tubos foram imersos em um banho-maria a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos. Ao término, foram colocados em um banho de gelo. Após resfriamento, foram adicionados 9 mL de uma solução esterificante - preparada a partir de 2 g de cloreto de amônio (NH_4Cl), 60 mL de metanol e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado, e imersos no mesmo banho a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos. Ao término do tempo, novamente foram resfriados e procedeu-se a extração dos monoésteres com n-heptano, sendo realizadas 3 extrações consecutivas, intercaladas com 3 lavagens com água destilada. A fase solvente contendo os monoésteres foi coletada com pipeta Pasteur e armazenada em um *vial*, para análise quantitativa em cromatografia gasosa.

4.6.1 Análise cromatográfica

O perfil cromatográfico dos ácidos graxos foi realizado pelo CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos).

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo gasoso, marca Varian® modelo CP3900 com injetor split/splitless com detector de ionização de chama (FID). A coluna capilar utilizada foi CpSil for FAME com recheio de Polietileno Glicol (100 mm x 0,25 mm x 0,39 µm). O gás de arraste utilizado foi N₂ mantido a um fluxo de 40 psi. O volume de injeção foi 1,0 µL. O forno foi programado para trabalhar no modo isotérmico a 210 °C e a temperatura do detector foi de 260 °C, o tempo total da corrida de 70 min. Para detecção dos perfis de ácidos graxos nas amostras foram utilizados padrões de 37 componentes 10 mg.mL⁻¹. Os tempos de retenção dos ácidos graxos da amostra foram comparados com os tempos de retenção dos padrões, normalizados e os resultados expressos em g.100g⁻¹.

4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todas as condições experimentais avaliadas foram realizadas em triplicata. Os resultados dos valores amostrais são expressos como valores médios ± desvio padrão.

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliadas por análise de variância (teste T de *Student*), com nível de significância de 95%.

Nível descritível do teste – *p*:

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho são apresentados em sete seções, de acordo com cada objetivo específico. A primeira seção trata da caracterização do resíduo bovino biodigerido. A segunda seção padroniza o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em meio sintético *CHU* a fim de avaliar a produção de biomassa diária visando escolher o tempo máximo de cultivo. Na terceira seção são relatados os experimentos com meio alternativo, preparados com diferentes concentrações de efluente de bovinocultura (10%, 20%, 25% e 30%) com o objetivo de avaliar qual a melhor concentração de efluente a ser adicionada no cultivo. Na quarta seção é avaliada a capacidade da microalga em depurar o efluente com a melhor concentração utilizada e na quinta seção é avaliado o perfil lipídico da microalga em meio sintético *CHU* e meio alternativo de bovinocultura, com melhor a concentração de efluente. A FIGURA 11 apresenta todo o processo de desenvolvimento experimental.

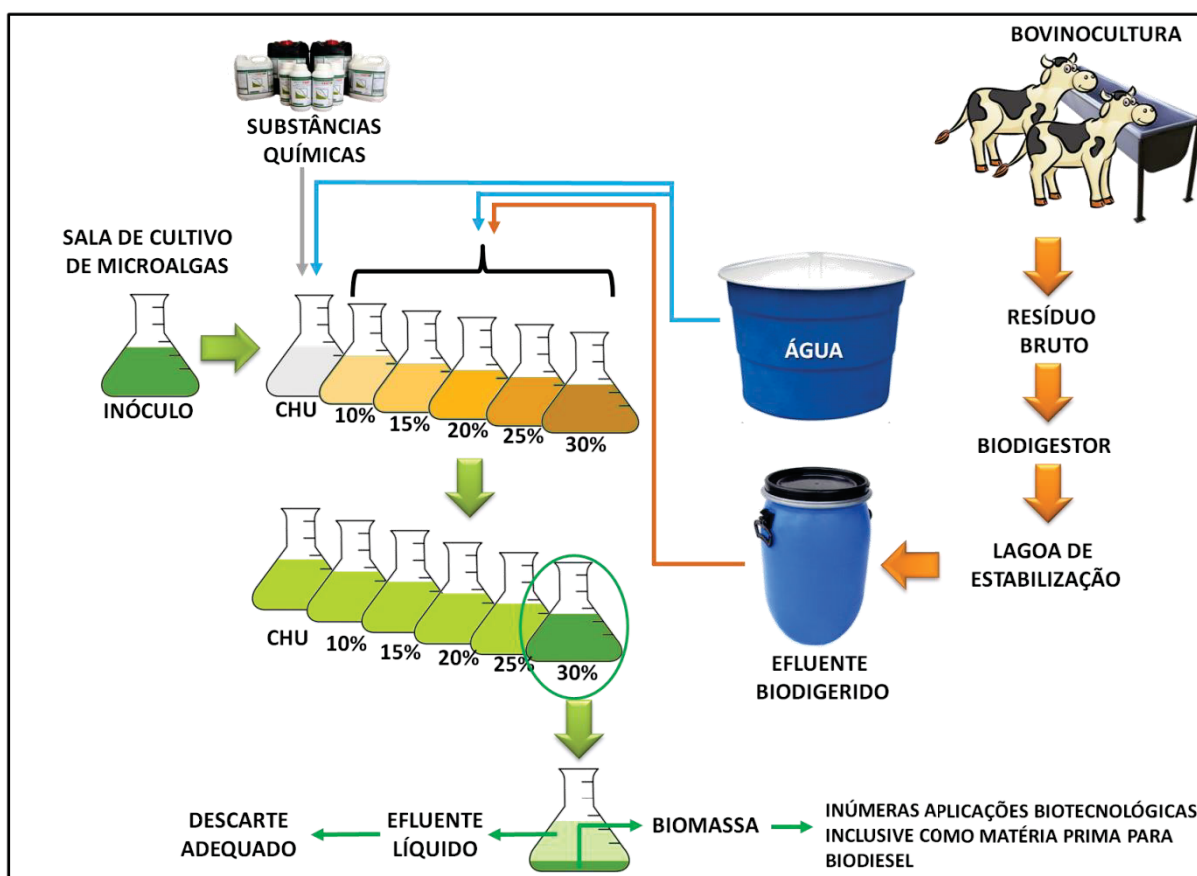


FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO BOVINO BIODIGERIDO

Os efluentes mesmo depois de passarem pelo processo de biodigestão, possuem elevadas concentrações de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), sólidos em suspensão e nutrientes (nitrogênio e fósforo). Isto representa uma fonte de nutrientes, mas também uma fonte potencial de poluição ambiental quando não tratado ou manejado inadequadamente.

O estudo das diferentes diluições do resíduo foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foram realizados experimentos com concentrações de efluente (10%, 15% e 20%) a fim de verificar como o cultivo se comportaria quando comparado ao meio sintético *CHU*. Na realização da segunda etapa, os experimentos foram realizados em mais duas concentrações de efluentes (25% e 30%) e repedida a concentração que obteve melhor crescimento de biomassa comparado com o meio *CHU* no primeiro experimento (20%).

Como mostra a TABELA 05, diferentes concentrações de efluente (10%, 15%, 20%, 25% e 30%) foram adotadas objetivando verificar em qual destas concentrações o crescimento microalgal teria melhor adaptação como alternativa para substituir o meio sintético *CHU*.

TABELA 05 – CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTE NO MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO

NUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO (mg.L ⁻¹)						
	EFLUENTE COLETADO	<i>CHU</i>	EFLUENTE DILUIDO EM ÁGUA (%)				
			10%	15%	20%	25%	30%
Fosforo	46,61	5,3	5,6	8,9	11,7	16,3	29,2
Potássio	632,82	30,0	75,9	120,2	158,2	221,5	218,0
DBO	186,22		22,4	35,4	46,6	65,2	78,2
DQO	1165,66		139,9	221,5	291,42	408,0	489,6
Nitrogênio amoniacal	192,76		23,1	36,6	48,2	67,5	81,0
Nitrogênio Total	259,64	7,9	31,2	49,3	64,9	90,9	109,1
Nitrogênio Kjeldahl	259,59		31,1	49,3	64,9	90,9	109,0
Nitrato	0,05		0,006	0,010	0,013	0,018	0,1
Nitrito	<0,02		<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,01

5.2 CULTIVO DA MICROALGA EM MEIO CHU

5.2.1 Produtividade de biomassa seca

A microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada em triplicata em meio CHU por um período de 17 dias, durante esse período foi monitorado o crescimento diário da biomassa seca conforme procedimento descrito na seção 4.4.1, a fim de definir sua produtividade e delimitar um período ideal para os próximos cultivos realizados.

O crescimento da microalga é definido como um aumento da matéria viva, um dos métodos empregados para avaliação do crescimento das microalgas em um cultivo é a curva de crescimento. Esta pode ser expressa como sendo a relação entre o aumento da biomassa ou do número de células em um determinado volume pelo tempo. Em um cultivo do tipo estacionário, a curva de crescimento pode apresentar as fases como mostra a FIGURA 12. Em cada fase de crescimento a microalga apresenta um metabolismo específico determinado pelas condições do ambiente (VEGA E VOLTOLINA, 2007).

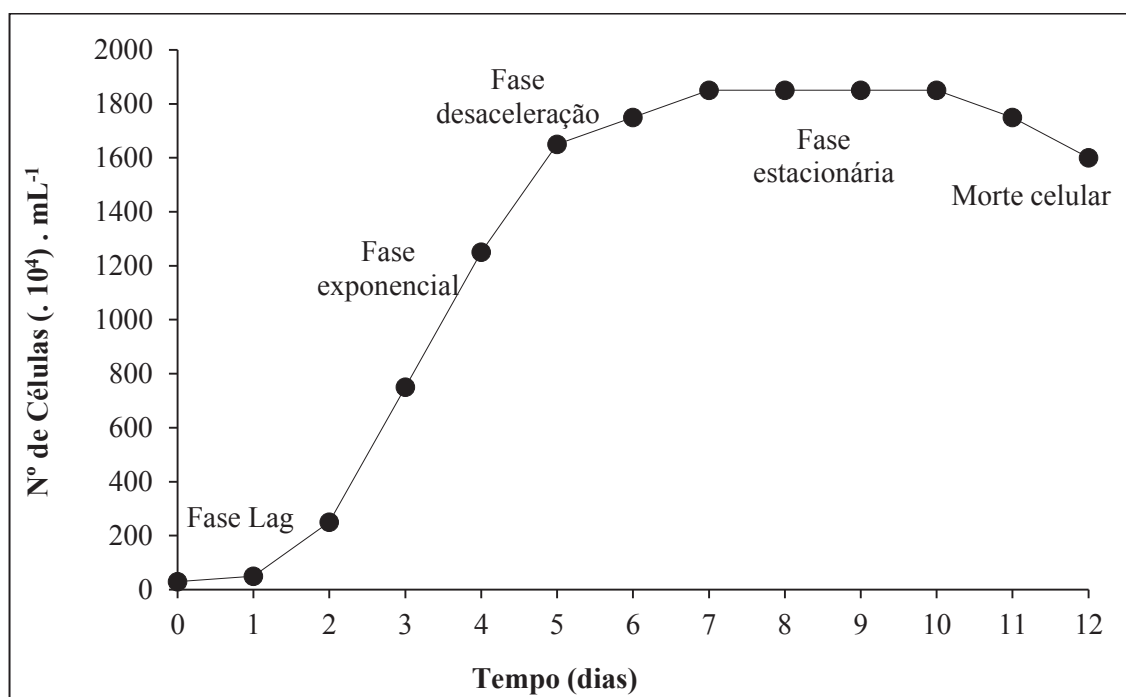


FIGURA 12 – CURVA DE CRESCIMENTO DE UMA CULTURA MICROALGAL
FONTE: ADAPTADO DE VEGA; VOLTOLINA (2007)

A FIGURA 13 apresenta a produção de biomassa em g.L^{-1} da microalga *Scenedesmus* sp. Observa-se que não é possível diferenciar as fases de crescimento celular, pois neste intervalo de cultivo (17 dias) o crescimento foi linear. Além disso, é importante ressaltar que houve fotoperíodo nos experimentos, desta forma, ocorre à diminuição da velocidade de crescimento das microalgas e promovendo consumo de suas reservas energéticas.

