

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E**  
**BIOTECNOLOGIA**

**LORENZO FERRARI ASSÚ TESSARI**

**DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE MICROALGAS E**  
**CYANOBACTÉRIA UTILIZANDO FÓSFORO PROVENIENTE DA CINZA DE PALMA DE**  
**ÓLEO**

**CURITIBA**

**2017**

**LORENZO FERRARI ASSÚ TESSARI**

**DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE MICROALGAS E  
CIANOBACTÉRIA UTILIZANDO FÓSFORO PROVENIENTE DA CINZA DE PALMA DE  
ÓLEO**

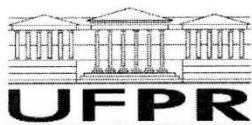
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César de Carvalho

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristine Rodrigues

**CURITIBA**

**2017**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor TECNOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

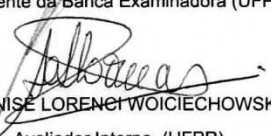
## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LORENZO FERRARI ASSÚ TESSARI** intitulada: "**Desenvolvimento de Meio de Cultivo a partir de Cinza de Palma de Óleo Para Produção de Microalgas e Cianobactérias**", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

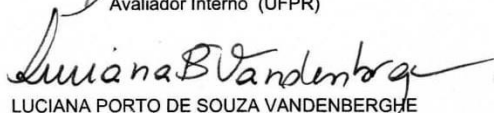
Curitiba, 31 de Março de 2017.

  
JULIO CESAR DE CARVALHO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI

Avaliador Interno (UFPR)

  
LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE

Avaliador Interno (UFPR)

  
CRISTINE RODRIGUES

Co-orientador - Avaliador Externo (UFPR)

  
VALCINEIDE OLIVEIRA DE ANDRADE TANOBE

Avaliador Externo (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela fé e força em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Júlio César de Carvalho pela excelente orientação, pela paciência, por ser um exemplo de profissional e entender as capacidades de cada orientando.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Cristine Rodrigues pela co-orientação e pela paciência em todos os momentos. Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e a todo o corpo docente do programa pela oportunidade, e singular aprendizado proporcionado.

Ao querido Otacílio, e queridas Mitiyo e Natascha pelas risadas, por facilitarem o dia-a-dia e estarem sempre dispostos a ajudar.

Às minhas companheiras de orientação Liliana, Estefania e Denisse que me ajudaram demais nessa caminhada, dando ideias e “quebrando galhos” importantes neste trabalho.

À querida estagiária e bolsista de Iniciação Científica Viviane Oshima, por me auxiliar em diversos experimentos, pela alegria e descontração em momentos laboriosos.

A todos os meus colegas de Pós-Graduação e os amigos de turma, Dão, Déborah, Eriksson, Joyce, Lucas, Luis Pérez, Luis Aleotti, Omar, Patrick, Priscilla e Zulma, pelas risadas e pelo desespero coletivo em algumas disciplinas. Em especial ao André Oliveira, por ser meu parceiro de residência, aguentar minha bagunça e dividir todos os problemas de casa que enfrentamos. À queridíssima colega e amiga Juliana Santana pelas noites viradas de estudo, por dividirmos as angústias, pelos momentos de descontração e por sempre me colocar para cima.

À minha namorada Natália Busatto por me suportar todos os dias quando o desespero tomava conta, por me tranquilizar e incentivar sempre, pela amizade e parceria de todos os momentos, por me acolher de braços abertos em Curitiba e tornar melhor a minha vinda para cá.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Por último, não menos importante, aos meus pais Cláudio e Naygmá, e minha irmã Isabella que apesar de longe, sempre estiveram presentes, acreditando em mim, me dando conselhos e suporte para que essa jornada fosse possível.

## RESUMO

O fósforo (P) é um elemento vital para todos os organismos, porém a alta demanda por este mineral pode levar suas reservas a serem exauridas em algumas décadas. O desperdício deste nutriente e a falta de controle do fluxo de fósforo tem encorajado diversas pesquisas a serem conduzidas no âmbito de reaproveitar o fósforo de uma variedade de resíduos. Assim como outros organismos, microalgas e cianobactérias necessitam de fósforo disponível para o seu crescimento. Estes organismos emergem no cenário mundial como fontes de compostos importantes como proteínas, ácidos graxos e pigmentos. Dessa forma, o presente estudo buscou otimizar a extração ácida do fósforo de cinza de biomassa de palma, e desenvolver meio de cultivo para cianobactéria e microalga, a partir do extrato de cinza de palma. A extração ácida da cinza de biomassa de palma realizada por  $\text{HNO}_3$  sob condições de  $70^\circ\text{C}$ ;  $0,02 \text{ mol H}^+/\text{g}$  de cinza;  $150\text{mL/g}$  de cinza apresentou resultados de  $97,52\%$  de dissolução do fósforo. A otimização realizada através de um planejamento fatorial  $3^3$  indicou que, sob grau de confiança de  $0,05$ , os fatores temperatura e mol de  $\text{H}^+/\text{g}$  de cinza contribuíram significativamente para uma maior dissolução do P, enquanto que a cinética de dissolução do P permitiu concluir que entre 8 e 10h são suficientes para extrair o fósforo esperado da cinza de biomassa de palma. O uso de  $\text{HNO}_3$  foi justificado por ser o acidificante responsável pela extração do P e por ser posteriormente a fonte de nitrogênio no cultivo de microalgas e cianobactéria. A condição de extração  $70^\circ\text{C}$ ;  $0,02 \text{ mol H}^+/\text{g}$  de cinza;  $150\text{mL/g}$  de cinza gerou um meio denominado BAX, com relação N/P de  $16,9/1$ . Ao final de 31 dias, *Spirulina platensis* e *Neochloris oleoabundans*, e ao final de 27 dias *Dunaliella salina*, cultivadas em meio BAX proveniente de extrato de cinza de palma, apresentaram 82, 90 e 100% respectivamente, da concentração observada nos meios controles. As produtividades de  $0,063$ ,  $0,026$  e  $0,021 \text{ g/L.dia}$  foram obtidas para *Spirulina platensis*, *Neochloris oleoabundans* e *Dunaliella salina* respectivamente, apenas com correção de pH e suplementação de NaCl para *Dunaliella salina*. A quantidade de fosfato removida dos cultivos em meio BAX foram semelhantes aos encontrados nos meios controles, onde *Neochloris oleoabundans* e *Dunaliella salina* apresentaram uma remoção quase que completa de fosfato dos meios. O escalonamento com *S. platensis* em um cultivo de 120 litros apresentou concentração de  $1,60 \text{ g/L}$  e produtividade de  $0,045 \text{ g/L.dia}$  após 31 dias de cultivo, mostrando que o cultivo de microalgas e cianobactéria é possível em meio formulado a partir de extrato aquoso de cinza de biomassa de palma.

Palavras-chave: Microalga; extração de fósforo; relação de Redfield; meio de cultura; cinza de biomassa.

## ABSTRACT

Phosphorus (P) is a vital element for all organisms, but the high demand for this mineral may lead its reserves to near exhaustion in a few decades. The waste of this nutrient and the lack of control of the phosphorus flow has encouraged many researchers to study the reuse of the phosphorus from a variety of residues. Like other organisms, microalgae and cyanobacteria also require phosphorus available for their growth. These organisms emerge on the World as sources of important compounds like proteins, fatty acids and pigments. Thus, the present study sought to optimize the acid extraction of the phosphorus from palm oil biomass ash, and to develop a culture media for cyanobacteria and microalgae, from the palm oil biomass ash extract. Acid extraction of palm oil biomass ash by HNO<sub>3</sub> under conditions of 70°C; 0.02 mol H<sup>+</sup>/g of ash; 150mL/g of ash presented results of 97.52% of phosphorus dissolution. The optimization performed through a factorial design 3<sup>3</sup> indicated that, under a confidence level of 0.05, the factors temperature and mols of H<sup>+</sup>/g of ash contributed significantly to a higher dissolution of P, while kinetics of P dissolution allowed to conclude that between 8 and 10 hours are sufficient to extract the expected phosphorus from the palm oil biomass ash. The use of HNO<sub>3</sub> was justified due to its acidification capacity, responsible for the P extraction and also for being later the source of nitrogen in the cultivation of microalgae and cyanobacteria. The extraction condition 70°C; 0.02 mol H<sup>+</sup>/g of ash; 150mL/g of ash generated a media called BAX with N/P ratio of 16.9/1. At the end of 31 days, *Spirulina platensis* and *Neochloris oleoabundans*, and at the end of 27 days *Dunaliella salina*, grown in BAX medium from palm oil ash extract, presented 82, 90 and 100%, respectively, of the concentration observed in the control media. The productivity of 0.063, 0.026 and 0.021 g/L.day were obtained for *Spirulina platensis*, *Neochloris oleoabundans* and *Dunaliella salina* respectively, only with pH correction and NaCl supplementation for *Dunaliella salina*. The amount of phosphate removed from the BAX medium were similar to those found in the control media, where *Neochloris oleoabundans* and *Dunaliella salina* showed almost complete phosphate removal from the media. A scaling up with *S. platensis* in a 120 liter culture showed a concentration of 1.60 g/L and productivity of 0.045 g/L.day after 31 days of growth, showing that the cultivation of microalgae and cyanobacteria is possible in medium formulated from aqueous extract of palm biomass ash.

Keywords: Microalgae; phosphorus extraction; Redfield Ratio; culture media; biomass ash.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
1.1	Objetivo geral	12
1.2	Objetivos específicos	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	13
2.1	Algas – classificação e panorama	13
2.1.1	Microalgas e suas aplicações	15
2.1.2	Tecnologia de microalgas	16
2.1.3	Meios de cultivo e nutrição	20
2.1.3.1	Relação de Redfield	22
2.2	Microrganismos de interesse	24
2.2.1	<i>Spirulina platensis</i>	24
2.2.1.1	Caracterização	25
2.2.1.2	Cultivo	26
2.2.1.3	Importância econômica	27
2.2.2	<i>Neochloris oleoabundans</i>	28
2.2.2.1	Caracterização	29
2.2.2.2	Cultivo	29
2.2.2.3	Importância econômica	30
2.2.3	<i>Dunaliella salina</i>	31
2.2.3.1	Caracterização	31
2.2.3.2	Cultivo	32
2.2.3.3	Importância econômica	34
2.3	Fósforo	34
2.3.1	Visão geral e importância	34
2.3.2	Panorama no mundo	37
2.3.3	Panorama no Brasil	38
2.3.4	Fluxo e desperdício	39
2.3.5	Métodos de captura do fósforo	42
2.3.6	Metodologias colorimétricas de quantificação de fósforo	45
2.3.6.1	Método do ácido ascórbico	46
2.3.6.2	Método do ácido vanadomolibdofosfórico	46
2.3.6.3	Método do cloreto de estanho	47

2.3.6.4	Método do verde malaquita.....	48
2.4	Cinzas de biomassas energéticas.....	49
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
3.1	Caracterização da cinza de palma.....	52
3.1.1	Cromatografia de íons.....	52
3.1.1.1	Preparação da amostra.....	52
3.1.2	Fluorescência de raios x.....	54
3.2	Otimização da extração de fósforo de cinza de palma de óleo.....	55
3.2.1	Planejamento fatorial 3 <sup>3</sup> .....	56
3.2.2	Cinética de extração do fósforo.....	57
3.3	Quantificação de fósforo solúvel.....	58
3.4	Crescimento microalgal a partir de extrato de cinza de palma.....	58
3.4.1	Microrganismos.....	58
3.4.2	Meios de cultivo.....	59
3.4.3	Condições de cultivo.....	61
3.4.4	Escalonamento.....	62
3.4.5	Avaliação de crescimento e consumo de fósforo.....	63
3.4.6	Análise estatística.....	64
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
4.1	Caracterização do material.....	65
4.2	Otimização da dissolução do fósforo.....	68
4.2.1	Planejamento fatorial 3 <sup>3</sup> .....	68
4.2.2	Cinética de dissolução do fósforo.....	74
4.3	Cultivo de cianobactéria e microalga em extrato de cinza de palma.....	76
4.3.1	Formulação do meio de cultivo BAX.....	76
4.3.2	Crescimento de cianobactéria e microalga em extrato aquoso de cinza de palma....	79
4.3.2.1	Cinética de crescimento.....	79
4.3.2.2	Remoção do fósforo solúvel.....	82
4.3.2.3	Escalonamento .....	84
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Sistemas de cultivo aberto com mecanismos de agitação: (a) tipo <i>Raceway</i> com <i>paddle-wheel</i> , (b) tipo circular com rotor central.....	18
Figura 2: Micrografia eletrônica de <i>Spirulina platensis</i> .....	26
Figura 3: <i>Neochloris oleoabundans</i> UTEX-1185.....	29
Figura 4: Células de <i>Dunaliella salina</i> das salinas de Eilat.....	32
Figura 5: Curva prevista para a produção mundial de fósforo.....	36
Figura 6: Localização das minas ativas no Brasil.....	39
Figura 7: Grande ciclo natural do fósforo.....	41
Figura 8: Variações das concentrações de $\text{PO}_4^{3-}$ e P no meio líquido em função do tempo sob pH 2.0 a 11.....	44
Figura 9: Curva de calibração do fosfato.....	46
Figura 10: Cinza de biomassa de palma macerada em almofariz.....	53
Figura 11: Descrição da cromatografia de íons e fluorescência de raios X, utilizadas para a análise da composição química das cinzas de palma de óleo.....	55
Figura 12: Fluxograma da preparação do meio de cultivo BAX.....	60
Figura 13: Cultivo de <i>S. platensis</i> em meios BAX e Zarrouk sob temperatura média de 30°C e intensidade luminosa de 2klux. Imagem registrada no dia 0.....	61
Figura 14: Cultivo de <i>N. oleoabundans</i> em meios BAX e BG 11, <i>D. salina</i> em meios BAX e MJM, sob temperatura média de 25°C e intensidade luminosa de 2klux. Imagem registrada no dia 0.....	62
Figura 15: Tanque de escalonamento de cultivo de <i>S. platensis</i> com meio BAX em estufa externa....	63
Figura 16: Diagrama de Pareto das variáveis estudadas e suas interações.....	70
Figura 17: Médias das variáveis em função da dissolução do P expresso na forma de $\text{P}_2\text{O}_5$ . (a) Médias da temperatura; (b) Médias do número de mols $\text{H}^+$ ; (c) Médias do volume de ácido. A faixa de variação não indica uma triplicata.....	71
Figura 18: Panorama da extração de cátions no Planejamento 3 <sup>3</sup> .....	74
Figura 19: Cinética de dissolução do fósforo (expresso como $\text{P}_2\text{O}_5$ ) em condições proporcionais a 20°C, 0,01 mol de $\text{H}^+$ /g de cinza e 150 mL/g de cinza.....	75
Figura 20: Relação N/P final das condições de dissolução de $\text{P}_2\text{O}_5$ .....	77
Figura 21: Gráfico da relação N/P de cada amostra e seus respectivos mols de $\text{HNO}_3$ .....	78

Figura 22: Cinética de crescimento de <i>S. Platensis</i> em meio controle (Zarrouk) e BAX (extrato aquoso de cinza de palma) avaliado por densidade óptica e massa seca. ....	80
Figura 23: Cinética de crescimento de <i>N. oleoabundans</i> em meio controle (BG 11) e BAX (extrato aquoso de cinza de palma) avaliado por densidade óptica e massa seca.....	81
Figura 24: Cinética de crescimento de <i>D. salina</i> em meio controle (MJM) e BAX (extrato de cinza de palma) avaliado por densidade óptica e massa seca. ....	82
Figura 25: Remoção do fósforo solúvel do meio em função do tempo por <i>Spirulina platensis</i> , <i>Neochloris oleoabundans</i> e <i>Dunaliella salina</i> . ....	83
Figura 26: Cultivo de <i>Spirulina platensis</i> em escala ampliada em estufa.....	85
Figura 27: Variação de temperatura máxima e mínima diária da estufa externa onde realizou-se o escalonamento com <i>S. platensis</i> em meio BAX.....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos grupos algais. ....	14
Tabela 2: Produção de microalgas em larga escala. ....	16
Tabela 3: Amostra de espécies de algas com capacidade de fixação de poluentes. ....	20
Tabela 4: Relação N/P de meios comerciais de cultivo de microalgas. ....	23
Tabela 5: Composição do meio Zarrouk. ....	27
Tabela 6: Composição do meio BG-11. ....	30
Tabela 7: Composição do <i>Modified Johnson's Medium</i> . ....	33
Tabela 8: Faixas de concentração para diferentes comprimentos de onda no método do ácido vanadomolibdofosfórico. ....	47
Tabela 9: Composição de diferentes cinzas de resíduos de palma reportados na literatura. ....	51
Tabela 10: Condições das variáveis adotadas no experimento. ....	56
Tabela 11: Tabela com os tempos de coleta das amostras para análise de fósforo. ....	57
Tabela 12: Caracterização da cinza de palma por fluorescência de raio x e cromatografia de íons. ....	67
Tabela 13: Resultado da recuperação de $P_2O_5$ no planejamento fatorial $3^3$ . ....	69
Tabela 14: Resultado da recuperação de cátions no planejamento fatorial $3^3$ . ....	73
Tabela 15: Relação N/P e mmol de P extraído na amostra das condições com 0,02 mol de $H^+$ /g de cinza. ....	78
Tabela 16: Concentrações iniciais de P e N nos meios padrões e nos meios BAX. ....	79

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso de biomassa vegetal como fonte de energia vem tomando proporções maiores no mundo devido à exigência por parte de fatores ambientais e socioeconômicos. Com o crescimento do uso de biomassa (madeira, bagaço de cana, torta de palma, etc.), vem o aumento da quantidade de cinza residual gerada na queima, que apesar de ser menos tóxica que cinzas de carvão, pode causar problemas ambientais (AHMARUZZAMAN, 2010).