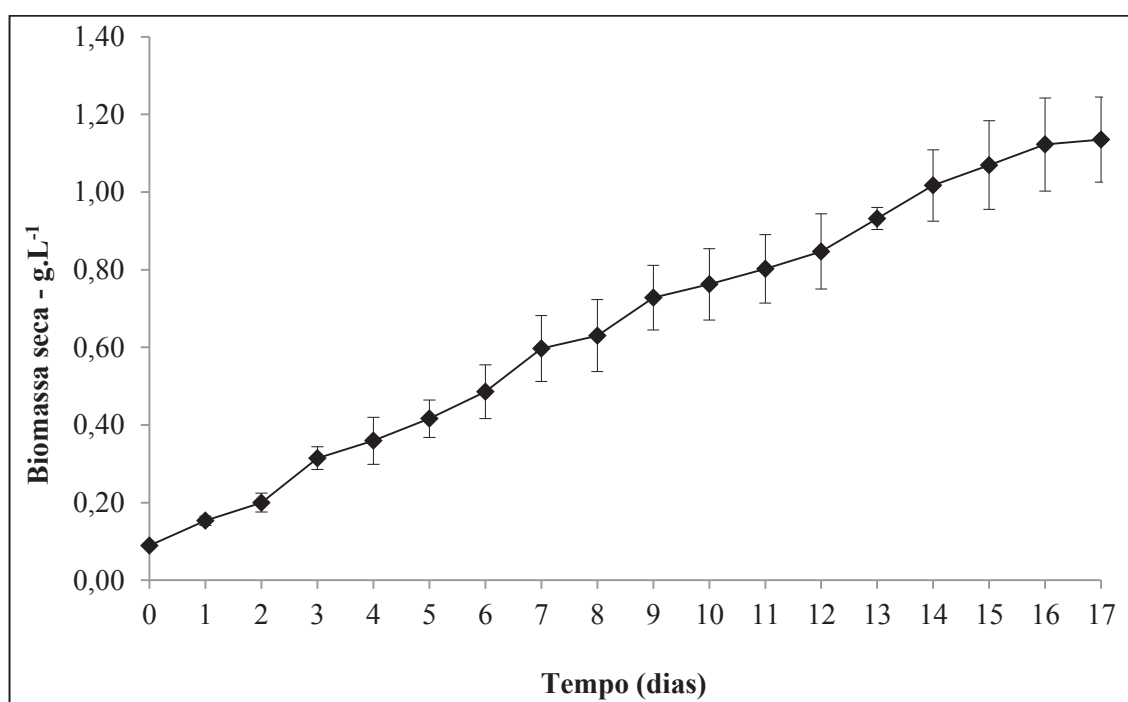


FIGURA 13 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA DO CULTIVO EM MEIO *CHU*.

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são \pm erro padrão.

A TABELA 06 apresenta os valores de produção de biomassa seca da microalga cultivada em meio *CHU* do 0 ao 17 dia de cultivo. Observa-se que a produtividade (g.L^{-1}) foi crescente, obtendo seu valor máximo de $1,14 \text{ g.L}^{-1}$ no 17º dia de cultivo.

TABELA 06 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA DA MICROALGA CULTIVADA EM MEIO *CHU*

DIA	BIOMASSA SECA (g.L^{-1})
0	$0,09 \pm 0,00$
1	$0,15 \pm 0,01$
2	$0,20 \pm 0,02$
3	$0,31 \pm 0,03$

4	0,36 ± 0,06
5	0,42 ± 0,05
6	0,49 ± 0,07
7	0,60 ± 0,09
8	0,63 ± 0,09
9	0,73 ± 0,08
10	0,76 ± 0,09
11	0,80 ± 0,09
12	0,85 ± 0,10
13	0,93 ± 0,03
14	1,02 ± 0,09
15	1,07 ± 0,11
16	1,12 ± 0,12
17	1,14 ± 0,11

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são \pm erro padrão.

5.3 DEFINIÇÃO DO PERÍODO DE CULTIVO DAS MICROALGAS EM MEIO CHU

A FIGURA 14 apresenta a produtividade diária de biomassa seca (g.L.dia^{-1}) calculada para todo o período de cultivo. O crescimento da microalga sofreu uma redução significativa do 0 para o 2º dia de cultivo, aumentando no 3º dia e manteve-se aproximadamente constante até o 17º dia.

O cultivo não foi interrompido no 3º dia, pois a quantidade de nutrientes no cultivo ainda era elevada e a microalga se encontra na fase de multiplicação celular, não armazenando lipídios nas células, assim foi definido um período de cultivo de dez dias para todos os experimentos seguintes.

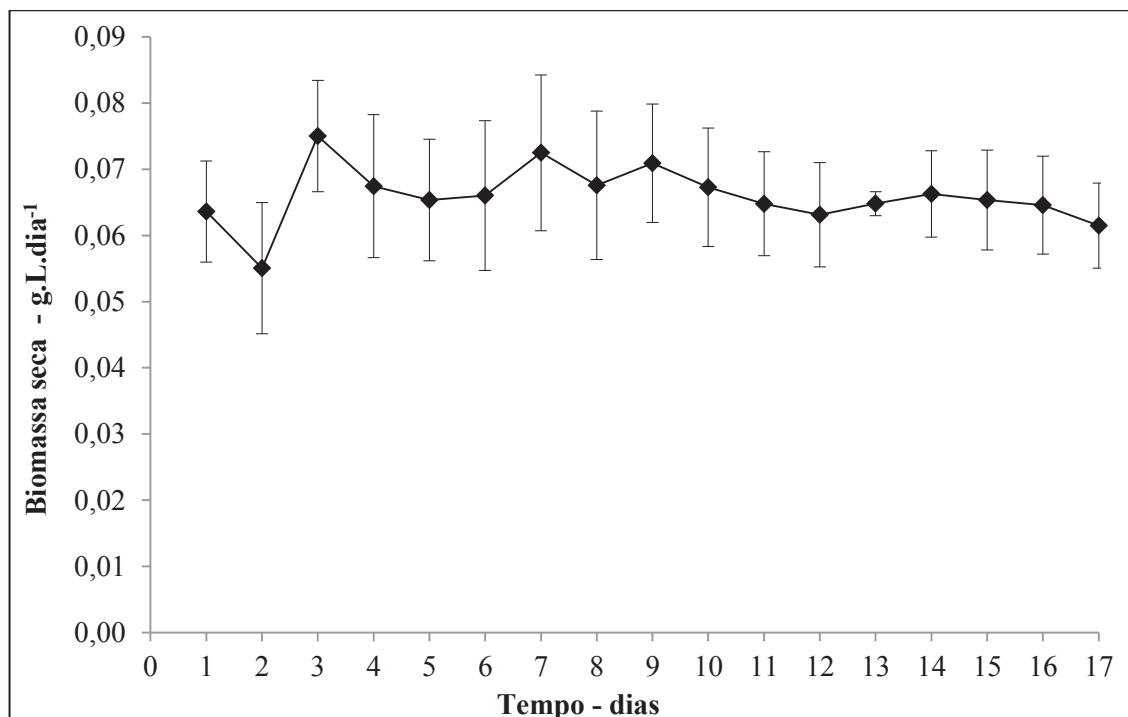


FIGURA 14 – PRODUTIVIDADE DIÁRIA DE BIOMASSA SECA EM MEIO CHU

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são \pm erro padrão.

5.4 CULTIVOS COM MEIO ALTERNATIVO

5.4.1 Porcentagem de efluente utilizado no cultivo

Os meios preparados com efluente foram filtrados e diluídos em várias concentrações, como mostra TABELA 07, para diminuir a carga orgânica e reduzir a turbidez do efluente e, assim, não ocorrer dispersão da iluminação no meio, e permitir verificar em qual concentração a microalga teria um desenvolvimento semelhante ou superior ao do meio CHU.

TABELA 07 – PORCENTAGEM DE EFLUENTE ADICIONADO AO MEIO ALTERNATIVO

TRATAMENTO	EFLUENTE – % (v/v)
1	0*
2	10
3	15
4	20
5	25
6	30

Nota – * cultivo controle com meio CHU, sem adição de efluente

A FIGURA 15 mostra a aparência dos meios de cultivos, realizado em meio sintético CHU e meio alternativo de bovinocultura biodigerido em diferentes concentrações, a cor escura ocorre devido a presença de sólidos dissolvidos no efluente de bovinocultura, o que confere maior turbidez ao cultivo.



FIGURA 15 – ASPECTOS FÍSICO DOS MEIOS DE CULTIVOS: SINTÉTICO (CHU) E ALTERNATIVO (10%, 15%, 20%, 25% E 30% DE EFLUENTE DE BOVINOCULTURA)

A turbidez do meio pode dificultar a passagem de luz, diminuindo assim a fotossíntese das células. Para diminuir esse efeito, o efluente foi filtrado em membranas de fibra de vidro para remoção de particulados.

5.4.2 Primeira Etapa - Meio alternativo com 10%; 15% e 20% de efluente

5.4.2.1 Produção de biomassa

O crescimento das microalgas foi avaliado pela determinação da biomassa diariamente durante 10 dias de cultivo, para as três concentrações de efluente (10%, 15%, 20%) comparado com o meio CHU. Foram realizados três experimentos independentes para cada diluição avaliada (FIGURA 16).

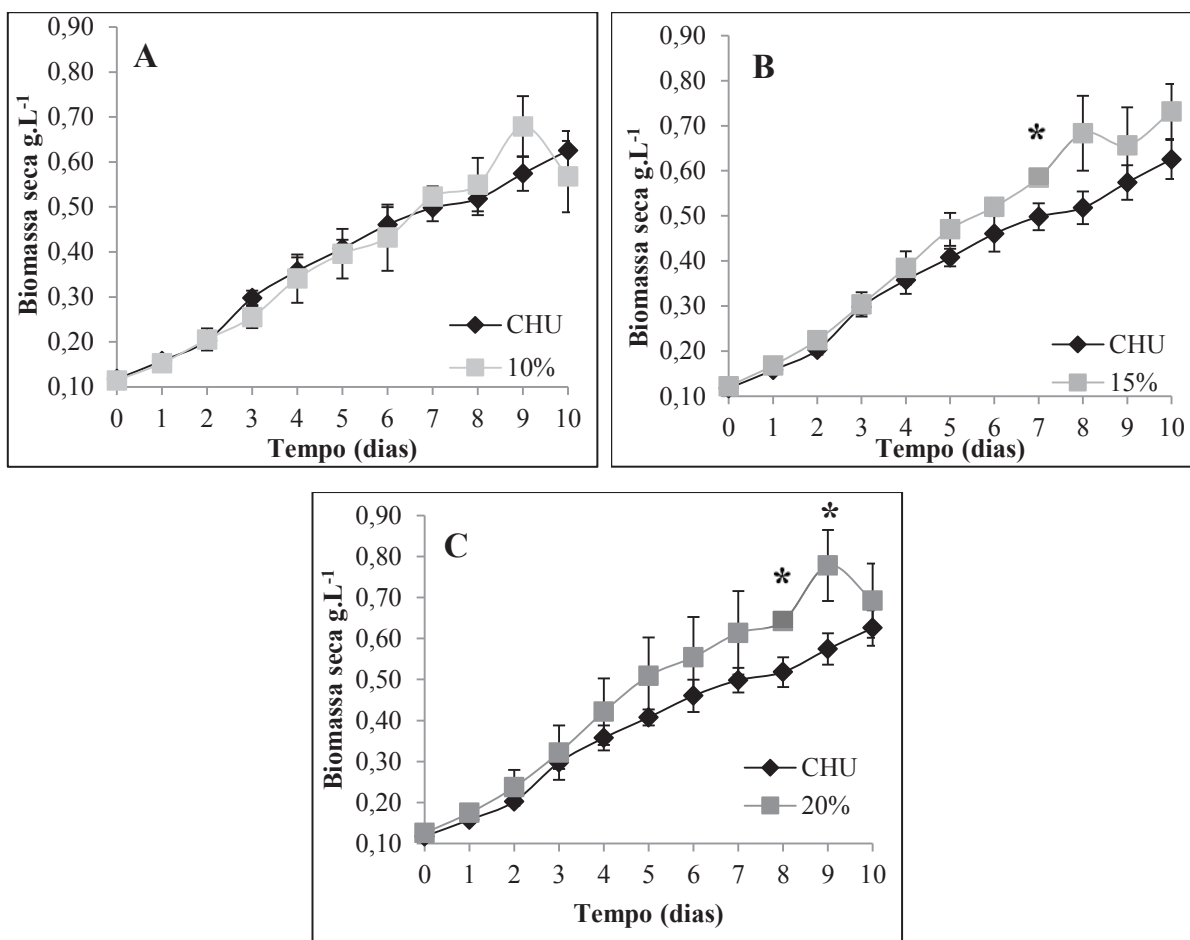


FIGURA 16 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA 2º ETAPA DE EXPERIMENTO COM MEIO CHU E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA COM DILUIÇÕES 10% (A), 15% (B), 20% (C)

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são \pm erro padrão – * valores com diferenças estatisticamente significativas do meio CHU ($p < 0,05$).

Nessas diferentes concentrações de meio a microalga apresentou um crescimento contínuo ao longo do tempo de cultivo. O desenvolvimento da microalga nas diferentes diluições com efluente biodigerido foram semelhantes, exceto para o 7º dia com 15%, o 8º e 9º dia com 20%, no qual houve uma diferença significativa ($p > 0,05$), quando comparado ao meio CHU.

A TABELA 08 apresenta a produtividade de biomassa seca em g.L^{-1} avaliada diariamente ao longo do cultivo. Pode-se observar que a produção de biomassa seca foi semelhante para todos os cultivos durante todo período.

Para verificar se a concentração de 20% de efluente se configura como a melhor condição de cultivo de microalgas, novos experimentos foram realizados adicionando-se as concentrações de 25 e 30% em uma segunda etapa desse estudo.

TABELA 08 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA DOS CULTIVOS PREPARADOS COM MEIO CHU E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA DO 0 AO 10º DIA EM g.L⁻¹.

DIA	CHU	CONCENTRAÇÃO DO EFLUENTE NO MEIO ALTERNATIVO		
		10%	15%	20%
0	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,00
1º	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01
2º	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,24 ± 0,04
3º	0,30 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,32 ± 0,07
4º	0,36 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,38 ± 0,04	0,42 ± 0,08
5º	0,41 ± 0,02	0,40 ± 0,04	0,47 ± 0,04	0,51 ± 0,09
6º	0,46 ± 0,04	0,43 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,55 ± 0,10
7º	0,50 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,61 ± 0,10
8º	0,52 ± 0,04	0,55 ± 0,08	0,68 ± 0,08	0,64 ± 0,02
9º	0,57 ± 0,04	0,68 ± 0,08	0,66 ± 0,08	0,78 ± 0,09
10º	0,63 ± 0,04	0,57 ± 0,06	0,73 ± 0,06	0,69 ± 0,09

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são ± erro padrão.

5.4.2.2 Produção de lipídios

No último dia de cultivo (10º dia) foi analisada a produção de lipídios pelas microalgas. Para tanto, uma amostra de cada experimento foi coletada e a concentração de lipídio determinada por extração a frio, descrita na seção 4.4.2.

Como as análises foram realizadas em triplicata, os resultados expressos na FIGURA 17 representam a média de três experimentos independentes.

Observou-se que a maior percentagem de lipídios na biomassa microalgal foi encontrada no cultivo com efluente 10% (14,91%) quando comparada meio CHU (12,41%). Já para o cultivo com 15% e 20% de efluente, o valor obtido foi inferior ao meio CHU (12,03% e 11,56%).

As análises de significância mostram que não houve diferença significativa para as porcentagens de lipídios encontrados no meio de cultivo com meio CHU e efluente com 15% e 20%, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para o cultivo com 10% de efluente comparado ao meio CHU.

O resultado de lipídios totais no 10º dia de cultivo foi maior para a diluição de 10%, pois, ao comparar os cultivos com diluições de 10%, 15% e 20% do efluente ao

meio CHU, a concentração de nitrogênio na diluição de 10% foi a menor estudada. Portanto, nesta condição, o nitrogênio disponível para as células se esgotou primeiro e as microalgas passaram a acumular lipídios e carboidratos antes que nos outros cultivos.

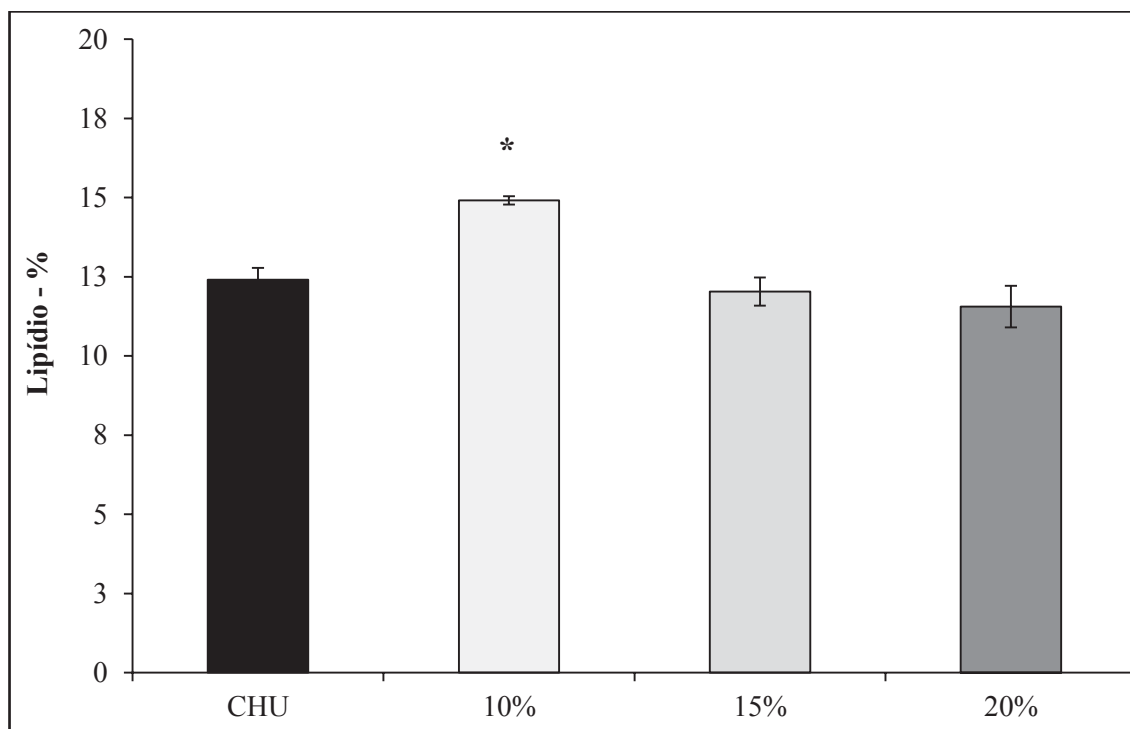


FIGURA 17 – PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS TOTAIS NA BIOMASSA MICROALGAL CULTIVADA EM MEIO CHU E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são \pm erro padrão – * valores com diferenças estatisticamente significativas do meio CHU ($p < 0,05$).

Esse resultado é compatível com dados da literatura, nos quais as microalgas cultivadas em meios com menores concentrações de nitrogênio apresentaram maiores teores de lipídios (MANDAL; MALLICK, 2009; FRANCISCO *et al.*, 2010). Contudo, analisar apenas o teor lipídico na biomassa não é o suficiente para determinar a eficiência de produção de óleo nas microalgas. Para isso deve-se levar em consideração a concentração final de lipídios no cultivo.

Desta forma, a FIGURA 18 mostra o conteúdo lipídico do meio em mg.L^{-1} , observa-se que há uma diferença significativa ($p < 0,05$) com o cultivo em efluente 10% ($84,63 \text{ mg.L}^{-1}$) e 15% ($88,02 \text{ mg.L}^{-1}$) em relação ao meio CHU ($77,63 \text{ mg.L}^{-1}$). Para a concentração com 20%, não houve diferença significativa quando comparado ao meio CHU.