A constituição da biomassa vegetal é variável e depende de fatores como solo, tipo de biomassa, e colheita (THY et al., 2006). A composição das cinzas de biomassa tem sido investigada intensivamente. Tendo-se conhecimento sobre sua composição, é possível elaborar um destino ecológico que se enquadre melhor para cada tipo de resíduo.

Diferentes tipos de cinzas possuem diferentes composições, mas sempre contém micro e macronutrientes importantes, que em muitos casos não são recuperados, e conseqüentemente liberados no meio ambiente. O fósforo se enquadra nestes elementos, pois além de ser um nutriente de vital importância para os seres vivos, é insubstituível e de recurso limitado (CORNEL; SCHAUM, 2009).

O potencial e a necessidade de liberação e recuperação de fosfato das cinzas estão sendo explorados de acordo ao aumento nos preços da rocha fosfática. A busca por reciclagem de fósforo se dá devido ao fato deste elemento ser crucial no setor agrônômico, porém, a aplicação direta de cinzas incineradas na agricultura tem sido dificultada devido ao alto conteúdo de metais pesados, considerados tóxicos tais como chumbo e cádmio (HAVUKAINEN et al., 2016).

Além de ser fundamental na estrutura e no crescimento vegetal, na nutrição animal, o fósforo está entre os elementos primordiais para o crescimento microalgal. As microalgas oferecem várias vantagens potenciais sobre as culturas agrícolas tradicionais em termos de sua utilidade como matéria-prima para a produção de combustível em grande escala, além de serem fontes de importantes produtos como proteínas, óleos e pigmentos (MCGINN et al., 2011), e estarem vinculadas a aspectos ambientais, na mitigação de gases intensificadores do efeito estufa e na suplementação de estações de tratamento de efluentes (WALTER, 2011).

Por outro lado, um grande aporte de nutrientes como nitrogênio e fósforo são requeridos para o cultivo em pequena e em larga escala destes microrganismos. Nutrientes disponíveis naturalmente

como em fluxos de efluentes podem ser assimilados por microalgas evitando o desperdício e diminuindo custos de processos (KOUHIA; HOLMBERG; AHTILA, 2015).

Embora a biomassa algal contenha menos de 1% de P (fósforo), este nutriente está frequentemente associado a condições limitantes de crescimento de algas na biotecnologia (RICHMOND, 2004). Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de métodos sustentáveis de reciclagem e conservação de resíduos ricos em P, pois recuperado, pode ser utilizado como nutriente mineral para o cultivo de microalgas e cianobactérias.

### 1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver meio de cultivo para produção de microalgas utilizando como fonte de fósforo a cinza de biomassa de palma.

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade de uso de cinzas de biomassa de palma como fonte de fósforo, a partir da análise de dados da literatura;
- Caracterizar quimicamente a cinza de torta de palma de óleo (dendê);
- Otimizar a extração do fósforo contido nas cinzas de biomassa de palma e avaliar a cinética do processo;
- Realizar cultivos de microalgas (*Neochloris oleoabundans* e *Dunaliella salina*) e cianobactéria (*Spirulina platensis*) utilizando meio desenvolvido a partir de cinza de biomassa de palma, e avaliar a produtividade de biomassa microalgal.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ALGAS – CLASSIFICAÇÃO E PANORAMA

Por definição, o termo “alga” não forma um padrão taxonômico, e é rotineiramente usado para indicar um grupo polifilético artificial não coesivo com um talo não diferenciado em raízes, caule e folhas, apresentando clorofila *a* e que promove a evolução do oxigênio na fotossíntese (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; TOMASELLI, 2004). Algumas algas se tornaram heterotróficas secundariamente, absorvendo moléculas orgânicas complexas por organotrofia ou heterotrofia, mas ainda mantendo afinidades genéticas fundamentais com seus parentes fotossintéticos (BELLINGER; SIGEE, 2010).

A imensa diversidade de tamanho variando do picoplâncton (0,2 – 2,0 µm em diâmetro) até gigantes de 60 metros de comprimento, ecologia, hábitos coloniais, estrutura celular, morfologia, pigmentos, produtos de reserva, refletem as origens evolucionárias deste grupo heterogêneo de organismos, e promovem sua classificação taxonômica (TABELA 1).

As células dos organismos presentes nas divisões Cyanophyta e Prochlorophyta são de caráter procarionótico, ou seja, basicamente não são compartimentadas por membranas (ausência de organelas e de retículo endoplasmático), e os cromossomos, circulares, situam-se em uma zona central do citosol. As outras 9 divisões possuem suas células compartimentadas em organelas, membrana celular composta de polissacarídeos, e os cromossomos, lineares e dotados de telômeros, estão localizados em um núcleo circundado por uma dupla membrana porosa; além disso, um citoesqueleto composto de microtúbulos de tubulina e de microfilamentos de actina está presente (REVIERS, 2007).

As algas podem ser encontradas em diferentes ambientes, sendo eles aquáticos ou subaéreos. Algas aquáticas podem ser encontradas em praticamente qualquer ambiente desde a nascente de água doce até lagos salinos, com tolerância a uma ampla gama de pH, temperatura, turbidez e concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Podem ser planctônicos vivendo em qualquer porção de água iluminada ou bentônicos unidas em pedras (epilíticas), em lama ou areia (epipélica), em outras algas ou plantas (epífitas) ou em animais (epizóicos) (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Tabela 1: Classificação dos grupos algais.

Reino	Divisão	Classe
<b>Procaryota</b>	Cyanophyta	Cyanophyceae
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae
<b>Eukaryota</b>	Glaucophyta	Glaucophyceae
	Rhodophyta	Bangiophyceae
		Florideophyceae
		Chrysophyceae
		Xanthophyceae
		Eustigmatophyceae
	Heterokontophyta	Bacillariophyceae
		Raphidophyceae
		Dictyochophyceae
		Phaeophyceae
	Haptophyta	Haptophyceae
	Cryptophyta	Cryptophyceae
	Dinophyta	Dynophyceae
	Euglenophyta	Euglenophyceae
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae
	Chlorophyta	Prasinophyceae
		Chlorophyceae
		Ulvophyceae
		Cladophorophyceae
		Bryopsidophyceae
Zygnematophyceae		
Trentepohliophyceae		
Klebsormidiophyceae		
Charophyceae		
Dasycladophyceae		

Fonte: BARSANTI; GUALTIERI, 2006.

O grupo “alga” abrange macroalgas e uma variedade de microrganismos denominados microalgas. Nos âmbitos da ficologia, microalga refere-se a alga microscópica *sensu stricto*, e bactérias fotossintéticas oxigênicas, formalmente conhecidas como Cyanophyceae e Prochlorophyceae. As microalgas são espécies unicelulares variando de alguns micrômetros a centenas de micrômetros, estimando-se um número de espécies de  $2 \times 10^5$  a  $8 \times 10^5$ . São principalmente distribuídas em corpos aquáticos (água doce ou marinha) mas podem ser encontradas na superfície de vários tipos de sólidos. Esses microrganismos formam a base da cadeia alimentar marinha e produzem cerca de 50% do oxigênio inalado pelos seres humanos (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; KIM, 2015; TOMASELLI, 2004).

### 2.1.1. Microalgas e suas aplicações

As microalgas são uma fonte promissora de vários compostos bioativos importantes que incluem polímeros, peptídeos, ácidos graxos, carotenóides, toxinas e esteróis (CARDOZO et al., 2007).

Em alguns países, muitas espécies de microalgas são cultivadas comercialmente e utiliza-se a biomassa produzida como fonte de produtos para aplicação na indústria de alimentos. As principais microalgas cultivadas comercialmente são espécies dos gêneros *Chlorella*, (Chlorophyceae) e *Arthrospira* (Cyanophyceae) para a adição em alimentos naturais, *Dunaliella salina*, (Chlorophyceae) para a obtenção de betacaroteno e *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) para a obtenção de astaxantina. A aplicação mais comum tem sido na aquicultura, para a nutrição direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos forrageiros de interesse econômico (DERNER et al., 2006).

Suas aplicações não se restringem apenas a nutrição humana e animal (TABELA 2), estes microrganismos são também amplamente utilizados na confecção de produtos farmacêuticos. Entre as cianobactérias, *Arthrospira sp.* tem sido submetida a numerosos e rigorosos estudos toxicológicos que têm destacado suas potenciais aplicações terapêuticas na área de imunomodulação, anticancerígenos, antivirais e efeitos de redução do colesterol (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). No início dos anos 2000, várias empresas de cosméticos começaram a lançar produtos que utilizam extratos de microalgas como *Chlorella*, *Arthrospira*, *Anacystis*, *Halymenia*, *Nannochloropsis*, e *Dunaliella* que agem na epiderme apagando imperfeições vasculares impulsionando a síntese de colágeno, prevenindo a formação de rugas (KIM, 2015).

Os lipídeos presentes nas microalgas podem ser convertidos em biodiesel, carboidratos em etanol e H<sub>2</sub>. O biocombustível de origem microalgal pode ser processado através de conversão termoquímica e bioquímica. O processo termoquímico pode ser dividido em gaseificação, liquefação, pirólise e combustão direta, enquanto o processo bioquímico pode ser dividido em digestão anaeróbica, fermentação e atividade fotobiológica (KIM, 2015; ONCEL, 2013).

Para os processos de extração do óleo, o produto resultante pode ser convertido em biodiesel através de um processo chamado transesterificação. O biodiesel proveniente de microalgas tem

propriedades físicas e químicas similares ao diesel de petróleo e biodiesel de primeira geração de culturas oleaginosas, além de ser derivado de biomassa e, portanto, renovável e biodegradável (BRENNAN; OWENDE, 2010).

O emprego de biomassa microalgal em áreas como agricultura também é observado via produção de biofertilizantes para o solo, bem como na captura de CO<sub>2</sub>, produção de bioenergia e no tratamento de águas residuais de processos industriais, para detoxificação biológica e remoção de nutrientes e metais pesados (KIM, 2015).

Tabela 2: Produção de microalgas em larga escala.

Microalga	Produção Anual	País Produtor	Aplicação e Produto	Preço (euro)
<i>Spirulina</i>	3000 toneladas massa seca	China, Índia, EUA, Myanmar, Japão	Nutrição Humana	36 kg <sup>-1</sup>
			Nutrição Animal	
			Cosméticos	
<i>Chlorella</i>	2000 toneladas massa seca	Taiwan, Alemanha, Japão	Ficobiliproteínas	11 mg <sup>-1</sup>
			Nutrição Humana	36 kg <sup>-1</sup>
			Cosméticos	
<i>Dunaliella salina</i>	1200 toneladas massa seca	Austrália, Israel, EUA, Japão	Aquicultura	50 L <sup>-1</sup>
			Nutrição Humana	
			Cosméticos	
<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	500 toneladas massa seca	EUA	β-caroteno	215–2150 kg <sup>-1</sup>
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 toneladas massa seca	EUA, Índia, Israel	Nutrição Humana	
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 toneladas de Ácido docosahexaenóico	EUA	Aquicultura	50 L <sup>-1</sup>
			Óleo DHA	43 g <sup>-1</sup>
<i>Shizochytrium</i>	10 toneladas de Ácido docosahexaenóico	EUA	Astaxantina	7150 kg <sup>-1</sup>
			Óleo DHA	43 g <sup>-1</sup>

Fonte: BRENNAN; OWENDE, 2010.

### 2.1.2. Tecnologia de microalgas

A produção em grande escala de biomassa microalgal é justificada por vários benefícios: são fáceis de cultivar, possuem alta taxa de crescimento em relação a cultivos na agricultura, requerem pouca área para sua produção, podem utilizar água imprópria para o consumo humano, entre outros (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Fatores ambientais, como a intensidade luminosa e a fonte de nitrogênio, são bem conhecidos por influenciar o crescimento do microrganismo fotossintético. Na

ausência de qualquer outro fator limitante, a concentração celular aumenta com a intensidade da luz até alcançar a concentração máxima de biomassa que é denominada "nível de saturação". Intensidades de luz superiores ao nível de saturação provocam danos ao aparelho fotossintético celular devido a um fenômeno nomeado "fotooxidação" ou "fotoinibição" (BEZERRA et al., 2012).

Outro aspecto importante é a configuração do reator, que pode ter impacto no crescimento celular. Fotobiorreatores adequadamente concebidos podem reduzir a área de cultivo para uma distribuição vertical e aumentar a superfície exposta à luz, aumentando assim a concentração celular. Os reatores tubulares permitem uma melhor distribuição da luz e, conseqüentemente, uma maior eficiência fotossintética em relação aos mini-tanques convencionais (CARVALHO et al., 2004; TORZILLO et al, 1986), onde as células estão sujeitas a radiação luminosa total na superfície e escuridão no fundo (BEZERRA et al., 2012).

Primariamente, duas classificações de cultivos de microalgas são conhecidas, os sistemas abertos, e os fotobiorreatores fechados. Variações desses cultivos emergiram e hoje constituem os cultivos híbridos (combinados de sistemas fechados e abertos), cultivo heterotrófico (ausência de luz) e sistemas de cultivo integrados (RYAN et al., 2009).

Os sistemas abertos são muitas vezes implementados por serem simples, apresentarem menor custo e possuírem uma relativa acessibilidade, - atualmente são os métodos mais comuns de cultivo e os de maiores volumes. Estes sistemas são compostos por uma ou várias *Open Ponds* (Lagoas Abertas), preexistentes ou artificiais, que são expostos à atmosfera abrigados ou não em estufas. Uma variedade de formas podem ser observadas como circular, lagoa ou do tipo *raceway* (RYAN et al., 2009):

- Lagoas naturais e artificiais: Podem ser utilizadas para o cultivo de microalgas apenas em caso de condições climáticas adequadas e na presença de elementos necessários na água em termos de salinidade e pH.
- *Raceway*: um sistema com um ou vários tanques em forma de *looping* fechados recirculantes. Em uma parte do tanque há uma pá giratória conhecida como *paddle-wheel* que cria um fluxo no líquido, garantindo boa capacidade de mistura. Bombas ou defletores para circulação de nutrientes e gás também são observados (FIGURA 1a).

– Circular: lagoas artificiais rasas cilíndricas com o sistema de agitação promovido por um rotor central. Apresentam uma limitação de tamanho onde sistemas com um diâmetro grande apresentam um alta despesa com energia para realizar a rotação do rotor (FIGURA 1b).

– Inclínadas (sistema em cascata): superfície inclinada, na qual uma fina camada de meio desce ao longo da superfície. A agitação é criada pela turbulência causada pela gravidade.