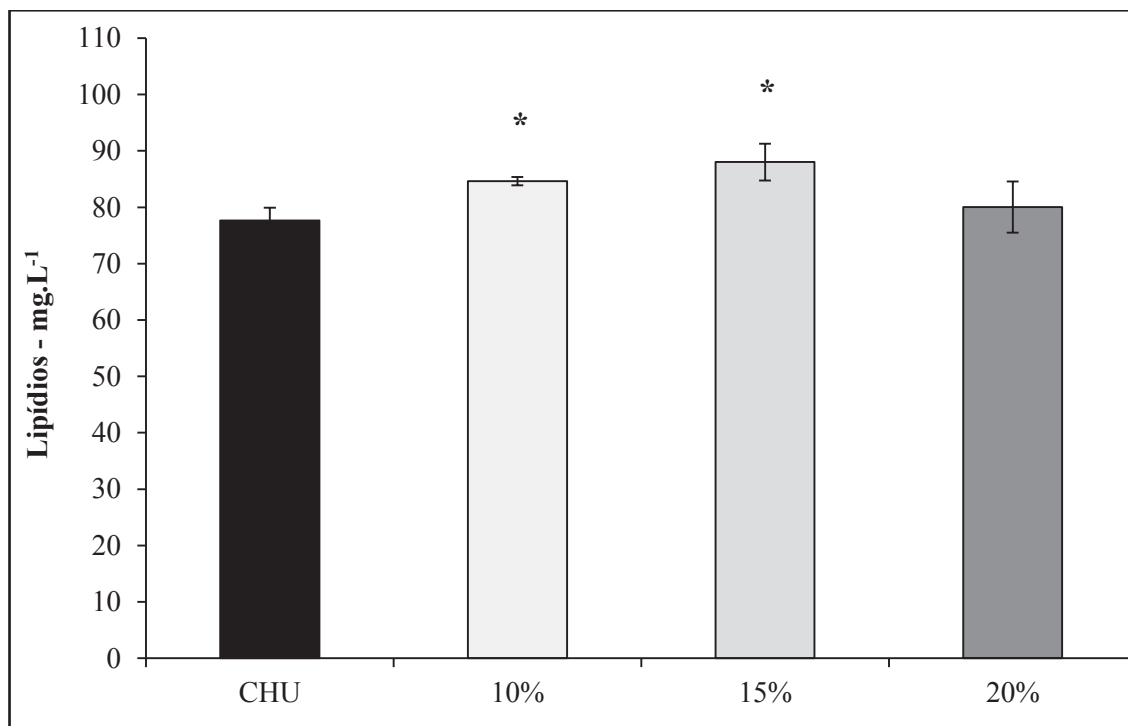


FIGURA 18 – PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS OBTIDOS NOS CULTIVOS COM MEIO CHU E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são \pm erro padrão – * valores com diferenças estatisticamente significativas do meio CHU ($p < 0,05$).

Assim, o preparo do meio alternativo com 20% seria desejado, pois permite alcançar uma produtividade e remediar um maior volume de efluente. Entretanto, para verificar se a concentração de 20% de efluente se configura como a melhor condição de cultivo de microalgas, novos experimentos foram realizados adicionando-se as concentrações de 25 e 30% em uma segunda etapa desse estudo.

5.4.2.3 Segunda Etapa - Meio alternativo com 20%; 25% e 30% de efluente

Quando se utiliza resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos, considera-se mais vantajoso o uso de altas concentrações devido o processo de biodegradação do resíduo que irá ocorrer durante o sistema que reduz o impacto ambiental do material ao ser lançado no ambiente.

Considerando que os cultivos com meio alternativo preparados com, 10%, 15% e 20% de efluente da bovinocultura não apresentaram variações significativas ($p < 0,05$)

quando comparados com meio sintético (CHU) foram realizados mais um grupo de experimentos com 20%, 25% e 30% de efluente.

5.4.2.4 Produção de Biomassa

A FIGURA 19 apresenta o crescimento de biomassa para os cultivos em meio sintético CHU, e efluente em 20%, 25% e 30%, durante 10 dias de cultivo.

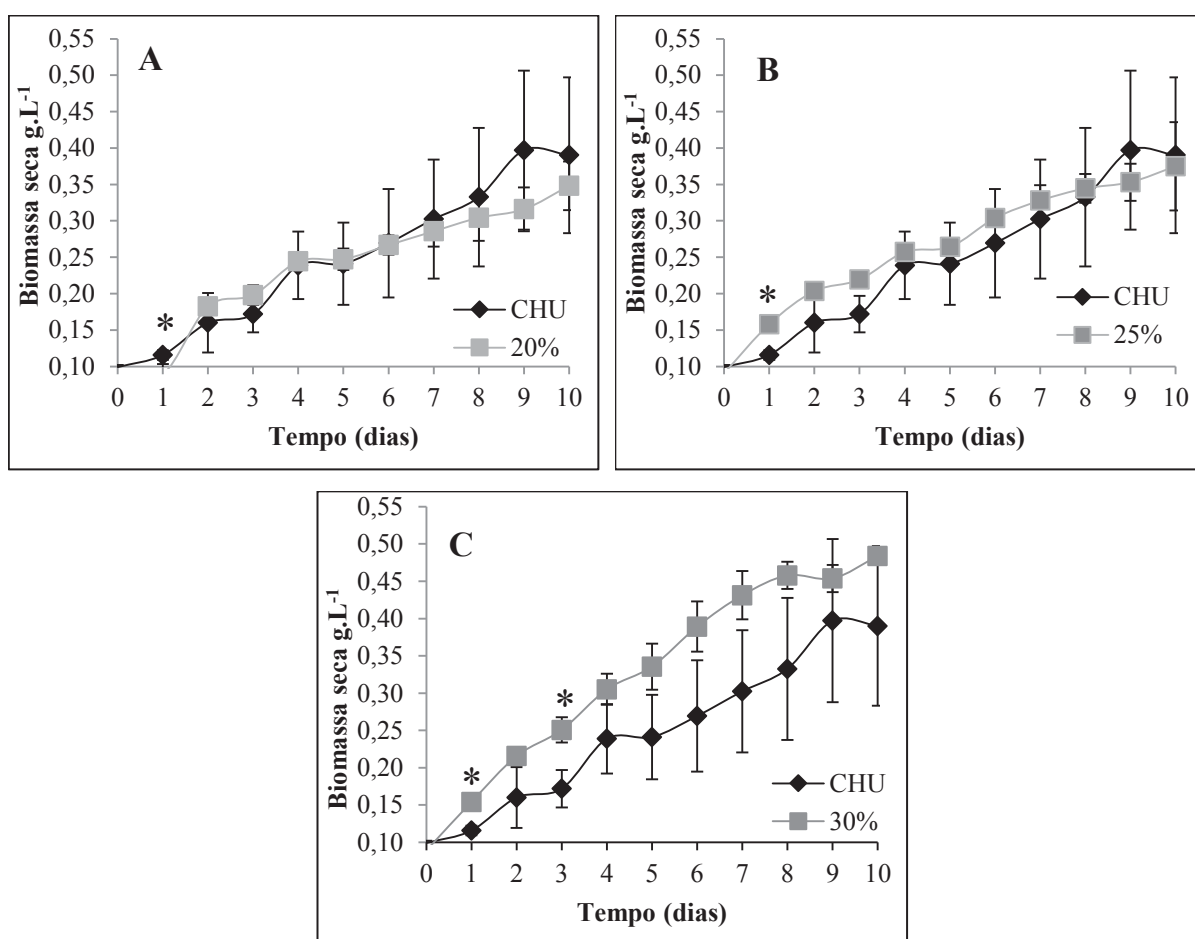


FIGURA 19 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA 2º ETAPA DE EXPERIMENTO COM MEIO CHU E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA COM DILUIÇÕES 20% (A), 25% (B), 30% (C)

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são \pm erro padrão – * valores com diferenças estatisticamente significativas do meio CHU ($p < 0,05$).

Considerando a produtividade em biomassa obtida nesta segunda etapa de experimento, apesar do cultivo com 30% de efluente apresentar valores maiores de

biomassa ($0,48 \text{ g.L}^{-1}$) em relação ao CHU ($0,39 \text{ g.L}^{-1}$) na fase final do experimento, não apresentou uma diferença significativa.

A TABELA 09 apresenta a produtividade de biomassa seca em g.L^{-1} calculada diariamente até o encerramento do cultivo. Podemos observar que a produção de biomassa seca foi semelhante para todos os cultivos durante todo período de cultivo.

TABELA 09 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA DOS CULTIVOS PREPARADOS COM MEIO CHU E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA DO 0 AO 10º DIA g.L^{-1}

DIA	CHU	EFLUENTE 20%	EFLUENTE 25%	EFLUENTE 30%
0	$0,10 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$
1	$0,12 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$
2	$0,16 \pm 0,04$	$0,18 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$
3	$0,17 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,02$
4	$0,24 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,02$
5	$0,24 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,00$	$0,34 \pm 0,03$
6	$0,27 \pm 0,07$	$0,27 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,03$
7	$0,30 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,03$
8	$0,33 \pm 0,10$	$0,30 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,02$
9	$0,40 \pm 0,11$	$0,32 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,02$
10	$0,39 \pm 0,11$	$0,35 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,06$	$0,48 \pm 0,01$

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são \pm erro padrão.

5.4.2.5 Produção de lipídios

Os lipídios totais foram extraídos conforme a metodologia descrita na seção 4.4.2. A FIGURA 20 apresenta o conteúdo lipídico (%) dos cultivos com meio CHU e efluente com 20%, 25% e 30%, embora tenham atingido um acúmulo de lipídios relativamente próximos o meio sintético CHU o efluente com 30% atingiu maior acumulação de lipídios (14,3%) em comparação com as outras concentrações com 20% (13,3%) e 25% (13,6%) de fluente.

As condições de produção das microalgas podem afetar seu metabolismo e, assim, o acúmulo de lipídios na célula. A quantidade lipídica da mesma espécie de microalga pode variar de 1 a 70% (MANDAL; MALLICK, 2009; FRANCISCO *et al.*, 2010), entretanto, a maioria delas não ultrapassam 40% de conteúdo lipídico.

Como descrito na TABELA 02 as microalgas do gênero *Scenedesmus* sp. apresentam teores de lipídeo entre 19 a 20% aproximadamente. Porém as análises de significância mostram que não houve diferença ($p < 0,05$) para nenhum dos cultivos com efluente comparado ao meio CHU.

A FIGURA 21 apresenta o conteúdo lipídico (mg.L^{-1}) do volume de cultivo para os cultivos meio CHU e efluente com 20%, 25% e 30%.

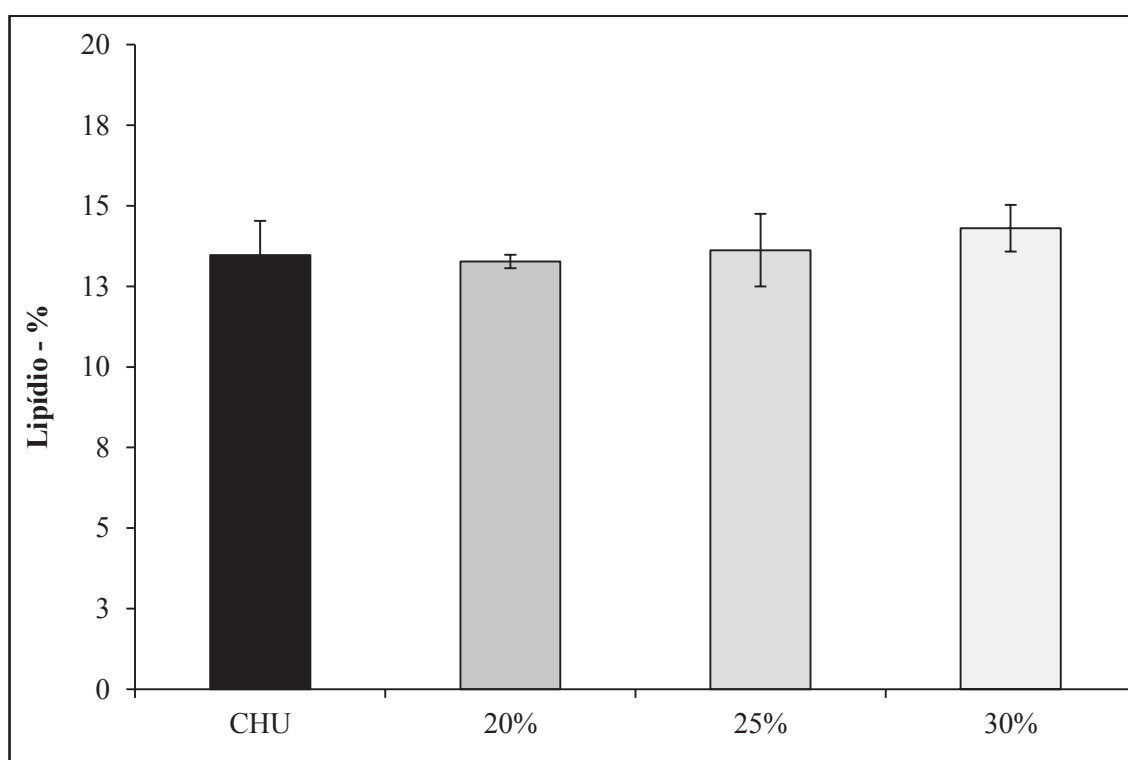


FIGURA 20 – PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS TOTAIS NA BIOMASSA MICROALGAL CULTIVADA EM MEIO CHU E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são \pm erro padrão.

Observa-se que o cultivo com 30% de efluente apresentou maior teor de lipídio em mg.L^{-1} quando comparado aos cultivos com 20% e 25% de efluente. O teste T de *Student* indica que não há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cultivo em meio alternativo com 20% e 25% e o meio sintético, entretanto para o meio com 30% de efluente houve diferença significativa ($p > 0,05$), em relação ao meio CHU, ocorrendo um aumento de aproximadamente de 22 mg.L^{-1} .

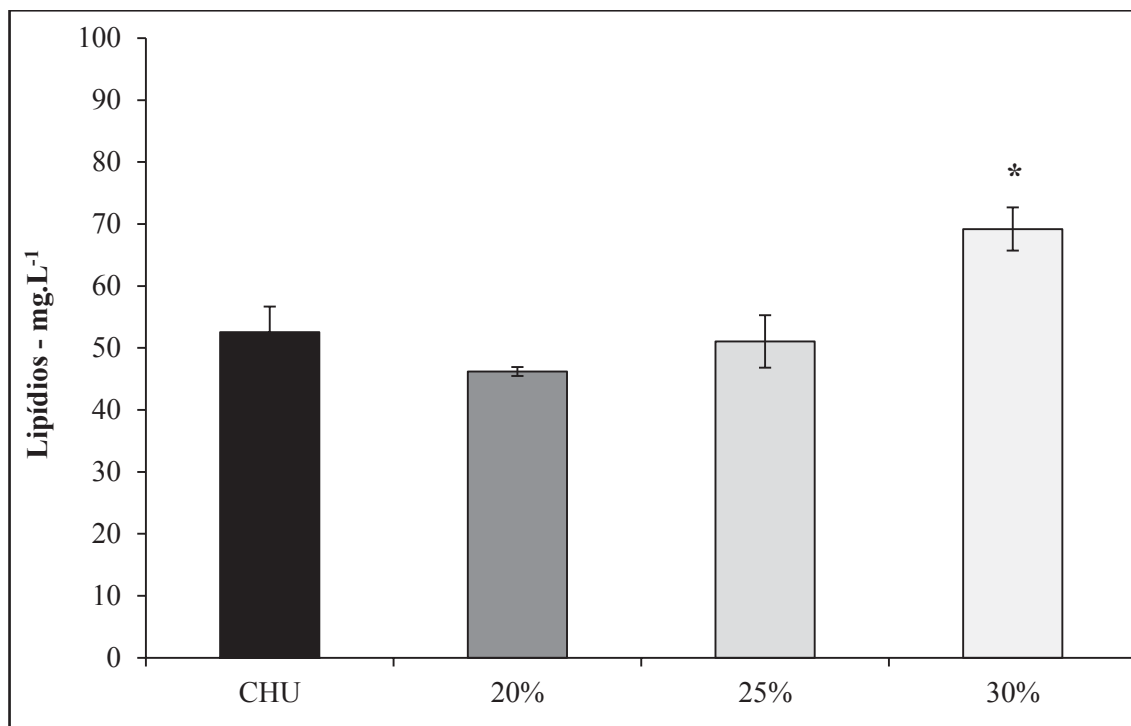


FIGURA 21 – PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS OBTIDOS NOS CULTIVOS COM MEIO CHU E EFLUENTE DE BOVINOCULTURA

Nota: Os resultados representam a média de três experimentos independentes e as barras verticais são \pm erro padrão – * valores com diferenças estatisticamente significativas do meio CHU ($p < 0,05$).

5.5 CAPACIDADE DAS MICROALGAS EM DEPURAR O EFLUENTE DE BIODIGESTOR

A capacidade das microalgas em depurar o efluente foi realizada para a melhor concentração de efluente encontrada nos cultivos anteriores (30%), conforme aparece na seção 4.5.

5.5.1 Análise do efluente bovino biodigerido

A partir da coleta do efluente de biodigestor, obtiveram-se os resultados presentes na TABELA 10 para os parâmetros físico-químicos. O meio preparado para cultivo consistiu no efluente filtrado diluído para que houvesse diminuição da carga orgânica e, assim, não ocorrer à dispersão da luz.

TABELA 10 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EFLUENTE COLETADO E DILUIDO EM 30%

ELEMENTO	CONCENTRAÇÃO INICIAL DO EFLUENTE COLETADO (mg.L ⁻¹)	CONCENTRAÇÃO DO EFLUENTE EM 30% (mg.L ⁻¹)
Fósforo	46,6	29,2
Potássio	632,8	218,0
DBO	186,2	78,2
DQO	1165,7	489,6
Nitrogênio amoniacal (NH ₃)	192,8	81,0
Nitrogênio total	259,6	109,1
Nitrogênio Kjeldahl total	259,6	109,0
Nitrato	0,05	0,1
Nitrito	<0,02	<0,02

5.5.2 Análise do efluente do cultivo de microalgas

Ao final do experimento, foi realizada a análise dos parâmetros físico-químicos do efluente bovino biodigerido, com a concentração de 30%. Os resultados encontram-se na TABELA 11.

O cultivo de microalgas vinculado a um sistema de tratamento de efluente de tem como principais vantagens, a diminuição do custo para produção de biomassa além da reciclagem do efluente através da estabilização dos nutrientes presentes no meio, a agregação de valor ao processo, produção de bioprodutos de interesse comercial, como por exemplo, pigmentos, ácidos graxos, fertilizantes e biocombustíveis como biohidrogênio, biogás e biodiesel (RODRIGUES E BELLI; 2004; CUARESMA *et al.*, 2006).

Para a Demanda Bioquímica de Oxigênio a remoção foi de aproximadamente 22%. Em relação ao fósforo, a remoção foi de 52% da quantidade inicial desse elemento. Já para o nitrogênio amoniacal, 100% da concentração inicial foi removida. Considerou-se a remoção do nitrogênio amoniacal por ser a forma mais reduzida de nitrogênio, com forte indicativo de matéria orgânica. A remoção dos principais compostos que possam acarretar problemas em corpos hídricos como principalmente as demandas de oxigênio, foi satisfatória considerando os valores iniciais de concentração. De acordo com a

resolução CONAMA n° 357/2005, a quantidade final de nutrientes atingida permite o descarte do efluente após o cultivo referente às quantidades de nitrogênio amoniacal.

TABELA 11 – TABELA DA DEPURAÇÃO DO EFLUENTE DE BOVINOCULTURA

ELEMENTO	CONCENTRAÇÃO ENTRADA EFLUENTE 30% (mg.L ⁻¹)	CONCENTRAÇÃO SAÍDA EFLUENTE 30% (mg.L ⁻¹)	EFICIÊNCIA (%)
Fósforo	29,2	14,1	51,9
Potássio	218,0	81,0	62,9
DBO	78,2	60,7	22,4
DQO	489,6	227,1	53,6
Nitrogênio amoniacal	81,0	<1,00	100
Nitrogênio total	109,1	8,2	92,5
Nitrogênio Kjeldahl total	109,0	8,1	92,6
Nitrato	0,1	0,1	0
Nitrito	<0,02	<0,02	100

De acordo com os resultados obtidos na eficiência da remoção da matéria orgânica, as microalgas são relevantes no tratamento de águas residuais, reciclando nutrientes, produzindo oxigênio para a decomposição da matéria orgânica e eliminando odores desagradáveis, e ao mesmo tempo realiza a fotossíntese para produção de biomassa que poderá ser utilizada na produção de biodiesel.

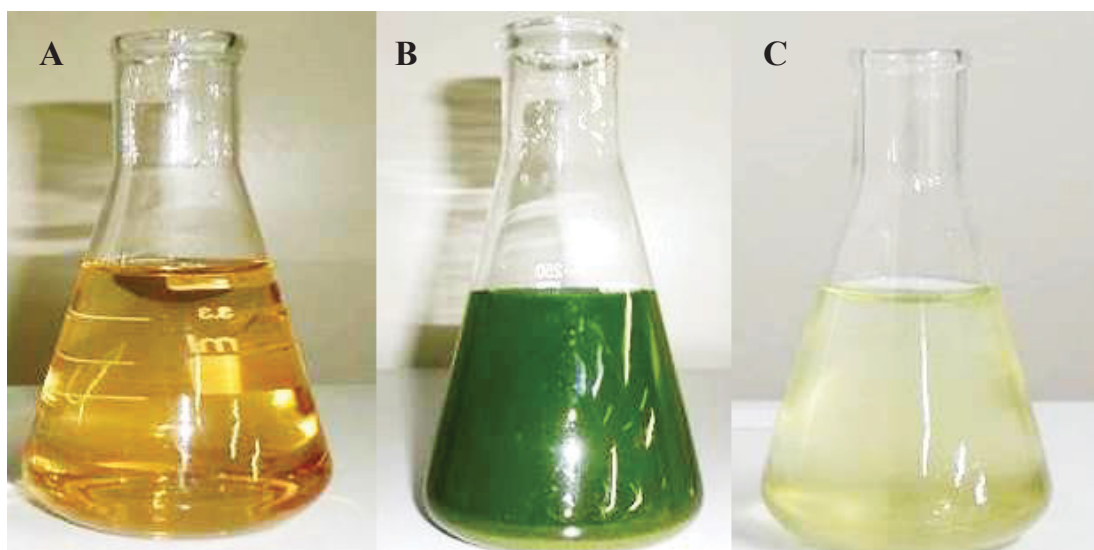


FIGURA 22 – ASPECTO VISUAL DO MEIO DE CULTIVO COM EFLUENTE (30%) – (A) ANTES DE INOCULAR; (B) DURANTE O CULTIVO; (C) APÓS RECUPERAR A BIOMASSA

5.6 PERFIL LIPÍDICO DAS MICROALGAS CULTIVADAS EM MEIO CHU E EFLUENTE

A técnica de cromatografia gasosa foi escolhida por ser um método analítico capaz de identificar a estruturas dos ésteres de biodiesel produzidos no processo de esterificação ou transesterificação.