A principal desvantagem dos sistemas abertos é a exposição ao ambiente externo, o que torna o cultivo sensível ao clima, promove um difícil controle de temperatura e iluminação, e facilita a contaminação com outros organismos (VOLOSHIN et al., 2016).

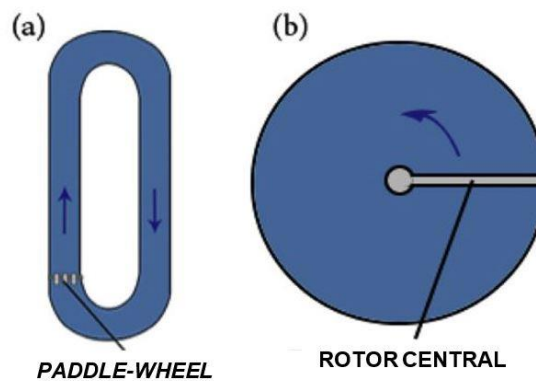


Figura 1: Sistemas de cultivo aberto com mecanismos de agitação: (a) tipo *Raceway* com *paddle-wheel*; (b) tipo circular com rotor central.

Fonte: Adaptado de: VOLOSHIN et al., 2016.

O uso de fotobiorreatores fechados tem como objetivo superar limitações biológicas e barreiras ambientais que são presentes nos sistemas abertos. Estes sistemas são mais complexos e por esse motivo espera-se uma maior densidade de biomassa. O fotobiorreator pode ser descrito como um cultivo fechado que é projetado para utilizar luz na produção controlada de biomassa, fornecer CO<sub>2</sub> suficiente para a cultura e ter condições específicas de cultivo. O modo de distribuição da luz pode ser *Indoor* (utilizam geralmente luzes artificiais) ou *Outdoor* (utilizam a luz do dia e em alguns casos luz artificial adicional). Uma grande vantagem dos cultivos fechados é o espalhamento da cultura que cria uma recepção de luz mais homogênea, promovendo um melhor rendimento (BEZERRA et al., 2012; RYAN et al., 2009; VOLOSHIN et al., 2016). Diferentes formas de fotobiorreatores podem ser encontradas:

- Tubular: sistema de tubos transparentes ou opacos (com iluminação interior), geralmente feitos de plástico ou vidro nos quais o meio flui com a ajuda da bomba. O diâmetro do tubo é limitado a fim de permitir a penetração da luz. Os tubos são conectados com os sistemas de troca de gás e calor. De acordo com a forma dos tubos, os biorreatores podem ser horizontais, serpentinados, verticais, inclinados, cônicos e helicoidais.
- *Flat*: Uma fina camada de meio flui através da superfície plana transparente. A superfície pode ser vertical ou inclinada. Apresentam uma grande área de iluminação, porém, estes biorreatores têm baixa capacidade de controle de temperatura em comparação com os tubulares.
- Coluna: colunas verticais transparentes preenchidas com meio de cultivo que são aeradas a partir da base. Promovem uma boa mistura do conteúdo, e uma boa transferência de massa, porém se trata de um sistema relativamente caro.

Fotobiorreatores fechados fornecem menores riscos de contaminação, uma menor área de ocupação e uma produtividade volumétrica relativamente maior que os sistemas abertos, todavia, um sistema de alto grau de controle requer valores maiores de investimento (CHISTI, 2007; SILVA BENAVIDES et al., 2013; VOLOSHIN et al., 2016).

Na maioria das culturas microalgais o crescimento e por divisão celular não é simultâneo à acumulação de lípidos, e por isso um processo de cultivo híbrido pode ser empregado para aumentar a concentração da cultura e, em seguida, promover a acumulação de lípidos. Este processo de dois passos é caracterizado como sistema híbrido que traz benefícios de ambos os sistemas fechados e sistemas abertos. No primeiro passo, um grande inóculo rico em nutrientes é produzido em um fotobiorreator fechado, promove a divisão celular e minimiza as chances de contaminação. O segundo passo é tipicamente conduzido em lagoas abertas ou *raceway*, com baixo teor de nitrogênio, para promover a biossíntese de lípidos. O resultado esperado é alta biomassa com alto teor de óleo (RYAN et al., 2009).

A fermentação heterotrófica já alcançou eficiência econômica para determinadas indústrias de produtos de saúde e farmacêuticos, bem como para detergente, roupa e fibras de tapete. Os sistemas heterotróficos são semelhantes aos biorreatores de cultivo fechado utilizando tanques de aço inoxidável.

As principais características são que a alta densidade celular é alcançada com insumos orgânicos (açúcar), ambiente com pouco luminosidade e baixa umidade (RYAN et al., 2009).

Os sistemas de cultivo integrados combinam tratamento de águas residuais com produção de biomassa de microalgas. Esta abordagem difere das outras vias de cultivo na sua capacidade de funcionar como um sistema polivalente direcionando para processos como biorremediação, tratamento de águas residuais, produção de metano e biofertilizantes, reciclagem de nutrientes, e na utilização de resíduos ricos em amônia e fosfato para suportar o cultivo microalgal (MCGINN et al., 2011; RYAN et al., 2009).

A capacidade de certas espécies de algas absorverem ou "corrigirem" nutrientes, dióxido de carbono, metais, outros contaminantes e crescerem em efluentes de águas municipais permitem o uso destes microrganismos em processos ambientais (TABELA 3) (RYAN et al., 2009). Embora atualmente este recurso não seja muito empregado para acumular grandes quantidades de biomassa, estudos mostram que a integração intensiva de tratamento de águas residuárias, ou outros resíduos, com cultivo microalgal de larga escala, pode fornecer indicadores que permitam a geração de quantidades significativas de biocombustíveis e/ou bioenergia (MAHDY et al., 2014; MARKOU et al., 2015; MCGINN et al., 2011).

Tabela 3: Amostra de espécies de algas com capacidade de fixação de poluentes.

<b>Espécie algal</b>	<b>Toxina Fixada/Patógeno Inativado</b>
<i>Chlorella spp.</i>	Cobre (varia com o pH)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Alumínio e efluentes farmacêuticos
<i>Scenedesmus abundans</i>	Cádmio, Cobre
Consórcio heterogêneo Alga-bactéria	<i>E.coli</i> e outros patógenos

Fonte: RYAN et al., 2009.

### 2.1.3. Meios de cultivo e nutrição

A manutenção correta de cepas de microalgas depende da escolha dos meios de cultura e dos parâmetros da cultura. Esse meio deve suprir todas as necessidades nutritivas do microrganismo para a síntese do material celular e a produção de metabólitos de interesse industrial.

Ao escolher um meio de cultura, o *habitat* natural da espécie em questão deve ser levado em consideração para se determinar suas exigências ambientais, sendo importante saber se o ambiente é eutrófico, rico em nutrientes, ou oligotrófico, pobre em nutrientes (ANDERSEN, 2005; BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Paralelamente a estratégia nutricional também deve ser conhecida em termos de "como" e "quais" nutrientes são captados por estes microrganismos. É conhecido que as algas utilizam uma complexa faixa de estratégias nutricionais para sua sobrevivência e reprodução. Grande parte do grupo de algas é considerada fotoautotrófica, ou seja, que depende inteiramente do aparelho fotossintético para suprir suas necessidades metabólicas. Por outro lado, outras formas de nutrição são encontradas, possibilitando a classificação de nutrição algal em 4 grupos (BARSANTI; GUALTIERI, 2006):

- Heterotróficas Obrigatórias: são principalmente heterotróficas, porém, são capazes de se sustentar por fototrofia quando as concentrações orgânicas limitam o crescimento heterotrófico (por exemplo, *Gymnodium gracilentum*, Dinophyta).
- Fototróficas Obrigatórias: O seu modo primário de nutrição é por fototrofia, mas podem suplementar o crescimento por fagotrofia e/ou osmotrofia quando a luz é limitante (por exemplo, *Dinobryon divergens*, Heterokontophyta).
- Mixotróficas facultativas: Podem crescer igualmente bem por fototrofia e por heterotrofia (por exemplo, *Fragilidium subglobosum*, Dinophyta).
- Mixotróficas obrigatórias: O seu modo primário de nutrição é a fototrofia, mas a fagotrofia e/ou a osmotrofia fornecem substâncias essenciais para o crescimento (por exemplo, *Euglena gracilis*, Euglenophyta).

As fórmulas de meios de cultivo atualmente disponíveis nem sempre são adequadas para muitas espécies e a escolha para uma determinada espécie é, portanto, muitas vezes dependente de tentativa e erro (ANDERSEN, 2005; BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Algas requerem um grande número de nutrientes como Nitrogênio e Fósforo, vitaminas, e elementos essenciais como Ferro, Manganês, Selênio, Zinco, Cobalto e Níquel. Cerca de 99,9% da biomassa algal é composta apenas de seis elementos, Carbono, Oxigênio, Hidrogênio, Nitrogênio, Enxofre e Fósforo, além de haver quantidades menores de Cálcio, Potássio, Sódio, Cloro, Magnésio,

Ferro e Silício (ANDERSEN, 2005). O crescimento e a produtividade de biomassa de qualquer espécie dependem do tipo de fontes de nutrientes, sua quantidade e proporções de C, N e do meio de cultivo. Fontes de nutrientes, especialmente nitrogênio nas formas de nitrato, uréia e amônio, e fontes de carbono, que são mantidas por borbulhamento de ar + CO<sub>2</sub>, estão diretamente associados com a mudança de pH, principalmente em culturas mal tamponadas, e, portanto, têm um alto impacto sobre o crescimento das algas (SINGH et al., 2015).

A produção de biomassa de microalgas é fortemente influenciada pelo meio de cultivo, concentração de nutrientes e tipo de nutriente (ANDERSEN, 2005). Os meios de cultivo podem ser agrupados em água doce (*Freshwater*) e águas salinas. A adequação dos meios de cultura são monitoradas usando a saúde fotossintética, o teor de clorofila e principalmente os rendimentos de biomassa das microalgas. Exemplos mais comuns de meios usados para algas de água doce são: BG-11, Bold's *Basic Medium* (BBM), COMBO *Medium*, DY-V *Medium*, DY-III *Medium* e MES *Volvox Medium*; para algas marinhas encontram-se: *Black Sea Medium*, ES *Medium*, ASP *Medium*, Aquil *Medium*, Allen's *Cyanidium Medium*, Chry *Medium*, ESAW *Medium*, F/2 *Medium*, K *Medium*, L1 *Medium*, MNK *Medium*, Pro99 *Medium*, entre outros (JAMES, 2012; SINGH et al., 2015).

A otimização de proporções relativas de concentrações e fontes de nutrientes, que é específica de cada espécie, é extremamente importante para os rendimentos de crescimento máximo. Em geral, além das fontes de carbono, acredita-se que nitrogênio e fósforo na proporção molar 16:1 seja a melhor composição para o crescimento apropriado da maioria das espécies de algas pois usa-se a Relação de Redfield (*Redfield Ratio*) como ponto de partida para quantificar possíveis limitações nutricionais (SINGH et al., 2015; GROBBELAAR, 2004).

#### 2.1.3.1. Relação de Redfield

A Relação de Redfield é a razão na qual diferentes elementos químicos estão presentes em média na biomassa fitoplanctônica. Essa razão define a estequiometria das reações de fotossíntese e remineralização. Em média, cada átomo de fósforo na biomassa do fitoplâncton é acompanhado por 16 átomos de nitrogênio e 106 átomos de carbono, e essa razão C: N: P de 106: 16: 1 é o valor mais

comumente usado para expressar a Relação de Redfield (REDFIELD, 1958). Esta relação pode ser estendida a outros elementos, mas é geralmente restrita a C, N, P e O<sub>2</sub> (TYRRELL, 2001).

Considerando apenas os mais abundantes elementos químicos na composição média do fitoplâncton, obtém-se uma reação química idealizada para a formação desses organismos (Equação 1).



A Relação de Redfield N:P de 16:1 é frequentemente utilizada como referência para a diferenciação de limitação de nitrogênio e limitação de fósforo, e é levada em consideração para estabelecer um limite sobre a relação nitrato:fosfato no oceano (GEIDER; ROCHE; GEIDER, 2002).

Em condições de crescimento balanceadas, a biomassa microalgal adquire valores de 106:16:1 em mols para C:N:P respectivamente em sua composição (TYRRELL, 2001), embora desvios tenham sido detectados (GEIDER; ROCHE; GEIDER, 2002; HEDGES et al., 2002).

Considerando a relação C:N:P universal de 106:16:1 para a composição elementar do fitoplâncton, todos os elementos essenciais devem estar presentes em proporções adequadas, em quantidades adequadas e na forma química bio-disponível no meio de cultura, de modo que não limite o crescimento das microalgas (MARKOU; VANDAMME; MUYLEAERT, 2014).

Por outro lado, é sabido que muitos meios de cultivo amplamente difundidos no cultivo de microalgas não respeitam esta relação (TABELA 4).

Tabela 4: Relação N/P de meios comerciais de cultivo de microalgas.

Meio	Concentração Final (mM)		Relação
	P	N	N/P
BG11	0,18	17,63	100,74
ESAW <i>Medium</i>	0,02	0,55	24,51
F/2 <i>Medium</i>	0,04	0,88	24,36
L1 <i>Medium</i>	0,04	0,88	24,36
COMBO <i>Medium</i>	0,05	1,00	20,00
D11	0,09	1,27	14,75
Carefoot's <i>Medium</i>	0,22	2,94	13,20
Spirulina's <i>Medium</i>	2,87	29,40	10,24
Allen Cyanidium <i>Medium</i>	2,00	20,00	10,00
Fraquil <i>Medium</i>	0,01	0,10	10,00
BBM	1,72	2,94	1,71

Considerando a relação ótima N:P, é evidente que as algas seriam severamente P-limitadas ou N-limitadas quando as taxas de crescimento forem elevadas e que, em geral, taxas de crescimento relativamente baixas seriam observadas quando estas soluções de nutrientes fossem exauridas (GROBBELAAR, 2004). Meios como BG-11 apresentam altas concentrações de N, tornando o P um fator limitante, ou seja, se o crescimento microalgal respeitar a Relação de Redfield, muito N não será assimilado no crescimento celular quando o P do meio for totalmente utilizado. O contrário ocorre para meios como BBM, os quais apresentam alta concentração relativa de P, tornando o N fator limitante, quantidades significativas de P não serão absorvidas no crescimento celular.

Por outro lado, ao se tratar de uma relação global, esta relação N:P de 16:1 é a média da constituição do fitoplâncton, e dessa forma, algumas espécies podem requerer uma condição onde a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) seja maior em relações N:P diferentes da Relação de Redfield. AHLGREN (1985) mostrou que cianobactérias foram capazes de se adaptarem a diferentes proporções de N:P quando em baixas taxas de crescimento, e que a proporção N:P se torna mais fixa a taxas de crescimento mais elevadas.

## 2.2. MICRORGANISMOS DE INTERESSE

### 2.2.1. *Spirulina platensis*

*Spirulina platensis* é uma cianobactéria filamentosa, fotoautotófica, que cresce abundantemente em habitats aquosos e salinos. Devido ao seu alto conteúdo de aminoácidos e proteínas, este microrganismo tem sido inserido como suplementação na dieta humana. *S. platensis* surge também como alimento para animais, material de partida para processos de produção de energia (digestão anaeróbia), adubo ou fonte de produtos químicos valiosos como pigmentos, polissacarídeos, carotenoides, esteroides, vitaminas, ácidos graxos polinsaturados e lipídeos (LODI et al., 2003). Estas propriedades tornam a cianobactéria muito atrativa e favorecem sua disseminação em estudos e em produção de biomassa de alta qualidade.

### 2.2.1.1. Caracterização

A designação incorreta de *Spirulina* para o gênero *Arthrospira* é comum, antiga e mantém um significado mais tradicional, prático e tecnológico do que taxonômico. Estes dois gêneros são diferentes e filogeneticamente distantes, apesar de compartilharem uma forma helicoidal de seus tricomas, e apresentarem espécies distribuídas em habitats seletivos semelhantes (MUHLING, 2000; VONSHAK, 2002). Dessa forma, o presente trabalho manterá os padrões atuais de denominação para *Arthrospira* como *Spirulina*.