A composição em ácidos graxos na microalga pode sofrer grandes variações de acordo com as condições de cultivo. A TABELA 12 apresenta a composição em ácidos graxos da microalga *Scenedesmus* sp. ao final dos cultivos.

Essa composição de ácidos graxos no óleo influencia diretamente as propriedades do biodiesel, como o número de cetano, viscosidade, ponto de entupimento a frio, estabilidade oxidativa e índice de iodo (BOAMAR, 2010).

Para que se tenha um biodiesel de alta qualidade é necessário alto teor de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (CHISTI *et al.*, 2007). Já a presença dos poli-insaturados, não é desejável, pois, diminui a estabilidade oxidativa quando presente em grandes quantidades, devido à alta reatividade na presença de oxigênio, aumento da viscosidade e causando corrosão (BOAMAR, 2010).

De acordo com a TABELA 12, a análise do perfil lipídico do óleo da microalga *Scenedesmus* sp. apresentou teores ácidos graxos saturados superior e teores de monoinsaturados iguais quando ao das matérias-primas tradicionais para produção de biodiesel.

TABELA 12 – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NA BIOMASSA DE MICROALGAS DO GÊNERO *Scenedesmus* CULTIVADAS EM MEIO CHU E EFLUENTE COM 30% EM COMPARAÇÃO A RELATOS DA LITERATURA.

ÁCIDOS GRAXOS (g.100g ⁻¹)	COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NA BIOMASSA DE <i>Scenedesmus</i> (%)				
	PRESENTE TRABALHO <i>Scenedesmus</i> sp.		RELATOS DA LITERATURA		
	CHU	30%	1 ^a	2 ^b	3 ^c
C12:0 – Láurico	-	0,5	-	-	-
C14:0 – Merístico	2,8	2,1	-	-	-
C15:0 – Pentadecanoico			2,1	0,1	0,1
C16:0 – Palmítico	30,9	25,7	3,2	0,7	2,5

(continua)

(conclusão)

ÁCIDOS GRAXOS (g.100g ⁻¹)	COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NA BIOMASSA DE <i>Scenedesmus</i> (%)				
	PRESENTE TRABALHO <i>Scenedesmus</i> sp.		RELATOS DA LITERATURA		
	CHU	30%	1 ^a	2 ^b	3 ^c
C17:0 – Heptadecanoic	0,3	-	1,0	8,2	1,9
C18:0 – Esteárico	0,7	0,8	0,9	0,8	0,3
C18:0 – Esteárico	0,7	0,8	-	-	-
C22:0 – Behênico	0,6	0,6	0,7	0,1	1,0
C14:1 – Meristoléico	-	0,7	0,6	0,4	0,3
ÁCIDOS GRAXOS (g.100g ⁻¹)	COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NA BIOMASSA DE <i>Scenedesmus</i> (%)				
	PRESENTE TRABALHO <i>Scenedesmus</i> sp.		RELATOS DA LITERATURA		
	CHU	30%	1 ^a	2 ^b	3 ^c
C15:1 – Pentadecanoico	0,9	0,8	1,6	0,1	1,3
C16:1 – Palmitoléico	4,5	3,4	37,0	36,0	41,0
C17:1 – Heptadecanoic	0,3	0,4	6,3	2,7	2,5
C18:1 – Oléico	19,8	19,6	18,3	16,9	8,0
C20:1 – Eicoseinóico	16,2	20,2	0,7	-	0,1
C18:2 – n6t – Linoléico	5,3	9,2	4,0	3,5	2,7
C18:2 – n6c Linoléico	10,9	9,7	-	-	-
C18:3n3 – Linolênico	1,2	2,4	3,5	17,7	7,6
C22:6n3 Decosahexadienoico (DHA)	4,8	1,1	3,6	0,13	
AGS – Ácido graxos saturados	35,8	31,3	8,0	9,9	5,8
AGMI – Ácido graxos monoinsaturados	41,8	45,1	64,4	55,7	53,2
AGPI – Ácido graxos poliinsaturado	22,7	23,6	11,1	21,4	10,1

FONTE: 1, 2 COSTA; RADMANN (2008); 3 CHEN *et al.*, (2008)

Nota: ^a *Scenedesmus obliquus*; ^b *Scenedesmus nidulans*; ^c *Scenedesmus* sp.

Apesar de afetar a qualidade do biodiesel os ácidos graxos poliinsaturado tem grande importância biotecnológica e alto valor comercial (BELARBI *et al.*, 2000; CHISTI *et al.*, 2007)

Na FIGURA 23 podem ser visualizados os percentuais dos ácidos graxos saturados, monossaturados e poliinsaturados encontrados na biomassa microalgal para o meio CHU e com diluição de 30%.

O cultivo com efluente a 30% apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos ácidos graxos saturados (31,3%) comparado com o meio CHU, já o percentual de ácidos

graxos monoinsaturados (45,1%) e poliinsaturados (14,4%) não apresentaram diferenças significativas.

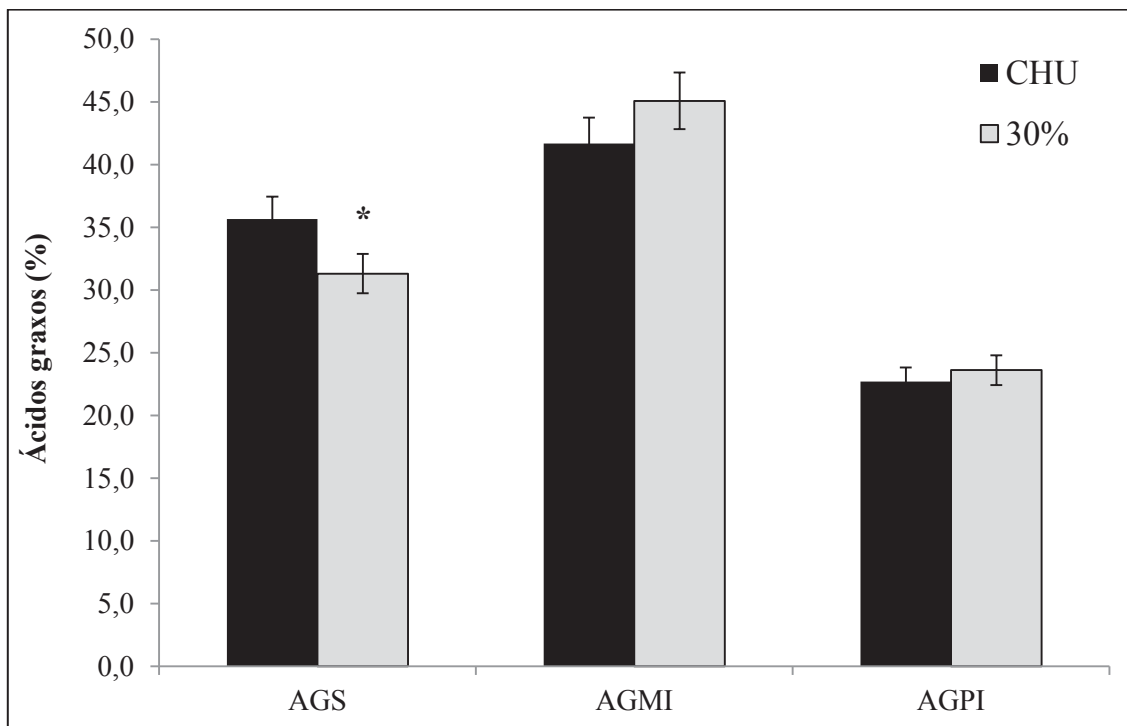


FIGURA 23 – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDIOS DA MICROALGA CULTIVADA EM MEIO CHU E 30% DE EFLUENTE

Nota: * valores com diferenças estatisticamente significativas do meio CHU ($p < 0,05$).

A TABELA 13 apresenta a composição dos ácidos graxos da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em meio sintético e alternativo, comparada com outras três matérias-primas (soja, canola e palma) atualmente utilizadas para produção de biodiesel.

TABELA 13 – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDIOS DA MICROALGA CULTIVADA EM MEIO CHU E 30% DE EFLUENTE COMPARADA COM OUTRAS MATÉRIAS-PRIMAS

ÁCIDO GRAXO – %	MATÉRIA – PRIMA				
	*CHU	*EFLUENTE 30%	SOJA ¹	CANOLA ²	PALMA ³
AGS – Ácidos graxos saturados	35,7	31,3	18,4	8,4	52,9
AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados	41,7	45,1	24,0	63,6	30,2
AGPI – Ácidos graxos poliinsaturado	22,7	23,6	57,0	28,0	16,9
(AGMI + AGPI) / AGS	1,8	2,19	4,4	10,9	1,0

FONTE: ¹ALCANTARA *et al.*, (2000); ²SCHERR; RIBEIRO, (2010); ³MAY *et al.*, (2005).

Nota – * Microalga *Scenedesmus* sp.

Observa-se que a biomassa obtida nesta pesquisa apresenta mais ácidos graxos saturados que a soja e a canola, estes são importantes na produção de biodiesel com alto número de cetano e são menos propensos a oxidação que os compostos insaturados (WEN E CHEN, 2000).

5.7 Viabilidade econômica

A avaliação da economia que um sistema com meio alternativo pode gerar, foi realizada com base no custo da produção do meio de cultivo sintético, considerando entrada de nutrientes, volume de água utilizada.

Considerando os valores apresentados na TABELA 14, para ocorrer um cultivo com meio alternativo, representa uma economia de 60% no custo da produção do meio de cultivo.

TABELA 14 - CUSTO DO MEIO DE CULTIVO CHU E EFLEUNTE DE BOVINOCULTURA

VARIÁVEIS	*MEIO CHU		MEIO COM EFLUENTE	
	Quantidade	Valor	Quantidade	Valor
NUTRIENTES (kg)	7,22	R\$ 70,05	-	-
ÁGUA (m ³)	10	R\$ 62,50	7	R\$ 52,57
TOTAL		R\$ 132,55		R\$ 52,57

6 CONCLUSÕES

Esta pesquisa avaliou a densidade celular, biomassa seca e conteúdo lipídico da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em meio sintético CHU, e meio de cultivo alternativo proveniente de resíduo bovino biodigerido, a fim de definir uma concentração de efluente igual ou melhor comparado com meio CHU, em termos de biomassa e lipídios totais. Desta forma, as principais conclusões do trabalho são:

- Os meios de cultivos formulados a partir do efluente de bovinocultura biodigerido (20% - 30%) apresentaram a mesma eficiência na produção de biomassa seca de microalgas em comparação ao meio de cultivo sintético.
- A produtividade de lipídios na biomassa de microalgas cultivada em meio formulado a partir de resíduo bovino biodigerido foi igual ou maior à condição de controle com meio CHU.
- O cultivo de biomassa de microalgas em resíduo bovino biodigerido promoveu a redução de todos os parâmetros físico-químicos analisados, indicando eficiências na depuração do efluente. Houve redução de 92,5% de nitrogênio total, 51,9% de fósforo, 62,9% de potássio, 53,6% de DQO e 22,4% de DBO.
- A análise da composição de ácidos graxos da *Scenedesmus* sp. cultivada em 30% de resíduo resultou na presença de 31,3% de AGS, 45,1% AGMI e 14,4% de AGPI, correspondendo a teores de insaturados menores que a soja e a canola.

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Apresentam-se as seguintes sugestões para continuação deste trabalho:

- Realizar cultivos de microalga em fotobiorreatores tubulares compactos de 10m³ desenvolvidos pelo NPDEAS para avaliar a produção de biomassa de microalgas em escala piloto.
- Investigar outros efluentes agroindustriais como fonte de nutrientes para cultivo de microalgas em fotobiorreatores, avaliando a eficiência de biorremediação pela remoção dos nutrientes presentes.

- Determinar os teores de produtos de alto valor agregado presentes na biomassa de microalgas como a clorofila, luteína, ácidos graxos poliinsaturados, carboidratos e proteínas.
- Investigar o uso de fontes de CO₂ como emissões industriais com objetivo de aumentar a produção de biomassa e melhorar a qualidade das emissões.
- Avaliar a depuração provocada pelo cultivo de microalgas nos resíduos para outros parâmetros físico-químicos não avaliados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biodiesel>>. Acesso em: 13/11/12.

ALCÂNTARA, F. A.; FURTINI, A. E. N.; PAULA, M. B.; MESQUITA, H. A.; MUNIZ, J. A. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um Latossolo Vermelho-Escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, p. 277-288, 2000.

ALONSO, D. L.; BELARBI, E.; SEVILLA, J. M. F.; RUIZ, R. R.; GRIMA, E. M. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytochemistry**. v. 54, p. 461-471, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12648**: Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com algas (chlorophyceae) Rio de Janeiro, 2011.

BAN-WEISS, G. A.; MCLAUGHLIN, J. P.; HARLEY, R. A.; KEAN, A. J.; GROSJEAN, E.; GROSJEAN, D. Carbonyl and Nitrogen Dioxide Emissions from Gasoline and Diesel Powered Motor Vehicles. **Environ. Sci. Technol.** v. 42, p. 3944–3950, 2008.

BARROCAL, V. M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **Nwe Biotechnology**. v. 27, p. 851–856, 2010.

BECKER, W. E.; VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green algae *Spirulina* in India. **Biomass**. v.4, p.105-125, 1984.

BELARBI, H.; MOLINA, E.; CHISTI, Y. A process for high and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p. 516-529, 2000.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E. S.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia De Microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. v. 26, p. 9-20, 2008.

BOAMAR, P. F. A. **Combustíveis Automotivos: Especificações Técnicas, Tributos e Legislação**. 1. ed. Florianópolis: Insular, 2010.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**. v. 7, p. 3-15, 1995

CHEN, G. Q., JIANG, Y, AND CHEN, F. Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change. **Food Chemistry**. v. 109, p. 88-94, 2008.

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

CHIU, S.; KAO, C.; TSAI, M.; ONG, S.; CHEN, C.; LIN, C. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresour Technol**. v. 100, p. 833-838, 2009.

COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**. v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J. M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 158-162, 2006.

DAL MAGRO, C.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*. In: XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2011, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: Editora da UCS, 2011. 1 CD-ROM.

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

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967, 2006.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**. v. 30, n. 9, p. 1525-1536, 2008.

EGAN, P. F.; TRAINOR, F. R. The role of unicells in the polymorphic *Scenedesmus armatus* (Chlorophyceae). **Journal Phycology**. v. 25, p. 65-70, 1989.

FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. Aquatic photosynthesis. 1 ed. Oxford: Blackwell Science, 1997.

FANGRUI, Ma.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**. v.70, p. 1-15, 1999.

FRANCISCO, E. C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T.T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 85, p. 395-403, 2010.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H. A.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**. v. 20, p. 491-515, 2003.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum, 1975.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**. v. 22, p. 475-476, 1973.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **PNAS**. v. 103, n. 30, p. 11206–11210, 2006.

HOEK, C. V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. London: Cambridge, 1995.

JACINAVICIUS, F. R.; GAMA, W. A.; AZEVEDO, M. T. P.; SANT'ANNA, C. L. **Manual para cultivos de cianobactérias**. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Instituto de Botânica - Núcleo de Pesquisa em Ficologia; Relatório técnico, p. 32, 2006.

JANAUN, J.; ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 1312-1320, 2010.

KOWALSKI, S. C. **Análise da viabilidade técnica econômica do cultivo de microalgas para produção de biodiesel estudo de caso Paranaguá – Estado Do Paraná**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Meio Ambiente) - Setor de Tecnologia, Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento Curitiba, 2010.

LEMOS, J. D. S. **Desenvolvimento de sistema de tratamento e reciclagem de meio de cultivo de microalgas para produção de biodiesel**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Setor de Ciências Tecnológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

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

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

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

LUCAS JR.; SANTOS, T.M.B.; OLIVEIRA, R.A. Possibilidades de uso de dejetos animais no meio rural. **Mudanças Climáticas globais e a agropecuária brasileira**. Jaguariúna, cap.15, p.303-323, 2001.

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

MARKOU, G.; CHATZIPAVLIDIS, I.; GEORGAKAKIS, D. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **World J. Microbiol Biotechnol.** v. 28, p. 2661-2670, 2012.

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

MATSUNAGA, T.; MATSUMOTO, M.; MAEDA, Y.; SUGIYAMA, H.; SATO, R.; TANAKA, T. Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. Strain JPCC GA0024 toward biofuel production. **Biotechnol Lett.** v. 31, p. 1367-1372, 2009.

MAY, C. Y.; LIANG, Y. C.; FOON, C. S.; NGAN, M. A.; HOOK, C. C.; BASIRON, Y. Key fuel properties of palm oil alkyl esters. **Fuel.** v. 84, p. 1717-1720, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/producao-integrada-cadeia-pecuaria>>. Acesso em: 15 nov. 12.

MONYEM, A.; VAN GERPEN, J. H. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. **Biomass & Bioenergy.** v. 20, p. 317-325, 2000.

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Research.** v. 40, p. 2799–2815, 2006.

OLIVEIRA, V. **Manejo de resíduos da pecuária.** Textos acadêmicos. Lavras: UFLA/FAEPE, p.83, 2001.

ORDOG, V.; STIRK, W. A.; BÁLINT, P.; STADEN, J. V.; LOVÁSZ, C. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. **Journal Appl Phycol.** v. 24, p. 907-914, 2011.

PACKER, M. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. **Energy Policy.** v. 37, p. 3428-3437, 2009.

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

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

PIRES, J. C. M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; MARTINS, F. G.; SIMÕES, M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 16, p. 3043-3053, 2012.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. **Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e socioambiental para o Brasil**. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, São Paulo, v. 31, p. 28-37, 2003.

RESOLUÇÃO CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 053, p. 58-63, 18 mar. 2005.

RIBEIRO, R. L. L.; MARIANO, A. B.; DILAY, E.; SOUZA, J. A.; ORDONEZ, J. C.; VARGAS, J. V. C. The temperature response of compact tubular microalgae photobioreactors. **Engenharia Térmica**. v. 8, p. 50-55, 2009.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture. **Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing: Oxford, 2004.

RODOLFI, L.; CHINI, Z. G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 102, n. 1, p. 100-112, 2009.

RODRIGUES, J. B. R.; BELLI, P. F. Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinocultura enriquecido com uréia. **Biotemas**. v. 17, n. 2, p. 7-26, 2004.

SÁNCHEZ, J. F.; FERNÁNDEZ J. M.; ACIÉN, F. G.; RUEDA, A.; PÉREZ-PARRA, J.; MOLINA, E. Influence of culture conditions on the lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Proc Biochem.** v. 43, p. 398–405, 2008.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. **Food Science and Technology.** v. 23, p. 17-21, 2003.

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

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGUG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Resource.** v. 1, n. 1, p. 20-43, 2008.

SCHERR, C.; RIBEIRO, J. P. Gorduras em laticínios, ovos, margarinas e óleos: implicações para a aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** v. 95, n. 1, p. 1-6, 2010.

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

SEAMBIOTIC LTD. **Microalgae Cultivation.** Disponível em: <<http://www.seambiotic.com/Products/seambiotic-biofuel-ltd/>>. Acesso em: 11 dez. 2012.

SHAHID, E. M.; JAMAL, Y. A review of biodiesel as vehicular fuel. **Renew Sustain Energy Reviews.** v. 12, p. 2484-2494, 2008.

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

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regime de cultivo**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

SOARES, L. H. B.; ARAÚJO, E. S.; ALVEZ, B. J. R.; BODDEY, R.; URQUIAGA, S. **Eficiência energética comparada das culturas do girassol e soja, com aptidão para a produção de biodiesel no Brasil**. Seropédica: Embrapa, 2008. Relatório técnico.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURA, E.; ISAMBERT, A. Commercial application of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STANDARD METHODS. **For the Examination of Water and Wastewater**. 21 ed. 2005.

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

SUAREZ, P.A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70º Aniversário do biodiesel em 2007: Evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2068-2071, 2007.

TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E. **Microalga como matéria prima para a produção de Biodiesel**. Rio de Janeiro, 2006.

UMWELT, B. A. **Wasser, Trinkwasser und Gewässerschutz – SCHUTZ der Meere**. Disponível em: <<http://www.umweltbundesamt.de/wasser/themen/meere/mikroalgen.htm>>. Acesso em: 13 jul. 2013.

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

VIDOTTI, E. L., ROLLEMBERG, M. D. Algas: da economia nos ambientes aquáticos a bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-45, 2004.

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

XU, L.; WANG, F.; GUO, C.; LIU, C. Improved algal oil production from *Botryococcus braunii* by feeding nitrate and phosphate in an airlift bioreactor. **Eng. Life Sci.**, v. 12, n. 2, p. 171-177, 2012.

CHEN, P.; MIN, M.; CHEN, Y. F. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. **Int. J. Agric. Biol. Eng.** v. 2, n. 4, p. 1–30, 2009.