*Spirulina sp.* é uma cianobactéria verde-azul, filamentosa, unicelular que se agrupa para formar tricomas cilíndricos arranjados helicoidalmente, sofre fissão binária em um único plano, onde os filamentos são solitários, flutua livremente e exibe motilidade por deslizamento (SARANRAJ; SIVASAKTHI, 2014; VONSHAK, 2002). As células apicais podem ser amplamente arredondadas ou pontiagudas. A largura dos tricomas, composta por células mais curtas do que longas, varia cerca de 6 a 12  $\mu\text{m}$  numa diversidade de formas, ao passo que muitas cepas das duas principais espécies (*S. platensis* e *S. maxima*) apresentam um diâmetro da hélice de 30 a 70  $\mu\text{m}$  (VONSHAK, 2002).

Fatores ambientais, principalmente temperatura e condições de cultivo podem alterar a geometria da hélice do microrganismo (MUHLING, 2000; VONSHAK, 2002). Embora a forma helicoidal do tricoma seja considerada uma propriedade estável e constante mantida em cultura, pode haver variação considerável no grau de helicidade entre cepas diferentes da mesma espécie e dentro da mesma cepa. Uma vez que a cepa converte sua forma para uma retilínea, seja naturalmente ou por um tratamento físico/químico, ela não assume mais a forma helicoidal (MUHLING, 2000; VONSHAK, 2002).

*S. platensis* e *S. maxima* são as duas espécies mais difundidas e compartilham características típicas do gênero. A principal diferença entre as duas espécies é que em *S. maxima* os tricomas são menos constritos nas paredes transversais da hélice, possuem um diâmetro maior que se atenua nas extremidades. Por outro lado, *S. platensis* apresenta uma menor distância entre as paredes transversais dos tricomas, se assemelhando a uma mola contraída (FIGURA 2), e mantendo o diâmetro da hélice até as extremidades do tricoma. Além disso, *S. platensis* é caracterizada por possuir tricomas mais curtos, usualmente com 5-7 voltas (VONSHAK, 2002).



Figura 2: Micrografia eletrônica de *Spirulina platensis*.

\* A barra representa 10 µm.

Fonte: VONSHAK, 2002.

#### 2.2.1.2. Cultivo

As particularidades de *Spirulina sp.* tornam essa espécie apta a cultivos abertos, e assim fácil de ser explorada comercialmente. O fato de crescerem em ambientes altamente seletivos permite sua proliferação relativamente livre de contaminantes como algas e protozoários (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Altos valores de pH e alta concentração de bicarbonato são características fundamentais nos meios de cultivo para *Spirulina sp.*

Além de pH adequado, o crescimento de biomassa de *S. platensis* necessita principalmente de disponibilidade de nutrientes, temperatura e luz. Os altos valores de pH usualmente são mantidos entre 9,5 e 9,8 podendo chegar a 10,0, o que inibe efetivamente o crescimento de muitas outras algas (ANDERSEN, 2005; MADKOUR; KAMIL; NASR, 2012). A disponibilidade de nutrientes é alta no meio Zarrouk (TABELA 5) que tornou-se um meio padrão para esta microalga (MADKOUR; KAMIL; NASR, 2012).

A fonte de carbono do meio é oriunda do  $\text{NaHCO}_3$  e pode ser suplementada por aeração injetando  $\text{CO}_2$  ou captando o  $\text{CO}_2$  atmosférico de modo que supra as necessidades fotossintéticas. Embora use o metabolismo fotossintético para a assimilação de  $\text{CO}_2$ , *Spirulina sp.* mostrou-se apta absorver substratos orgânicos em culturas mixotróficas (ANDRADE; COSTA, 2007).

Tabela 5: Composição do meio Zarrouk.

Solução Macronutrientes		Solução A5		Solução B6	
Sal	Concentração (g/L)	Sal	Concentração (g/L)	Sal	Concentração (g/L)
NaHCO <sub>3</sub>	18,00	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,0229
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1,81	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> ·24H <sub>2</sub> O	0,0960
NaNO <sub>3</sub>	2,50	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,22	NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0478
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,08	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0179
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,20	MoO <sub>3</sub>	0,01	Ti(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,0400
NaCl	1,00			Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0044
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,04				
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01				
EDTA	0,08				
Solução A5 (mL)	1,00				
Solução B6 (mL)	1,00				

Fonte: Adaptado de ZARROUK, 1966.

A temperatura ótima de crescimento para *Spirulina sp.* é arbitrária, muitas cepas crescem em temperaturas diferentes, porém usualmente a faixa ótima de cultivo laboratorial está entre 35 e 38°C. A intensidade luminosa é um importante fator no crescimento microalgal, porém, sua influência no aumento da produtividade é altamente dependente das condições de crescimento e correlaciona-se com a concentração de clorofila à biomassa. A partir de dados obtidos em laboratório, *Spirulina platensis* tornou-se saturada numa faixa de 150-200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (VONSHAK, 2002).

### 2.2.1.3. Importância econômica

O elevado teor de proteínas e composição única de ácidos graxos e vitaminas de *Spirulina sp.* são utilizados como base para justificar os seus benefícios para a saúde humana. Conseqüentemente, a produção comercial de *Spirulina* ganhou atenção mundial para uso em suplementos alimentares humanos, alimentos para animais e produtos farmacêuticos (MADKOUR; KAMIL; NASR, 2012; VONSHAK, 2002).

A composição de *Spirulina sp.* apresenta um teor de proteína de cerca de 70% de sua massa seca, contendo aminoácidos essenciais superior a todas as proteínas vegetais, tais como leguminosas. Adicionalmente, grandes quantidades de ácidos graxos essenciais, minerais, vitaminas, pigmentos

antioxidantes (ficobiliproteínas e carotenóides) e polissacáridos são observados nesta cianobactéria (MADKOUR; KAMIL; NASR, 2012; VONSHAK, 2002).

Os lipopolissacarídeos de *Spirulina sp.* correspondem a 1,5% da massa seca, dos quais 31,6% compreendem carboidratos, e 14,3% ácidos graxos (VONSHAK, 2002). Em termos de vitaminas, estão presentes em sua constituição especialmente vitamina B12 e provitamina A, vitamina B<sub>1</sub> (tiamina), B<sub>2</sub> (riboflavina), B<sub>6</sub> (piridoxina), B<sub>9</sub> (ácido fólico), B<sub>12</sub> (cianocobalamina), vitamina D, K e vitamina E. Pigmentos naturais como clorofila-a, beta-caroteno, zeaxantina, ficocianina e aloficocianina com atividade antioxidante, são também encontrados neste microrganismo (DALLE ZOTTE et al., 2013).

Diante da composição singular da *Spirulina sp.*, o emprego dessa cianobactéria na alimentação é inevitável e muito explorado no mundo. O uso deste microrganismo como suplemento alimentar não é novo, há indícios de que esta cianobactéria era explorada como alimento pelos astecas, e atualmente, tribos africanas usam-na para o mesmo propósito (SARANRAJ; SIVASAKTHI, 2014). Atualmente, é produzida por várias empresas e comercializadas em muitas lojas de alimentos em todo o mundo (EL-KASSAS; HENEASH; HUSSEIN, 2015),

*Spirulina sp.* também pode ser incluída na dieta animal (DALLE ZOTTE et al., 2013), na aquicultura, é utilizada como aditivo alimentar para melhorar o crescimento, a eficiência alimentar, a qualidade dos carcaças e a resposta fisiológica à doença em várias espécies de peixes (MUSTAFA; UMINO; NAKAGAWA, 1994). Também se mostra importante no processo de reutilização e reaproveitamento de águas residuárias (EL-KASSAS; HENEASH; HUSSEIN, 2015; LODI et al., 2003). Dentre as cianobactérias, *Spirulina sp.* tem sido submetida a numerosos e rigorosos estudos toxicológicos que evidenciaram suas potenciais aplicações terapêuticas na área de imunomodulação, anticancerígenos, antivirais e redução do colesterol (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

### **2.2.2. *Neochloris oleoabundans***

Nos últimos anos, a microalga *N. oleoabundans* atraiu o interesse da comunidade científica como matéria-prima para a produção de biodiesel. A alta produtividade lipídica desta espécie, em combinação com o fato de que seus lipídeos são triacilglicéridos saturados, explicam porque *N.*

*oleoabundans* pode ser uma fonte de óleo interessante para a produção de biodiesel (URRETA et al., 2014).

#### 2.2.2.1. Caracterização

*Neochloris oleoabundans* é uma microalga verde unicelular pertencente ao filo (divisão) Chlorophyta, possui um formato quase esférico (FIGURA 3), com aproximadamente 3 a 6 µm de diâmetro (podendo aumentar de acordo com o cultivo). Esta microalga contém um cloroplasto em forma de taça com um ou mais pirenóides, que são os reservatórios da enzima RubisCO (enzima responsável pela fixação do CO<sub>2</sub> na fotossíntese) (BALDISSEROTTO et al., 2012).

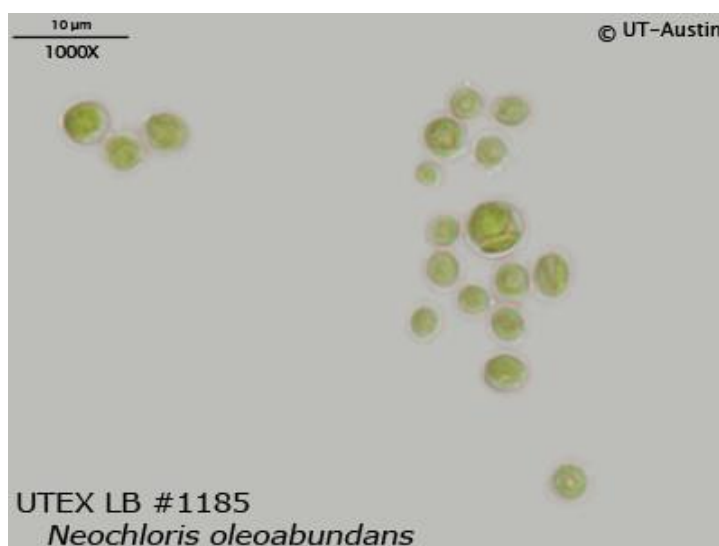


Figura 3: *Neochloris oleoabundans* UTEX-1185.

Fonte: UTEX CULTURE COLLECTION OF ALGAE, 2017.

#### 2.2.2.2. Cultivo

*Neochloris oleoabundans* foi descrita como uma espécie de água doce, e é cultivada comumente em meio Bristol ou meios de água doce com conteúdo de minerais similares. Entretanto, a literatura sugere que se trata de um organismo edáfico e foi isolado a partir de solos áridos na Arábia Saudita (CHANTANACHAT; BOLD, 1962). A microalga é halotolerante, crescendo em água salobra (21 g/L NaCl) ou água do mar (35 g/L NaCl), e seu conteúdo de carboidratos, proteínas e lipídeos variam de acordo com as condições do meio (BALDISSEROTTO et al., 2012).

Uma patente norte-americana (US) para uso biotecnológico de *N. oleoabundans* na área de cosméticos propôs o cultivo em meio salobro contendo de 16 a 20 g/L de NaCl (RENIMEL et al., 2009).

Dentre os meios utilizados para o cultivo de *N. oleoabundans* destacam-se o Bold's Basal Medium (BBM) e o BG-11 (TABELA 6). Outro meio utilizado é o meio ES (Erddekokt mit Salze), um meio basal (contendo extrato de solo, sais e micronutrientes) para vários grupos taxonômicos de algas verdes, Xantophytas (algas verde-amarelas) de água doce e até cianobactérias (ANDERSEN, 2005).

Tabela 6: Composição do meio BG-11.

Solução Macronutrientes		Solução de micronutrientes	
Sal	Concentração (g/L)	Sal	Concentração (g/L)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,04	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
NaNO <sub>3</sub>	1,50	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,391
EDTA	0,001	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,049
Citrato Férrico de amônio	0,006		
Ácido Cítrico	0,006		
Solução de micronutrientes	1 mL		

Fonte: Adaptado de ANDERSEN, 2005.

No estudo realizado por GIOVANARDI et al., (2013), *N. oleoabundans* foi submetida a um cultivo o qual foi adicionado ao meio, esterco orgânico derivado da produção de vinagre de maçã. A microalga provou ser capaz de crescer sob condições mixotróficas, unindo a atividade fotossintética com o uso de uma fonte de carbono orgânico adicionado no meio.

As condições de manutenção da cultura típicas são temperatura de 20°C com intensidade luminosa máxima de 3200 lux e períodos de luminosidade em 12/12h claro/escuro (UTEX CULTURE COLLECTION OF ALGAE, 2017).

#### 2.2.2.3. Importância econômica

A microalga oleaginosa *N. oleoabundans* é largamente estudada por sua capacidade de acumular lipídeos em seu citoplasma em até 40% de sua massa seca sobre condições de privação de

nitrogênio, com uma produtividade lipídica de  $0,133 \text{ kg m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$  (PRUVOST et al., 2009; SANTOS; WIJFFELS; LAMERS, 2014), já para CHISTI (2007) esse valor pode chegar a 54%. Cerca de 80% destes lipídeos são representados por triacilglicerídeos, que são principalmente ácidos graxos saturados contendo de 16 a 20 carbonos, ideais para produção de biodiesel (GIOVANARDI et al., 2013).

Além da privação de nitrogênio, também são condições de crescimento onde um alto teor de lipídeo na célula é encontrado a alta exposição a luz, variações de pH e mixotrofia (BALDISSEROTTO et al., 2016). Desta forma, esta microalga é bastante explorada na indústria bioenergética.

As unidades formadoras de triacilgliceróis e todos os outros lipídeos celulares úteis para fins bioenergéticos (nutrição e produção de biocombustíveis) são sintetizados no cloroplasto (BALDISSEROTTO et al., 2012). Dentre os pigmentos naturais, encontram-se a clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenóides fotoprotetores (PRUVOST et al., 2009). URRETA et al., (2014) constatou que *N. oleoabundans* é capaz de produzir consideráveis quantidades de carotenóides, principalmente luteína e astaxantina, o que confere um valor agregado à biomassa, contribuindo para uma produção de biodiesel mais sustentável. Considerando o interesse da indústria de alimentos em pigmentos naturais, a *N. oleoabundans* se torna uma fonte interessante, enquanto a biomassa residual pode ser usada para a produção de biodiesel (URRETA et al., 2014).

### **2.2.3. *Dunaliella salina***

*Dunaliella salina* é uma microalga verde que tornou-se popular, em particular, devido aos seus teores de lípidos e proteínas, à concentração de glicerol, ao teor de  $\beta$ -caroteno e à sua excepcional capacidade de crescer sob condições de alta salinidade (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

#### **2.2.3.1. Caracterização**

*Dunaliella* é uma microalga unicelular isolada de corpos d'água de alta salinidade com concentrações de NaCl superiores a 3M (KIM, 2015). Assim como *N. oleoabundans*, trata-se de uma microalga verde da divisão Chlorophyta, com um cloroplasto único em forma de taça quem contém um pirenóide central (OREN, 2005).

Suas células carecem de uma parede celular rígida, possuem dois flagelos de tamanho igual para realizar sua locomoção, apresentam um comprimento que varia de 5 a 25  $\mu\text{m}$  e largura de 3 a 13  $\mu\text{m}$  (HOSSEINI TAFRESHI; SHARIATI, 2009). Reproduzem-se por divisão longitudinal da célula móvel ou por fusão de duas células móveis para formar um zigoto. O zigoto tem uma camada externa espessa e pode suportar exposição a água doce e também sobreviver a períodos prolongados de secura. Esses zigotos germinam com a liberação de até 32 células filhas haplóides através de uma ruptura celular (OREN, 2005).

*Dunaliella* desenvolveu mecanismos especiais que permitem a célula crescer e se reproduzir em condições extremas. Esta microalga possui uma acumulação de glicerol, que age como osmorregulante possibilitando a sobrevivência em altas salinidades. A acumulação de  $\beta$ -caroteno, que é em parte responsável pela coloração vermelha na célula (FIGURA 4), também atua como agente protetor contra o excesso de luz (KIM, 2015).