ANEXO

CERTIFICADO DE ANÁLISE – PERFIL LIPIDICO DO ÓLEO DE MICROALGA
CULTIVADA EM MEIO CHU

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE TECNOLOGIA
CEPPA - CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS
CENTRO POLITÉCNICO - PRÉDIO DAS USINAS PILOTO - BLOCO B - SALA PP01
CX. P. 19.083 - FONES: (41) 3366-3668 / 3361-3195 - FAX: (41) 3266-1647
e-mail: ceppa@ufpr.br - www.ceppa.ufpr.br - CEP 81531-990 - CURITIBA - PARANÁ

01/02



30 ANOS GARANTINDO QUALIDADE

CERTIFICADO DE ANÁLISE 138055

PRODUTO: CHU
FABRICANTE/PRODUTOR: ----x----
SOLICITANTE: AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA
ENDEREÇO: NPDEAS/UFPR – CURITIBA/PR
PROTOCOLO DE RECEPÇÃO DE AMOSTRA N°: 343 – 08/04/13
AMOSTRA: 1102/13

Informações da amostra			
Acondicionada em:	01 frasco de vidro	Temperatura:	Ambiente
Peso/Volume aproximado de:	14 mL	Responsável pela coleta:	Solicitante

RESULTADOS

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Composição dos Ácidos Graxos:		
- Saturados	g/100 g	35,67
- Monoinsaturados	g/100 g	41,67
- Poliinsaturados	g/100 g	17,37
- Trans - isômeros totais	g/100 g	5,30
- Não identificados	g/100 g	< 0,01
- Outros	g/100 g	< 0,01

REFERÊNCIA


FIRESTONE, P. . Official Methods and Recommended Practices Of the American Oil Chemists Society, AOCS, 5 th, ed., vol I-II, Champaign, 1998 (Método Ce 1F-96)
AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 18th ed. Gaithersburg, 2010. (Método 996.06).
HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab Practice, v. 22, n.8, p. 475-476, 1973.
HOLLAND, B. et al. In: The composition of foods. Mc Cance and Widdowson's, Cambridge, UK, 1994, p.8-9.

Dados do ensaio:

Início: 17/04/13 Término: 16/05/13
Executor: Eriel F. de Andrade

Curitiba, 17 de maio de 2013

/K



Cristiana Mara Guido
Gerente-Técnica (Substituta) e
Coordenadora do Laboratório
CRF - 5891.PR

COMPOSIÇÃO PERCENTUAL EM ÁCIDOS GRAXOS

<i>Ácidos Graxos:</i>	Unidade medida	Resultado
C4:0 - Butírico	g/100 g	0,00
C6:0 – Capríco	g/100 g	0,00
C8:0 – Caprílico	g/100 g	0,00
C10:0 – Cáprico	g/100 g	0,00
C11:0 - Undecanoic	g/100 g	0,00
C12:0 – Laurico	g/100 g	0,00
C13:0 – Tridecanoic	g/100 g	0,00
C14:0 – Merístico	g/100 g	2,78
C15:0 - Pentadecanoico	g/100 g	0,40
C16:0 – Palmitico	g/100 g	30,89
C17:0 - Heptadecanoic	g/100 g	0,28
C18:0 – Esteárico	g/100 g	0,70
C14: - Meristoleico	g/100 g	0,00
C15:1 - Pentadecanoico	g/100 g	0,88
C16:1 - Palmitoleico	g/100 g	4,50
C17:1 - Heptadecanoic	g/100 g	0,26
C18:1n9c – Oleico	g/100 g	19,79
C18:1n-t9 - Elaídico	g/100 g	0,00
C18:2n6t – Linoleico	g/100 g	5,30
C18:2-n6c - Linoleico	g/100 g	10,87
C18:3n3 - Linolênico	g/100 g	1,21
C18:3n6 - Linolênico	g/100 g	0,59
C20:0 – Araquídico	g/100 g	0,00
C20:2 - Eicosadienoic	g/100 g	0,00
C20:3n6 - Eicosatrienoic	g/100 g	0,00
C20:3n3 – Eicosatrienoic	g/100 g	0,00
C20:4n6 – Arachidonico	g/100 g	0,00
C20:5n3 – Eicosapentaenoico	g/100 g	0,00
C20:1 - Eicoseinoico	g/100 g	16,23
C21:0 – Heneicosanoic	g/100 g	0,00
C22:0 – Behênico	g/100 g	0,62
C22:1n9 – Erucico	g/100 g	0,00
C22.2 - Docosadienoico	g/100 g	0,00
C22:6n3 – Docosahexadienoico	g/100 g	4,70
C23:0 - Tricosanoico	g/100 g	0,00
C24:0 - Lingnocérico	g/100 g	0,00
C24:1 – Nervonico	g/100 g	0,00

/K

Curitiba, 17 de maio de 2013


 Cristina Mara Guolo
 Gerente Técnica (Substituta) e
 Coordenadora do Laboratório
 CRF - 5891 PR

OBSERVAÇÃO: - A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA.
 - AS INFORMAÇÕES CONSTANTES NESTE CERTIFICADO DE ANÁLISE SÃO CONFIDENCIAIS E PERTENCENTES AO SOLICITANTE.
 - É PERMITIDA A REPRODUÇÃO, DESDE QUE INTEGRALMENTE E SEM NENHUMA ALTERAÇÃO.

CERTIFICADO DE ANÁLISE – PERFIL LIPIDICO DO ÓLEO DE MICROALGA CULTIVADA EM MEIO COM EFLUENTE DE BOVINOCULTURA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR DE TECNOLOGIA

CEPPA - CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

CENTRO POLITÉCNICO - PRÉDIO DAS USINAS PILOTO - BLOCO B - SALA PP01
 CX. P. 19.083 - FONES: (41) 3366-3668 / 3361-3195 - FAX: (41) 3266-1647
 e-mail: ceppa@ufpr.br - www.ceppa.ufpr.br - CEP 81531-990 - CURITIBA - PARANÁ



30 ANOS, GARANTINDO QUALIDADE!

01/02

CERTIFICADO DE ANÁLISE

138054

PRODUTO: EFLUENTE 30%
FABRICANTE/PRODUTOR: ----x----
SOLICITANTE: AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA
ENDEREÇO: NPDEAS/UFPR – CURITIBA/PR
PROTOCOLO DE RECEPÇÃO DE AMOSTRA N°: 343 – 08/04/13
AMOSTRA: 1103/13

Informações da amostra			
Acondicionada em:	01 frasco de vidro	Temperatura:	Ambiente
Peso/Volume aproximado de:	12 mL	Responsável pela coleta:	Solicitante

RESULTADOS

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Composição dos Ácidos Graxos:		
- Saturados	g/100 g	31,31
- Monoinsaturados	g/100 g	45,08
- Poliinsaturados	g/100 g	14,44
- Trans - isômeros totais	g/100 g	9,17
- Não identificados	g/100 g	< 0,01
- Outros	g/100 g	< 0,01

REFERÊNCIA

FIRESTONE, P., *Official Methods and Recommended Practices Of the American Oil Chemists Society*, AOCS, 5 th, ed., vol I-II, Champaign, 1998 (Método Ce 1F-96)
 AOAC. *Official methods of analysis of AOAC international*. 18th ed. Gaithersburg, 2010. (Método 996.06).
 HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Practice*, v. 22, n.8, p. 475-476, 1973.
 HOLLAND, B. et al. In: *The composition of foods*. Mc Cance and Widdowson's, Cambridge, UK, 1994, p.8-9.

Dados do ensaio:

Início: 17/04/13 Término: 16/05/13
 Executor: Eriel F. de Andrade

Curitiba, 17 de maio de 2013

/K


 Cristina Mara Guolo
 Gerente Técnica (Substituta) e
 Coordenadora do Laboratório
 CRF - 5891 PR


OBSERVAÇÃO: • A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA.
 • AS INFORMAÇÕES CONSTANTES NESTE CERTIFICADO DE ANÁLISE SÃO CONFIDENCIAIS E PERTENCENTES AO SOLICITANTE.
 • É PERMITIDA A REPRODUÇÃO, DESDE QUE INTEGRALMENTE E SEM NENHUMA ALTERAÇÃO.

COMPOSIÇÃO PERCENTUAL EM ÁCIDOS GRAXOS

<i>Ácidos Graxos:</i>	Unidade medida	Resultado
C4:0 - Butírico	g/100 g	0,00
C6:0 - Capríco	g/100 g	0,00
C8:0 - Caprílico	g/100 g	1,02
C10:0 - Cáprico	g/100 g	0,00
C11:0 - Undecanoic	g/100 g	0,00
C12:0 - Laurico	g/100 g	0,49
C13:0 - Tridecanoic	g/100 g	0,00
C14:0 - Merístico	g/100 g	2,14
C15:0 - Pentadecanoico	g/100 g	0,56
C16:0 - Palmitico	g/100 g	25,69
C17:0 - Heptadecanoic	g/100 g	0,00
C18:0 - Esteárico	g/100 g	0,84
C14: - Meristoleico	g/100 g	0,72
C15:1 - Pentadecanoico	g/100 g	0,82
C16:1 - Palmitoleico	g/100 g	3,39
C17:1 - Heptadecanoic	g/100 g	0,35
C18:1n9c - Oleico	g/100 g	19,57
C18:1n-t9 - Elaídico	g/100 g	0,00
C18:2n6t - Linoleico	g/100 g	9,17
C18:2-n6c - Linoleico	g/100 g	9,67
C18:3n3 - Linolênico	g/100 g	2,39
C18:3n6 - Linolênico	g/100 g	1,26
C20:0 - Araquidico	g/100 g	0,00
C20:2 - Eicosadienoic	g/100 g	0,00
C20:3n6 - Eicosatrienoic	g/100 g	0,00
C20:3n3 - Eicosatrienoic	g/100 g	0,00
C20:4n6 - Arachidonico	g/100 g	0,00
C20:5n3 - Eicosapentaenoico	g/100 g	0,00
C20:1 - Eicoseinoico	g/100 g	20,23
C21:0 - Heneicosanoic	g/100 g	0,00
C22:0 - Behênico	g/100 g	0,58
C22:1n9 - Erucico	g/100 g	0,00
C22:2 - Docosadienoico	g/100 g	0,00
C22:6n3 - Docosahexadienoico	g/100 g	1,12
C23:0 - Tricosanoico	g/100 g	0,00
C24:0 - Lingnocérico	g/100 g	0,00
C24:1 - Nervonico	g/100 g	0,00

/K

Curitiba, 17 de maio de 2013



Cristina Mara Guolo
Gerente-Técnica (Substituta) e
Coordenadora do Laboratório
CRF - 5891 PR

OBSERVAÇÃO: • A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA.

• AS INFORMAÇÕES CONSTANTES NESTE CERTIFICADO DE ANÁLISE SÃO CONFIDENCIAIS E PERTENCENTES AO SOLICITANTE.

• É PERMITIDA A REPRODUÇÃO, DESDE QUE INTEGRALMENTE E SEM NENHUMA ALTERAÇÃO.