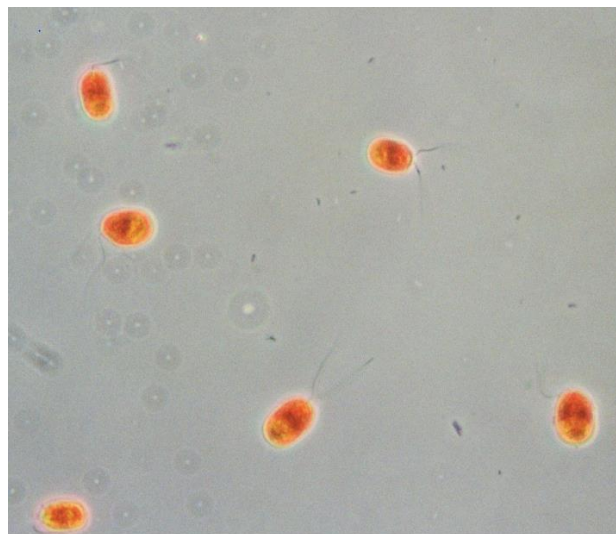


Figura 4: Células de *Dunaliella salina* das salinas de Eilat.  
Fonte: OREN, 2005.

#### 2.2.3.2. Cultivo

*Dunaliella salina* é uma microalga cujo habitat natural são salmouras hipersalinas. A salinidade ótima de crescimento é de 22% (% massa/volume NaCl) enquanto que para a produção de carotenoides é de 35%, que é a salinidade máxima para esta microalga. A temperatura ótima de crescimento está na

faixa de 20 a 40 °C, dependendo da cepa. *D. salina* pode tolerar temperaturas de congelamento, porém temperaturas acima de 40 °C podem ser letais (BOROWITZKA, 1981).

O pH ideal para o crescimento é de aproximadamente 9,0 (ANDERSEN, 2005), embora o pH do meio mais utilizado para o cultivo de *Dunaliella salina*, *Modified Johnson's Medium* (MJM) (TABELA 7), seja de 7,5. A melhor fonte de nitrogênio para *Dunaliella* é na forma de nitrato, e a melhor fonte de fósforo é na forma de fosfato em pequenas concentrações, ambos presentes no MJM. Altas concentrações de fosfato podem inibir o crescimento da microalga, segundo MIL'KO (1962).

Assim como a *Spirulina*, *Dunaliella* também pode ser mantida em grandes cultivos abertos sem contaminações devido ao seu ambiente extremo de crescimento, que inviabiliza o desenvolvimento de contaminantes (ANDERSEN, 2005). O cultivo comercial de *Dunaliella salina* é realizado usualmente em alta luminosidade e salinidade que geram estresse osmótico nas microalgas e estimulam a produção de glicerol e betacaroteno. A alta pressão osmótica externa é balanceada com a alta pressão osmótica interna gerada pela produção de glicerol (BELLINGER; SIGEE, 2010; DERNER et al., 2006).

Tabela 7: Composição do *Modified Johnson's Medium*.

Solução Macronutrientes		Solução de Ferro		Solução Micronutrientes	
Sal	Concentração (g/L)	Sal	Concentração (mg/L)	Sal	Concentração (mg/L)
NaCl	Até atingir a salinidade desejada	Na <sub>2</sub> EDTA	189	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,5	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	244	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	38
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5			CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	6
KCl	0,2			CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2			ZnCl <sub>2</sub>	4,1
KNO <sub>3</sub>	1			MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,1
NaHCO <sub>3</sub>	0,043				
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,035				
Solução de Ferro	10 mL				
Solução de micronutrientes	10 mL				

\*pH ajustado para 7.5

Fonte: Adaptado de BOROWITZKA, 1988.

### 2.2.3.3. Importância econômica

Um considerável número de espécies de microalgas capazes de crescerem em condições hipersalinas são bem estabelecidas na biotecnologia. *D. salina* cresce bem em salinidade muito alta, até 3M (NaCl), e grandes lagoas abertas dessas algas são usadas para a produção de  $\beta$ -caroteno (KIM, 2015).

Na indústria alimentar, há uma demanda crescente por pigmentos naturais que podem ser produzidos a partir de microalgas. Em *Dunaliella spp* o  $\beta$ -caroteno pode representar até 14% da biomassa seca (VONSHAK, 2002). Este pigmento produzido por *Dunaliella* tem um preço de até 3.000 dólares por quilo, dependendo da pureza e da qualidade do material, e pode ser vendido nas formas de extrato, pó e biomassa seca (ONCEL, 2013). Este composto vem sendo aplicado como corante natural e podendo atuar como pró-vitamina A, tendo também caráter antioxidante e contra doenças degenerativas como o câncer (DERNER et al., 2006).

Estas microalgas são atualmente cultivadas por várias empresas, por exemplo em Israel e na Austrália, como fontes destes compostos e como suplementos dietéticos, contendo vitaminas A e C.

O primeiro cultivo em uma planta piloto foi realizado em 1966, na antiga União Soviética. Desde então, diferentes tecnologias são utilizadas, desde o cultivo extensivo de baixa tecnologia em lagoas até o cultivo intensivo em densidades celulares elevadas em condições cuidadosamente controladas (OREN, 2005).

## 2.3. FÓSFORO

### 2.3.1. Visão geral e importância

O fósforo é um elemento vital para todos os organismos, não podendo ser substituído por outro elemento (SEYHAN, 2009). A sociedade humana moderna depende de um largo e contínuo suprimento do fósforo extraído das minas, para sustentar o fornecimento global de alimentos (RITTMANN et al., 2011). O fósforo não está entre os elementos mais disponíveis na Terra, porém apresenta inúmeras funções nos metabolismos humanos, animais, vegetais e microrganismos (SMIL, 2000):

- É necessário na produção de proteínas e polissacarídeos;

- Ligações fosfodiéster ligam unidades mononucleotídicas formando cadeias longas de DNA e RNA (ácidos nucleicos, que armazenam e replicam toda a informação genética);
- A síntese de moléculas complexas é alimentada pela energia liberada pela ligação fosfato na molécula de ATP (Adenosina Trifosfato);
- Está presente na enzima que realiza a fixação fotossintética do carbono.

Em corpos de vertebrados, o P é relativamente abundante pois ossos e dentes são constituídos principalmente por Hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Um corpo adulto pesando 70 kg, com 5 kg de ossos (peso seco), armazena cerca de 550 g de P e este valor se eleva quando considerado tecidos moles, fosfato solúvel, ácido nucleicos e enzimas pelo resto do corpo (SMIL, 2000).

Na esfera vegetal, o fosfato, juntamente com o enxofre, nitrogênio e potássio, compõe o grupo designado por Agrominerais, e são matérias-primas de grande importância, pois estão no elo-base na cadeia dos fertilizantes químicos NPK, insumos fundamentais da agricultura (KULAIF, 2009) De uma maneira geral, fósforo junto ao nitrogênio são os dois elementos que imediatamente limitam o crescimento em organismos fotossintéticos (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

A presença do fósforo na enzima RubisCO permite a fixação do carbono no processo de fotossíntese, realizado pelos vegetais. Além disso, interfere na respiração, armazenamento e transferência de energia, crescimento e divisão celular, dentre outras inúmeras funções não só nos grandes vegetais, mas como nos microrganismos fotossintéticos também.

Para as algas, a forma mais desejada para o fornecimento de P é como ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e sua absorção é um processo dependente de energia. Embora a biomassa das algas contenha menos de 1% de P, muitas vezes é um dos fatores limitantes de crescimento mais importantes na biotecnologia que envolve estes organismos. Isto se deve ao fato de que este elemento é facilmente ligado a outros íons (por exemplo, cálcio ou ferro) resultando na sua precipitação e, conseqüentemente, tornando este nutriente essencial indisponível para a captação pelas algas (GROBBELAAR, 2004).

As algas também são capazes de armazenar excesso de P em “corpos de polifosfato”. O elemento então pode ser usado quando o suprimento externo se torna limitante. A disponibilidade de P também influencia a composição da biomassa produzida. O conteúdo lipídico e os carboidratos são especialmente afetados pela disponibilidade externa e interna de P. Também é importante a proporção

N:P nos meios de cultivo, pois isto não só determina a potencial produtividade, mas também é importante mantendo a dominância da espécie visada na cultura (GROBBELAAR, 2004).

Encontrado na natureza com relativa abundância, o fósforo está relacionado a rochas de origem ígnea e origem sedimentar, e em ambos os ambientes, encontra-se na forma de fosfatos, normalmente associados ao cálcio (XU et al., 2012). O fosfato natural, também conhecido como rocha fosfática, é uma fonte não-renovável, comercialmente referida sob a forma de pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ), fórmula de convenção para demonstrar o teor/conteúdo de fósforo de todos os produtos da cadeia de fertilizantes fosfatados (KULAIF, 2009).

Devido à grande importância deste elemento no meio agrário, estima-se que 80% do fosfato produzido é utilizado como fertilizante (SHU et al., 2006). Mesmo com uma intensiva canalização do P para o mundo agrônomo, aproximadamente 5,7 bilhões de hectares de solo arável no planeta apresentam baixa disponibilidade de Fósforo, devido à baixa concentração e solubilidade de compostos fosfatados no solo (WANG et al., 2012).

Por outro lado, o fosfato é um recurso finito e estima-se que os recursos atualmente mineráveis de fósforo (apatita) esgotarão em 50 a 100 anos (LIU et al., 2007; XU et al., 2012). Pesquisadores tem proposto que a grande demanda por este elemento no ramo agrônomo levará a taxa de produção global de P a um pico, e a partir deste ponto, a demanda ultrapassará a produção deste mineral e as reservas começarão a ser exauridas, conceito denominado “*Peak Phosphorus*” (FIGURA 5) (CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009).

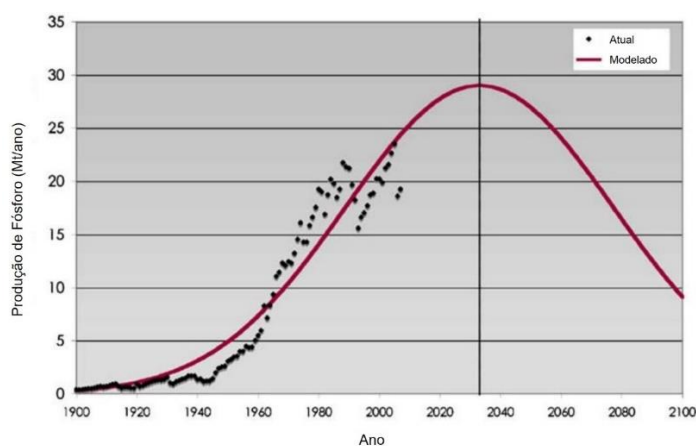


Figura 5: Curva prevista para a produção mundial de fósforo.  
Fonte: CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009.

Aproximadamente 50% da rocha fosfática circula através da cadeia alimentar (CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009), e termina em bio sólidos e outros resíduos orgânicos. O uso de resíduos orgânicos de origem animal e bio sólidos de alta qualidade como fonte de recuperação de P e outros nutrientes é geralmente encorajada também devido ao seu baixo custo, rápida disponibilidade, contribuição para a estabilização das propriedades físicas e químicas do solo, e disposição de resíduos orgânicos (AZEEZ; VAN AVERBEKE, 2010; WANG et al., 2012).

O elemento em questão é um nutriente essencial, porém de recurso limitado, gerando esforços cada vez maiores para a sua reciclagem, seja de matéria orgânica ou água de reuso (CORNEL; SCHAUM, 2009; OTTOSEN; KIRKELUND; JENSEN, 2013). Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de métodos sustentáveis de reciclagem e conservação de resíduos ricos em P.

### **2.3.2. Panorama no Mundo**

A produção mundial de rocha fosfática aumentou de 42,2 Mt em 1961 para 178,5 Mt em 2010, e projeta-se que crescerá gradualmente de 225 Mt em 2014 para 258 Mt em 2018. A maior parte do aumento deve ocorrer a partir da expansão das minas existentes no Marrocos e no desenvolvimento de uma nova mina na Arábia Saudita. O restante do aumento era esperado da ampliação das minas existentes na Jordânia, Cazaquistão, Peru, Rússia e Tunísia. Projeta-se que o *consumo* mundial de  $P_2O_5$  contido em fertilizantes aumente de 42,2 Mt em 2014 para 45,9 Mt em 2018, com o maior crescimento ocorrendo na Ásia e América do Sul (USGS, 2015).

Considerando-se que 80 a 85 por cento da produção mundial de rocha fosfática é usada no setor de fertilizantes, as tendências do consumo mundial de fertilizantes, especialmente o consumo de fertilizantes fosfatados, explicam claramente as variações na produção de rocha fosfática global durante os períodos supracitados (INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION (IFA), 2011).

A produção mundial de rocha fosfática está concentrada praticamente em três países, China, Estados Unidos e Marrocos (incluindo Saara Ocidental). Em 2013, a produção mundial deste mineral foi ligeiramente maior que no ano anterior, e estas três nações compreenderam 70% da produção mundial

(USGS, 2015). Já em 2014, a produção mundial apresentou uma leve queda devido à baixa exportação chinesa.

Cerca de 85% da produção mundial de Fósforo provém de rochas sedimentares, e apenas 15% corresponde a rochas ígneas. As reservas mundiais limitadas a rochas sedimentares, apresentam teores entre 25% e 33% de  $P_2O_5$  e com alta uniformidade e mineralogia simples (FONSECA, 2014; SILVA, 2012).

### 2.3.3. Panorama no Brasil

Diferentemente do parâmetro mundial, 95% da produção brasileira de fosfato vem das reservas de rochas ígneas carbonáticas apresentando teores médios de 10-11% de  $P_2O_5$  e com mineralogia mais complexa e baixo grau de uniformidade, exigindo um processamento industrial mais complexo e, conseqüentemente, com custos mais elevados (FONSECA, 2014). O uso principal (68%) da rocha fosfática no Brasil é na indústria de fertilizantes, mas apresenta também um conjunto grande de outras aplicações, como na alimentação animal e nas indústrias químicas (KULAIF, 2009).

Dados fornecidos pela USGS (*United States Geological Survey*), mostraram que em 2013, o Brasil representou uma parcela de 3,0% da produção mundial de  $P_2O_5$ . Foram mineradas 39 milhões de toneladas de *run of mine* (ROM), em 10 minas brasileiras. O teor médio desse minério foi de 9,6% de  $P_2O_5$ . Essa produção, beneficiada, resultou em 6,7 milhões de toneladas a um teor médio de 37% de  $P_2O_5$ .

A produção brasileira de rocha fosfática está localizada principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, próxima aos principais mercados consumidores (FIGURA 6). O Estado de Minas Gerais foi responsável, em 2013, por produzir 49% do fosfato nacional, seguido de Goiás, com 36%, São Paulo, com 10%, Bahia, com 4%, e Tocantins com o restante. No mesmo ano, a empresa Vale foi responsável por 71% da produção nacional, seguida por Anglo/Copebrás, com 21%, Galvani, com 7,2%, e as empresas MBAC e Socal completaram a produção (KULAIF, 2009).

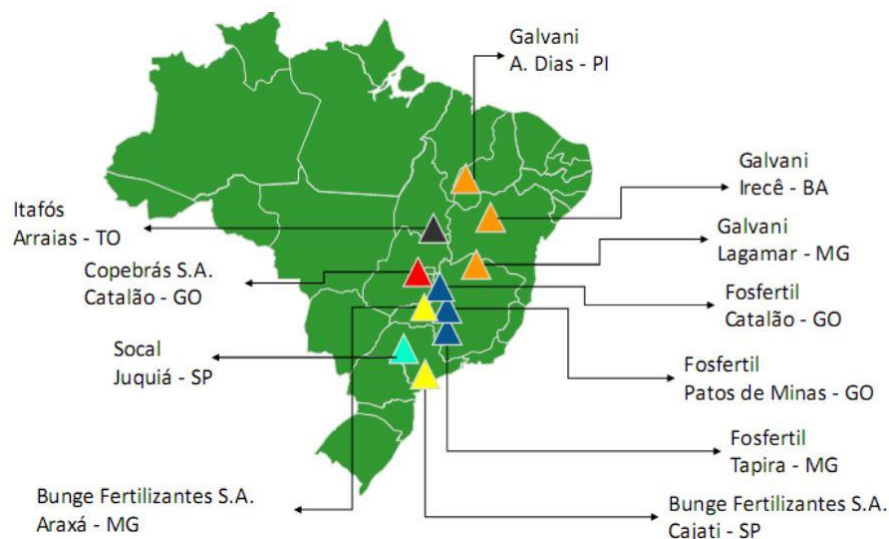


Figura 6: Localização das minas ativas no Brasil.  
Fonte: KULAIF, 2009.

Novas minas e projetos estão em estudo ou início de produção nas regiões Nordeste e Sul, porém não se prevê a descentralização da oferta, pois estas jazidas não são de grande envergadura. O parque produtivo compõe-se de 11 minas e 9 usinas, com capacidades de produção predominantemente de portes grande e médio (KULAIF, 2009).

No segundo semestre de 2014, a produção mineral de fosfato apresentou uma redução de 2,0% em relação ao segundo semestre de 2013, sendo muito influenciado por uma menor demanda (em função da desvalorização de *commodities* agrícolas) e a entrada de fertilizantes da China.

No primeiro semestre de 2015 o Brasil gastou 113 milhões de dólares com importação de rocha fosfática, e a produção de fosfato apresentou uma queda de 3,17%, quando comparado ao mesmo período do ano anterior (FONSECA, 2014). Dessa forma, o fosfato apresentou uma participação total de 1,9% nas receitas da Compensação Financeira pela Exploração de Recursos Minerais (CFEM) (FONSECA, 2014).

#### 2.3.4. Fluxo e Desperdício

Um dos fatos observados no cenário atual é que pouco do P extraído é retornado para as plantas e animais que são consumidos por seres humanos. A maior parte do P é perdida ao longo do seu fluxo, e essas perdas, muitas vezes causam graves problemas ambientais. Quando nutrientes como o P

advindo de resíduos industriais e descargas humanas, em quantidades significativas são introduzidos em águas superficiais, pode ser iniciado um processo de eutrofização em lagos, reservatórios, estuários, e porções oceânicas (RAICEVIC et al., 2013; RITTMANN et al., 2011).

A eutrofização, também conhecida como "envelhecimento acelerado" dos corpos aquáticos, é indesejável pois conduz eventualmente à mudança de cor, odor, turbidez, promove perda de oxigênio dissolvido, e eliminação de habitat de espécies aquáticas (DUCE et al., 2008).

O teor de P nos sistemas de água doce em todo o mundo é pelo menos 75% maior do que os níveis pré-industriais, e os fluxos de P para os oceanos tem aumentado de 8 para 22 milhões de toneladas métricas por ano (BENNETT; CARPENTER; CARACO, 2001). O fósforo entra geralmente nos ecossistemas aquáticos combinado às partículas do solo que são erodidas em lagos, córregos, e rios (BENNETT; CARPENTER; CARACO, 2001). Após os corpos de água doce descarregarem seu conteúdo com P em zonas costeiras marinhas, muitas vezes levam a essa área à "morte". Em 2008, estimaram-se 400 zonas costeiras mortas no mundo, e muitas encontradas na foz de rios que descarregam P, sendo este número acrescido cerca de 10% por década (DIAZ; ROSENBERG, 2008).

O grande ciclo natural do P global se comporta em parte como um fluxo unidirecional, com pequenas interrupções devido à absorção temporária de uma fração do elemento pela biota: Mineralização, intemperismo, erosão, escoamento e transferência solúvel, finalizando em partículas de P direcionadas ao oceano onde eventualmente afunda em sedimentos (SMIL, 2000). O P que não é sedimentado nos fundos oceânicos ocorre na maior parte sob formas de minerais de cálcio pouco solúveis. A reciclagem dos sedimentos depende da lenta remodelação da superfície terrestre baseado no levantamento tectônico onde as rochas contendo P são re-expostas para sofrerem ações do intemperismo (SMIL, 2000). De acordo com SMIL (2000), este grande ciclo do P é completado a cada  $10^7$  a  $10^8$  anos (FIGURA 7).

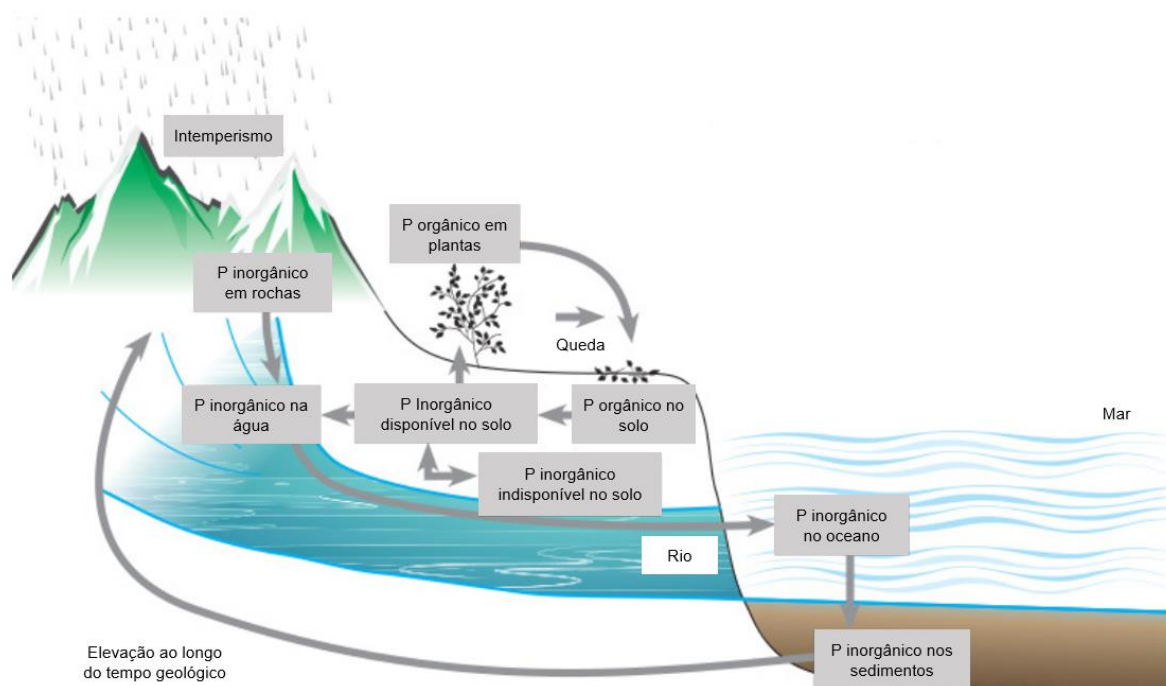


Figura 7: Grande ciclo natural do fósforo.

Fonte: Adaptado de UNIVERSITY OF WAIKATO (2013).

Cerca de 80% do fósforo extraído das minas são aplicados na agricultura, mas apenas 40% consegue chegar até a colheita das culturas, e disso, somente 23% é incorporado nos alimentos dos seres humanos, sendo apenas 16% consumidos. Aproximadamente todo o fósforo consumido é transmitido aos esgotos municipais e sistemas de tratamento de água. Cerca de metade da quantidade consumida pela população (8% da quantidade minada) é descarregada pelos sistemas de tratamento de água e entram diretamente em corpos hídricos navegáveis. O restante (7% do P minado) tomam o destino de aterros sanitários (RITTMANN *et al*, 2011).

Estima-se que em terrenos agrícolas onde foi aplicado P extraído de reservas minerais, ocorre uma perda de 46% (do P extraído) ocasionado por erosão do solo e escoamento. Não obstante, o desperdício animal representa o segundo maior fluxo com cerca de 40% de perda do P extraído. No entanto, o escoamento de terras como florestas, até áreas urbanas resulta em padrões similares e apresentam consideráveis níveis de P em águas superficiais (RITTMANN *et al.*, 2011).

Quase todo o P presente em erosão e escoamento vai diretamente para corpos hídricos superficiais, o que por sua vez acelera a eutrofização. Parte do P originado de resíduos animais é reaplicado a campos agrícolas como fertilizantes. No entanto, a maioria deste P desperdiçado segue o

caminho dos corpos hídricos, evidenciando a falta de controle e regulamentação das operações que regem esse sistema (RITTMANN et al., 2011).

### 2.3.5. Métodos de captura do fósforo

Diante da realidade atual, somado ao alto alcance da tecnologia contemporânea, fica cada vez menos aceitável conformar-se com a perda de minerais importantes como o fósforo, para o ambiente. Além de desperdiçado, muita parte do fósforo contribui para problemas ambientais, dessa forma, várias metodologias são colocadas em prática para capturar este nutriente valioso.

A precipitação química de fosfato inorgânico é uma metodologia que ocorre através da adição de um ou mais cátions metálicos di ou trivalentes como ferro, alumínio, cálcio, magnésio, produzindo uma “lama química” que é removida da água. Este método requer uma grande concentração de fosfato para produzir uma supersaturação termodinâmica. A escolha do metal a ser adicionado é importante pois a forte ligação entre o metal e o P inviabiliza a rápida reutilização em aplicações industriais e agrícolas (RITTMANN et al., 2011).

A precipitação química é um método muito usado em águas residuárias. A recuperação de P como estruvita (mineral de fosfato com fórmula de  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) é uma prática comum de precipitação química, possui múltiplas configurações comerciais disponíveis, e pode ser observada em recuperação de fósforo de 97% a partir de cinza de lodo de esgoto (XU et al., 2012).

Uma outra abordagem de remoção de fósforo em águas residuais é chamada Remoção Biológica de Fósforo (*Enhanced Biological Phosphorus Removal - EBPR*). Esse método de caráter biológico, envolve a seleção de microrganismos que armazenam quantidades altas de P em polifosfatos (Poly-P). O P é contido em biosólidos orgânicos que são removidos das águas residuais tratadas e usualmente usadas para melhoramento do solo ou descartadas em um aterro sanitário (RITTMANN et al., 2011).

Quando o processo de recuperação de P com lodo ativado exige alternância de condições aeróbia e anaeróbias, os Poly-P são formados em condições aeróbicas e servem como uma fonte de

energia para as fases anaeróbias, durante as quais são degradados, resultando na liberação de P, em conjunto com  $Mg^{2+}$  e  $K^{1+}$ , em solução (PETZET; CORNEL, 2013).

A adsorção refere-se à transferência de solutos de fase líquida para adsorventes em fase sólida, e também é enquadrada nas metodologias para a captura do fósforo. A separação de fósforo por adsorção durante a coagulação, seguida de remoção por sedimentação e filtração, foi usada pela primeira vez na década de 1950 e, desde então, um grande número de estudos foi realizado com diferentes materiais de sorção de P para o potencial uso em sistemas de filtragem (RITTMANN et al., 2011; WESTHOLM, 2006).

Pesquisas diversas tem sido conduzidas em uma grande variedade de substratos em potencial. Alguns dos materiais relatados incluem minerais e rochas, solos, sedimentos marinhos, subprodutos industriais, produtos das indústrias siderúrgica e mineral (WESTHOLM, 2006).

Uma vantagem da remoção de P por adsorção como parte de coagulação é que os coagulantes convencionais (sulfato de alumínio, cloreto férrico e cal) têm custo relativamente baixo, ampla disponibilidade e alta capacidade de adsorção. Por outro lado, a adsorção inclui um alto custo operacional (energia e manutenção) e volumes grandes de reatores (RITTMANN et al., 2011).

Geralmente, o primeiro passo para a recuperação do P é a sua liberação da fase sólida para a fase líquida, e para isso, não há dúvidas de que o pH é o fator mais importante para a liberação do P, pois reações químicas relacionadas à transformação de espécies químicas do P são grandemente dependentes do pH (XU et al., 2015).

A extração de P dependente de pH é um processo relativamente simples, e que pode ser realizado sob pH ácido ou pH básico, embora na literatura a opção por pH ácido seja largamente a mais utilizada (BISWAS et al., 2009; OTTOSEN; KIRKELUND; JENSEN, 2013; PARÉS VIADER et al., 2015; XU et al., 2015). Segundo TAN e LAGERKVIST (2011) a lixiviação do P aumenta de acordo com o aumento da acidez e da temperatura. Em estudo realizado com resíduos de lodo ativado, concluiu-se que a extração de  $PO_4^{3-}$  e P é mais eficiente sob condições de pH ácido (FIGURA 8).

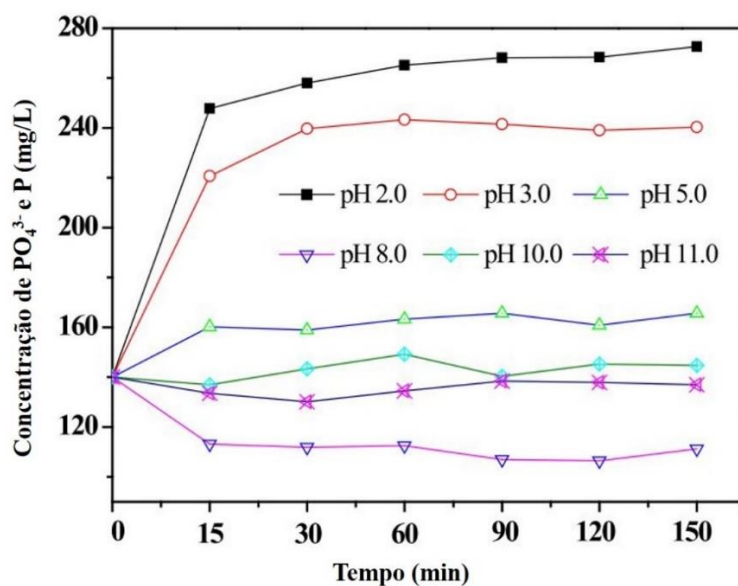


Figura 8: Variações das concentrações de  $\text{PO}_4^{3-}$  e P no meio líquido em função do tempo sob pH 2.0 a 11.

Fonte: Adaptado de OTTOSEN; KIRKELUND; JENSEN, 2013.

O autor ainda reporta que as concentrações de  $\text{PO}_4^{3-}$  e P sob pH 8.0 são inferiores às de pH 10.0 e 11.0 devido à possível formação de estruvita, que sob essas condições precipita o P, diminuindo sua quantidade no meio líquido (OTTOSEN; KIRKELUND; JENSEN, 2013).

Embora a utilização de condição ácida seja eficiente e consiga transferir o P quase completamente do meio sólido para o líquido, sob  $\text{pH} < 2$ , indesejáveis componentes como metais (Fe, Al ou Ca) podem ser igualmente dissolvidos e atrapalharem o pós-processo. Dessa forma sugere-se que uma etapa de remoção destes metais, prévia a extração, seja realizada, porém este passo é tratado como o mais complicado, e o dispêndio de trabalho e energia pode não se justificar de acordo com a finalidade do processo (PETZET; CORNEL, 2013).

A extração química dependente de pH é um método promissor para separar elementos provenientes de cinzas, utilizando produtos químicos para reduzir a quantidade de elementos presentes nesta forma de resíduo. Esta técnica de recuperação apresenta baixo consumo de produtos químicos e permite a utilização do fósforo existente nas cinzas (TAN; LAGERKVIST, 2011). Dessa forma, a extração ácida de P a partir de cinzas residuais é muito utilizada e tem sido frequentemente reportada na literatura (BISWAS et al., 2009; PETTERSSON; AMAND; STEENARI, 2008; PETZET; CORNEL, 2013).

### 2.3.6. Metodologias colorimétricas de quantificação de fósforo

A ocorrência de fósforo nas águas naturais e residuais é quase exclusivamente como fosfatos. Estes são classificados como ortofosfatos, fosfatos condensados (piro-, meta- e outros polifosfatos) e fosfatos organicamente ligados (NIVENS et al., 1999). Desde 1905 o “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” tem sido o texto padrão para análise de água, águas residuais e materiais relacionados (DOOLITTLE, 2014).

Alguns métodos descritos no *Standard Methods* são bem difundidos e possuem etapas em comum. As análises de fósforo consistem em dois passos processuais gerais: (a) conversão da forma de fósforo de interesse em ortofosfato dissolvido e (b) determinação colorimétrica de ortofosfato dissolvido (NIVENS et al., 1999). Além disso, os procedimentos padrões citados abaixo são comuns aos métodos e recomendados pelo *Standard Methods*, devendo ser realizados previamente para determinação de P.

– Lavagem ácida da vidraria utilizada: usar vidro para determinar baixas concentrações de fósforo. A contaminação por fosfato é comum devido à sua adsorção em superfícies de vidro, dessa forma é necessário limpar todos os vidros com HCl diluído e enxaguar bem com água destilada. Evitar usar detergentes comerciais contendo fosfato. De preferência, reservar o vidro apenas para a determinação de fosfato;

– Solução padrão de fosfato: Dissolver em água destilada 219,5 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e diluir para 1000 mL, dessa forma, 1,0 mL terá 50,0  $\mu\text{g}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$  - P. Esta solução será usada para preparar a curva de calibração de concentração de fosfato, que será usada para converter leituras espectrofotométricas em concentrações. Diluindo esta solução para no mínimo 6 diferentes diluições e as submetendo ao método, plota-se um gráfico “absorbância X concentração de fosfato” que fornecerá uma reta com uma equação que permitirá descobrir a concentração da amostra desejada (FIGURA 9) (NIVENS et al., 1999).

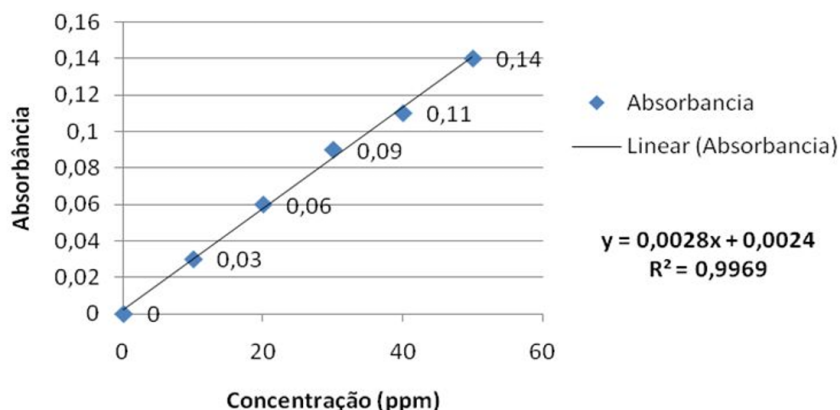


Figura 9: Curva de calibração do fosfato.  
Fonte: SOUZA; OLIVEIRA, 2010.

### 2.3.6.1. Método do Ácido Ascórbico

O método do ácido ascórbico é a técnica mais comumente utilizada, possui uma concentração mínima de detecção de aproximadamente 10 µg de P/L. Neste método, o molibdato de amônio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e o tartarato de antimônio e potássio ( $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ ) reagem em um meio ácido com soluções diluídas de ortofosfato para formar o complexo antimônio-fosfo-molibdato. Este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico a um complexo intensamente azul com sua absorbância lida em espectrofotômetro a 880 nm (DOOLITTLE, 2014; MURPHY; RILEY, 1962).

É comum os métodos colorimétricos possuírem interferências, ou seja, substâncias que podem alterar a quantificação real do resultado. No caso do método do ácido ascórbico, os arseniados reagem com o reagente de molibdato para produzir uma cor azul semelhante à formada com fosfato. Baixas concentrações como 0,1 mg/L de As (Arsênio) interferem na determinação do fosfato. Cromo hexavalente e  $\text{NO}_2^-$  interferem dando resultados cerca de 3% menores que o real, quando em concentrações de 1 mg/L e 10 a 15% menores quando a 10 mg/L (NIVENS et al., 1999).

### 2.3.6.2. Método do Ácido Vanadomolibdofosfórico

Como princípio, numa solução diluída de ortofosfato, o molibdato de amônio reage sob condições ácidas para formar um heteropoliácido, ácido molibdofosfórico. Na presença de vanádio, forma-se então o ácido vanadomolibdofosfórico de coloração amarela. Dessa maneira, a intensidade da

cor amarela, medida por espectrofotômetro óptico, é proporcional à concentração de fosfato (NIVENS et al., 1999).

Interferência positiva (superestimar o valor) pode ser causada por sílica e arseniato apenas se a amostra for aquecida. Já interferências negativas são causadas por arseniato, fluoreto, tório, bismuto, sulfeto, tiosulfeto, tiocianato ou molibdato em excesso. A cor azul que pode ser gerada é causada pelo ferro ferroso, mas isso não afeta os resultados se a concentração de ferro ferroso for inferior a 100 mg/L (NIVENS et al., 1999). Em concentrações até 1000 mg/L, os íons a seguir não causam interferência no resultado:  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Li}^{+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{NH}_4^{+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ ,  $\text{U}_4^{+}$ ,  $\text{Zr}_4^{+}$ ,  $\text{AsO}_3^{-}$ ,  $\text{Br}^{-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{ClO}_4^{-}$ ,  $\text{CN}^{-}$ ,  $\text{IO}_3^{-}$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ ,  $\text{NO}_3^{-}$ ,  $\text{NO}_2^{-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ , pirofosfato, molibdato, tetraborato, seleniato, benzoato, citrato, oxalato, lactato, tartarato, foriato e salicilato (NIVENS et al., 1999).

A concentração mínima detectável do Ácido Vanadomolibdofosfórico é de 200 µg de P/L, o que torna o método não útil para pequenas quantidades de P na amostra. Outra questão importante deste método, é que o comprimento de onda no qual a intensidade de cor é medida depende da sensibilidade desejada, pois a sensibilidade varia com comprimentos de onda de 400 a 490 nm, sendo 470 nm o mais usado (TABELA 8) (NIVENS et al., 1999).

Tabela 8: Faixas de concentração para diferentes comprimentos de onda no método do ácido vanadomolibdofosfórico.

Faixa de P (mg/L)	Comprimento de onda (nm)
1.0 - 5.0	400
2.0 - 10.0	420
4.0 - 18.0	470

Fonte: NIVENS et al., 1999.

### 2.3.6.3. Método do Cloreto de Estanho

No método do Cloreto de Estanho o ácido molibdofosfórico é formado e reduzido pelo cloreto de estanho para formar o intenso e colorido azul de molibdênio. Este método é mais sensível do que o método do Ácido Vanadomolibdofosfórico e torna as medições viáveis até baixas concentrações de P.

Em valores abaixo de 100 µg de P/L, uma etapa de extração para solubilizar o P pode aumentar a confiabilidade e diminuir a interferência. O concentração mínima detectada por este método é de 3 µg de P/L e suas interferências são as mesmas do método do Ácido Vanadomolibdofosfórico (NIVENS et al., 1999).

O comprimento de onda para a determinação deste método deve ser padronizado em 625 nm quando a amostra se tratar de extratos de benzeno-isobutanol, e comprimento de onda de 690 para amostras aquosas. Caso o instrumento não possua o comprimento de 690 nm, a amostra deverá ser lida em 650 nm, porém com sensibilidade e precisão reduzida (NIVENS et al., 1999).

#### 2.3.6.4. Método do Verde Malaquita

O método colorimétrico Verde Malaquita é um procedimento que tem sido usado para quantificar concentrações submicromolares de P em águas e extratos solo-aquosos. Semelhante ao método do Ácido Áscorbico, o Verde Malaquita também se baseia na formação de um complexo fosfomolibdato sob condições ácidas, no entanto, o segundo é cerca de 3,3 vezes mais sensível que o primeiro (D'ANGELO; CRUTCHFIELD; VANDIVIERE, 2001).

Com o objetivo de tornar mais prático a quantificação de P de um grande número de amostras, D'ANGELO; CRUTCHFIELD e VANDIVIERE (2001), adaptaram o método do Verde Malaquita para um protocolo mais rápido e menos custoso comparado a metodologia do Ácido Áscorbico e a cromatografia de íons.

O método proposto, é baseado na complexação do corante verde malaquita com fosfomolibdato sob condições ácidas. A metodologia foi adaptada a um formato de placa de microtitulação de 96 poços e foi avaliada para interferências utilizando solos e alguns extratos comuns, incluindo água, KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaOH e HCl. A precisão da determinação de P foi afetada quando CaCl<sub>2</sub> foi maior que 0,1 M, e quando a concentração de NaOH e HCl excederam 0,4 M e 0,1 M respectivamente, devido a influencia do grau de acidez na faixa ótima de formação do complexo verde malaquita-fosfomolibdato (D'ANGELO; CRUTCHFIELD; VANDIVIERE, 2001).

O limite de detecção do método foi calculado em 6 µg/L, mesmo trabalhando em volumes limitados. O procedimento utiliza quantidades reduzidas (40µL) de dois reagentes que possuem uma estabilidade > superior a um ano. Este método permite que o P seja determinado rapidamente em uma ampla gama de tipos de solo e extratos e gera baixas quantidades de resíduos perigosos (D'ANGELO; CRUTCHFIELD; VANDIVIERE, 2001).

#### 2.4. CINZAS DE BIOMASSAS ENERGÉTICAS

Durante os últimos anos, o interesse por produção de energia sustentável tem sido visto globalmente. Os combustíveis de biomassa são neutros em termos de CO<sub>2</sub> e a sua utilização para a produção de energia poderia reduzir substancialmente o efeito estufa a nível global (TAN; LAGERKVIST, 2011).

Por outro lado, com o crescimento do uso de biomassas energéticas, o aumento na produção de resíduos como as cinzas são observadas (AHMARUZZAMAN, 2010). As cinzas são derivadas da queima de biomassa e são produzidas em grandes volumes sendo originadas da madeira (cavacos, chips, briquetes, carvão vegetal, etc.), bagaço de cana, gramíneas (*Miscanthus*, *Panicum*, bambu, etc.), ou resíduos agroindustriais (torta prensagem de palma, casca de arroz, palha de trigo, etc.). Estes resíduos são produzidos em quantidades enormes, e constitui tipicamente cerca de 5-15% da massa seca de biomassas como madeira ou resíduos agroindustriais.

A constituição da biomassa é variável e depende de fatores como solo, tipo de biomassa, colheita (THY et al., 2006). Sua composição e quantidade de matéria inorgânica variam mais do que o carvão, mesmo que em biomassas de mesmo tipo, onde as propriedades da cinza podem diversificar de acordo com o crescimento vegetal e as condições do processo como clima, estação, armazenamento, temperatura de combustão e origens geográficas (AHMARUZZAMAN, 2010; SIDDIQUE, 2012; WISELOGEL et al., 1996).

Tendo-se conhecimento sobre sua composição, é possível elaborar um destino ecológico que se enquadre melhor para cada tipo de resíduo. Algumas biomassas possuem grande quantidade de silício (casca de arroz, por exemplo) (SANTASNACHOK; KURNIAWAN; HINODE, 2015; THANH;

SIEWERT; LUDWIG, 2015) e tem sido utilizada como um aditivo no concreto para aumento de durabilidade, resistência e força de compressão (CHOPRA; SIDDIQUE; KUNAL, 2015; YU et al., 1999). Outras, como madeira, possuem alto conteúdo de metais alcalinos (BERRA; MANGIALARDI; PAOLINI, 2015; VASSILEV et al., 2013). Cinza de bagaço de cana tem sido amplamente examinada e adotada como adsorvente, bem como um aditivo em cimento e concreto, melhorando a sua durabilidade (ALMEIDA et al., 2015; MARTIRENA et al., 2006). Outras cinzas de biomassa têm sido aproveitadas como material fertilizante, devido ao conteúdo de K e P (BUDHATHOKI; VAISÄNEN, 2016).

A palma de óleo é uma das principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel (TANGCHIRAPAT; JATURAPITAKKUL; CHINDAPRASIRT, 2009), e seus resíduos como o cacho vazio (EFB - *Empty Fruit Bunch*), fibra da palma, casca de palma, vem sendo gerados em maior escala, visto que apenas 10% de toda a planta é utilizada de maneira significativa (AZIZ et al., 2016).

Diversos autores investigaram a constituição da palma de óleo e seus resíduos, e identificaram quantidades relativamente significativas de fósforo e potássio em suas cinzas (TABELA 9).

Embora as cinzas de biomassa possam produzir algumas desvantagens, o resíduo em questão contém elementos nutritivos valiosos como o fósforo e o potássio, que podem ser reutilizados após recuperação destes nutrientes (TAN; LAGERKVIST, 2011). Vários autores têm explorado métodos para remover os elementos constituintes das cinzas. Métodos de lixiviação têm sido comprovadamente eficazes na remoção de elementos formadores de cinzas do carvão e, recentemente, este método foi introduzido para lixiviação de cinzas de biomassa (CHIN et al., 2015).

Tabela 9: Composição de diferentes cinzas de resíduos de palma reportados na literatura.

<i>Componentes</i>	(LAHIJANI et al., 2013)		(ACQUAH et al., 2016)	(RANJBAR et al., 2014)	(BASHAR et al., 2016)	(MOHAMED et al., 2005)	(HAMEED; AHMAD; AZIZ, 2007)	(LEE; BHATIA; MOHAMED, 2005)	(MADHIYANON et al., 2012)	(ZAINUDIN et al., 2005)
	<i>EFB</i>	<i>PS</i>	OPA	POFA	POFA	OPA	APA	OPA	EFB	OPA
<b>SiO<sub>2</sub></b>	27,00	49,70	86,44	64,17	67,72	35,60	40,00	37,00	12,12	40,00
<b>CaO</b>	8,00	10,20	-	5,80	5,57	12,00	10,00	9,20	9,65	10,00
<b>K<sub>2</sub>O</b>	44,00	12,20	-	8,25	7,67	11,00	12,10	11,00	55,48	12,10
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	-	7,70	6,49	3,73	3,71	4,80	6,10	14,30	0,26	6,10
<b>MgO</b>	4,80	6,90	1,51	4,87	4,04	7,20	6,40	6,10	1,90	6,40
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	3,60	8,40	-	5,18	-	6,80	8,32	6,20	3,58	8,20
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	3,00	2,70	4,08	6,33	4,71	2,00	-	2,50	-	2,50
<b>SO<sub>3</sub></b>	2,70	-	0,20	0,72	1,07	-	-	-	1,66	-
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	-	-	0,10	0,18	0,16	-	-	0,10	0,09	-
<b>Cl</b>	5,30	-	-	-	-	-	-	2,90	6,84	-
<b>C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,40
<b>TiO<sub>2</sub></b>	-	-	-	0,19	-	-	-	-	-	-
<b>MnO</b>	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-	-
<b>MnO<sub>2</sub></b>	-	-	0,10	-	-	-	-	-	-	-
<b>ZnO</b>	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-
<b>Rb<sub>2</sub>O</b>	-	-	-	0,06	-	-	-	-	-	-
<b>Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	-	-	0,69	0,03	-	-	-	-	-	-
<b>Rh<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	-	-	0,41	-	-	-	-	-	-	-
<b>CuO</b>	-	-	-	0,08	-	-	-	-	-	-
<b>RuO<sub>2</sub></b>	-	-	0,29	-	-	-	-	-	-	-
<b>SrO</b>	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-
<b>ZrO<sub>2</sub></b>	-	-	-	< 0,01	-	-	-	-	-	-
<b>NiO</b>	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-
<b>Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	-	-	-	< 0,01	-	-	-	-	-	-

- EFB: Empty Fruit Bunch  
- PS: Palm Shell  
- POFA: Palm Oil Fuel Ash  
- OPA: Oil Palm Ash  
- APA: Activated Palm Ash

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. CARACTERIZAÇÃO DA CINZA DE PALMA**

O material de estudo foi a cinza resultante da queima da torta de prensagem da palma de óleo, cedida pela BioPalma S.A. (Mojú, Pará). As plantas de produção de óleo de palma usualmente queimam a torta, um resíduo com alto poder calorífico, gerando vapor que é usado no processo.

##### **3.1.1. Cromatografia de íons**

Por se tratar de uma etapa inicial de caracterização, foi necessário um processo de extração que teve como objetivo a máxima eficiência de solubilização de elementos presentes no resíduo de estudo. Para que isso ocorresse, a solubilização dos cátions presentes e principalmente dos ânions fosfato, poderia ser conseguida através de reações dependentes de pH (TAN; LAGERKVIST, 2011). Desse modo, para a tentativa de extração completa dos íons, a proporção sólido/líquido utilizada foi de 1/100 (p/p), onde um grama de resíduo foi suspensa em 100 mL de ácido.

De acordo com a literatura, é fundamental o alto grau de acidez da solução para que ocorra a dissolução eficiente no processo. Considerando também que foi usado excesso estequiométrico de ácido, a condição utilizada para a digestão foi de 1M de Ácido Nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), ácido capaz de formar sais solúveis com os cátions presentes nas amostras.

Optou-se por uma reação de 12 horas, com o objetivo de garantir uma boa solubilização dos elementos presentes na cinza. A temperatura escolhida para a reação foi de 55°C, valor este dentro da faixa reportado pela literatura.

A reação foi realizada sob agitação manual, em frasco Erlenmeyer previamente lavado com  $\text{HNO}_3$  20% (m/v) e enxaguado com água Milli-Q.

##### **3.1.1.1. Preparação da amostra**

O resíduo de palma obtido poderia não estar totalmente calcinado, e adquirido umidade durante o transporte das cinzas, dessa forma optou-se por fazer duas extrações, com a cinza no estado que foi adquirida, e a cinza recalcinada em mufla a 570°C.

Utilizou-se 20 gramas de cinza de palma pesadas em balança analítica, e peneirados (peneira com dimensões 23 x 12,7 x 5,5 cm e 1 mm de abertura) para a remoção de materiais não calcinados previamente, como fibras e outros. A cinza então foi macerada em almofariz com auxílio de pistilo (FIGURA 10).



Figura 10: Cinza de biomassa de palma macerada em almofariz.

Os cadinhos utilizados para a calcinação das amostras foram mantidos por 15 horas em estufa a 85°C a fim de excluir a umidade, e, posteriormente, colocados em dessecador para resfriar até massa constante.

Para a calcinação, 1 g de cinzas foram determinadas em triplicata e colocados em mufla e calcinados a 570°C por 4h. Após arrefecimento das amostras, as mesmas foram novamente pesadas para avaliação da perda ao fogo (análise utilizada para estimar quantidade de matéria volátil a partir da calcinação de amostra de massa conhecida).

Para a digestão da amostra 1g de cinza e 1g de cinza calcinada foram misturados com 100mL de HNO<sub>3</sub> a concentração de 1M cada, em triplicata. A digestão ocorreu sob aquecimento a 55°C durante 12h em estufa, sob um pH inicial de 1,2. Após o aquecimento e homogeneização do material, o material

foi recuperado do recipiente com auxílio de água Milli-Q. A amostra recuperada foi filtrada em filtro de nitrocelulose com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . Para o procedimento, utilizou-se uma bomba de vácuo conectada a um frasco Kitassato (2 litros) e um funil de Büchner. Após a filtração, a solução obtida foi aferida a 500 mL em balão volumétrico, promovendo uma diluição de 5 vezes (solução/água milli-Q).

Os extratos obtidos foram então diluídos por mais 100 vezes com água milli-Q, totalizando uma diluição de 500 vezes, e submetidos a análise de cromatografia líquida de íon. Para esta análise utilizou-se cromatógrafo pertencente a marca Metrohm®, coluna cromatográfica METROSEP C3 250/4.0 com fase móvel de  $\text{HNO}_3$  3,5 mM para análise de cátions, e METROSEP A Supp 5 250/4.0 com fase móvel de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,2 mM e  $\text{NaHCO}_3$  1,0 mM para análise de ânions.

Paralelamente, 30 gramas de cinza não calcinada foram submetidas a análise de fluorescência de raios X, a fim de avaliar a composição da cinza por outra metodologia, muito reportada na literatura para este tipo de resíduo.

### **3.1.2. Fluorescência de raios X**

A análise por fluorescência de raios X se baseia na medição das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra, quando excitada por partículas como elétrons, prótons ou íons. A análise química semiquantitativa por espectrometria de fluorescência de raios X (FRX), consistiu primeiramente no preparo da amostra, iniciado pelo quarteamento em 30 gramas. Após isso, foi realizado uma moagem em um moinho de discos de Tungstênio, a fim de reduzir a granulometria do material.

Em seguida, confeccionou-se uma pastilha prensada com 7,0 gramas de amostra + 1,4 gramas de cera orgânica, pesadas em balança analítica. As etapas do processo seguem com o ensaio de perda ao fogo a 1.000° C por 2 horas, e pela análise semiquantitativa (ou varredura química), do material resultante, como pode ser observado na figura 11, juntamente com a metodologia realizada na cromatografia de íons.

O equipamento utilizado para o procedimento foi um Espectrômetro de Fluorescência de Raios X, marca PANalytical, modelo *Axios Max*. Para a interpretação dos resultados, utilizou-se o Software *SuperQ 5i*. Os ensaios foram realizados no LAMIR-UFPR.

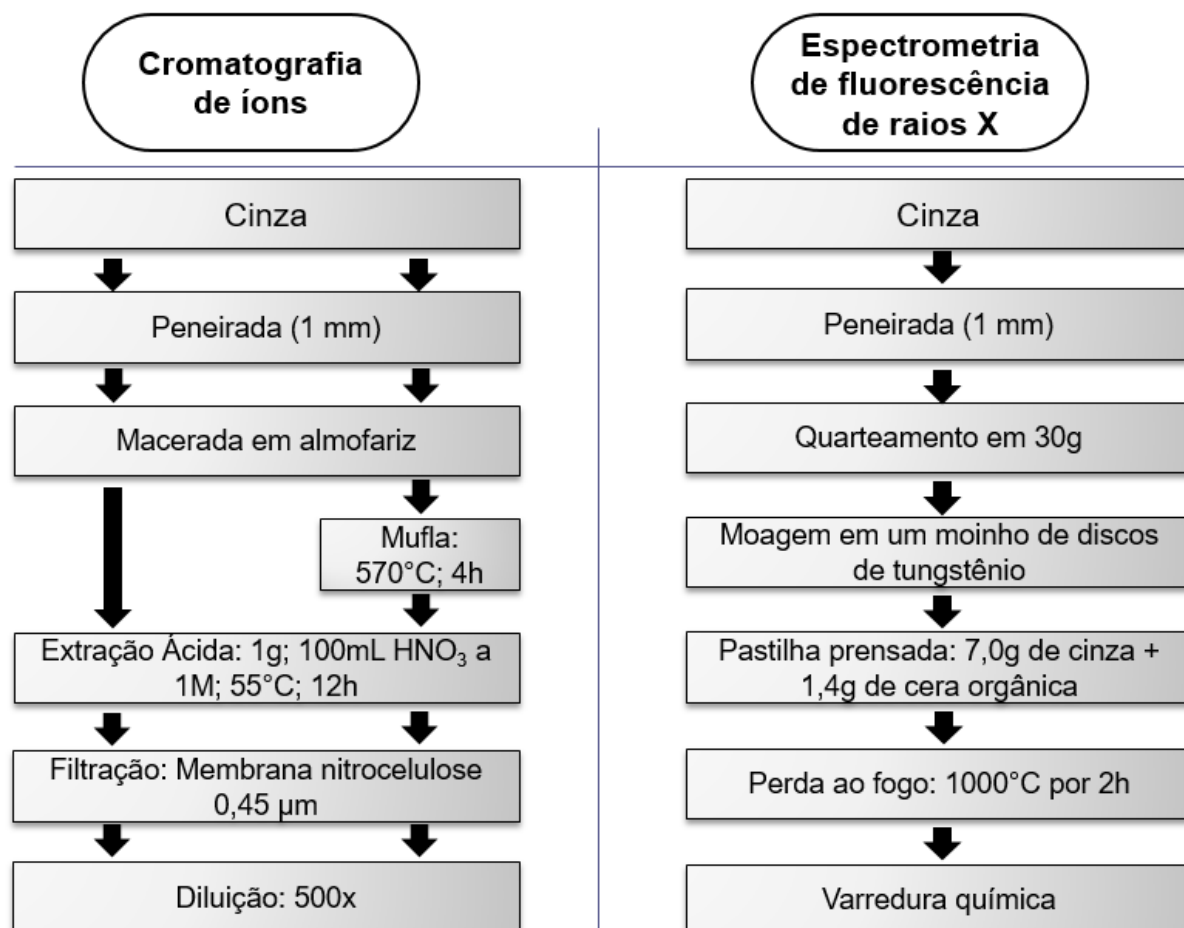


Figura 11: Descrição da cromatografia de íons e fluorescência de raios X, utilizadas para a análise da composição química das cinzas de palma de óleo

### 3.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE FÓSFORO DE CINZA DA PALMA DE ÓLEO

A otimização da extração de fósforo a partir da cinza de palma foi constituída por duas etapas. Na primeira foi realizado um planejamento 3<sup>3</sup> e na segunda etapa fez-se a cinética de extração com uma das condições escolhidas.

### 3.2.1. Planejamento Fatorial 3<sup>3</sup>

O planejamento 3<sup>3</sup> foi realizado para mapear os fatores mais significantes a extração de fósforo (P). Foram realizadas extrações em 27 condições diferentes nas quais as variáveis temperatura, mols de HNO<sub>3</sub> por grama de cinza e volume de HNO<sub>3</sub> por grama de cinza foram estudadas, tendo como variável resposta, a concentração de fósforo na forma de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para melhor comparação com a forma expressa na composição das cinzas. As condições do experimento estão apresentadas na Tabela 10:

Tabela 10: Condições das variáveis adotadas no experimento.

Amostra	Condições do Experimento		
	Temperatura (°C)	Mols de ácido/g de cinza	Volume da solução (mL/g de cinza)
1	70	0,01	50
2	70	0,01	100
3	70	0,01	150
4	70	0,02	150
5	70	0,03	150
6	70	0,03	100
7	70	0,03	50
8	70	0,02	50
9	70	0,02	100
10	45	0,01	50
11	45	0,01	100
12	45	0,01	150
13	45	0,02	150
14	45	0,03	150
15	45	0,03	100
16	45	0,03	50
17	45	0,02	50
18	45	0,02	100
19	45	0,02	100
20	45	0,02	100
21	20	0,01	50
22	20	0,01	100
23	20	0,01	150
24	20	0,02	150
25	20	0,03	150
26	20	0,03	100
27	20	0,03	50
28	20	0,02	50
29	20	0,02	100

As amostras 18, 19 e 20 representam as triplicatas do ponto central do planejamento

O tempo de reação escolhido foi de 24h, com o objetivo de se extrair o máximo possível de fósforo do 1 grama de cinza de palma digerido com  $\text{HNO}_3$ . O  $\text{HNO}_3$  foi o ácido escolhido para extrair o fósforo justamente para ser a fonte de nitrogênio (elemento necessário para o cultivo de microalgas) dos meios nutritivos posteriores. A faixa de 0,01 a 0,03 mol de  $\text{HNO}_3$  foi escolhida com base em trabalhos na literatura (OTTOSEN; KIRKELUND; JENSEN, 2013; PARÉS VIADER et al., 2015; XU et al., 2012), e com base em cálculos previamente realizados, onde verificou-se a viabilidade de extrações de fósforo e a obtenção de solução com proporção N/P próxima da Relação de Redfield (TYRRELL, 2001), entre o nitrogênio proveniente do  $\text{HNO}_3$  e o fósforo extraído da cinza de palma.

Após o término da extração, foram feitas filtrações utilizando um sistema de filtração, uma bomba de vácuo, e membranas de nitrocelulose com porosidade de  $0,45\mu\text{m}$ . O sistema de filtração foi composto por um recipiente superior de 300mL, uma garra, placa de vidro sinterizada, funil com junta esmerilhada para vácuo e um frasco de filtração Kitassato de 1 Litro. As amostras então foram diluídas em tubos de ensaios para o ajustamento e preparo do teste colorimétrico que quantifica o fosfato.

### 3.2.2. Cinética de extração do fósforo

A cinética da extração do fósforo foi feita baseada em informações advindas da literatura (CHIN et al., 2015; SHEMI et al., 2014; WZOREK et al., 2006; XU et al., 2015). Após ter sido realizado um experimento de otimização de condições de extração (planejamento  $3^3$ ), realizou-se uma cinética de 30 horas com objetivo de determinar um tempo de reação mínimo que apresente resultados satisfatórios, onde os custos gerais do processo diminuam, levando a uma maior viabilidade de implantação. Para a realização da cinética foram adotados os tempos de contato apresentados na tabela 11:

Tabela 11: Tempos de coleta das amostras para análise de fósforo.

15 Minutos
30 Minutos
45 Minutos
60 Minutos
90 Minutos
120 Minutos
240 Minutos
480 Minutos
600 Minutos
1440 Minutos
1800 Minutos

A extração foi realizada com as mesmas condições da amostra que apresentou o menor resultado de recuperação do fósforo no experimento anterior, para determinar o tempo mínimo de contato adequado para extração. Após o tempo determinado, as amostras foram coletadas em microtubos de 2 mL, centrifugadas a 7.000 x g durante 5 minutos para a separação de partículas sólidas do meio líquido. Alíquotas do sobrenadante do centrifugado foram então diluídas em tubos de ensaios para o ajuste e preparo para o teste colorimétrico que quantifica o fosfato. Todos os pontos do teste foram avaliados em triplicatas.

### 3.3. QUANTIFICAÇÃO DE FÓSFORO SOLÚVEL

Os extratos e os sobrenadantes obtidos nos experimentos anteriores foram submetidos a um teste colorimétrico para a quantificação de fósforo solúvel. Para este teste foi utilizado o método colorimétrico com Verde Malaquita conforme (D'ANGELO; CRUTCHFIELD; VANDIVIERE, 2001). Adaptou-se o teste para a leitura da absorbância utilizando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 630nm. As amostras foram então diluídas em tubos de ensaios para o enquadramento na curva padrão previamente adquirida. As amostras foram taradas com um branco, onde utilizou-se água Milli-Q para substituir a amostra filtrada. Toda a vidraria utilizada foi lavada com HCl 10% (m/v) por 24 horas e enxaguada com água Milli-Q, a fim de remover possíveis resíduos de P (NIVENS et al., 1999).

### 3.4. CRESCIMENTO MICROALGAL A PARTIR DE EXTRATO DE CINZA DE PALMA

#### 3.4.1. Microrganismos

As microalgas utilizadas são cepas utilizadas no Laboratório de Engenharia de Microalgas (Universidade Federal do Paraná - UFPR). Essas microalgas são mantidas rotineiramente por cultivos sucessivos em meio adequado.

Foi utilizada a cianobactéria *Spirulina platensis* (cepa PAR), mantida em meio Zarrouk, em fotobiorreatores a temperatura média de 30°C com pH 9,5, aeradas e sob irradiação constante média de 2klux (unidade de iluminância, medindo o fluxo luminoso por unidade de área). As microalgas utilizadas foram *Neochloris oleabundans* UTEX 1185 e *Dunaliella salina* SAG 184.8, as quais também

foram mantidas rotineiramente por cultivos sucessivos, em meios BG-11 e *Modified Jhonson's Medium* (MJM) (BOROWITZA et al., 1988) respectivamente, em fotobiorreatores a temperatura de 25°C com pH 7,5 e 7,1 respectivamente, aeradas e sob irradiação constante de 2klux.

### 3.4.2. Meios de cultivo

Os meios de cultivo dos testes com extração otimizada foram caracterizados em Controle e Meio Alternativo denominado BAX (*Biomass Ash Extract*). Os Meios de Cultivo para o Controle foram usados com a seguinte composição:

- Zarrouk: 16,8 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 g/L NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0 g/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 g/L NaCl, 40 mg/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 80 mg/L Na<sub>2</sub>EDTA, 200 mg/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 1,0 mL de solução de micronutrientes: 2,86 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 20 mg/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 1,8 g/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 80 mg/L CuSO<sub>4</sub> e 220 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ajustado o pH 9,5 para *Spirulina platensis*;
- BG-11: 20 mg/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,5 g/L NaNO<sub>3</sub>, 40 mg/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 36 mg/L CaCl<sub>2</sub>, 75 mg/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6 mg/L ácido cítrico, 6 mg/L citrato férrico de amônio, 1 mg/L Na<sub>2</sub>EDTA e 1,0 ml de solução de micronutrientes: 2,86 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 390 mg/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,81 g/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 80 mg/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 50 mg/L, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O e 220 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ajustado pH 7,5 para *Neochloris oleabundans*;
- MJM: 87,7 g/L NaCl, 1,5 g/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,0 g/L KNO<sub>3</sub>, 35 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,44 mg/L FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,89 mg/L Na<sub>2</sub>EDTA, 43 mg/L NaHCO<sub>3</sub> e 10,0 ml de solução de micronutrientes: 61,0 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 38,0 mg/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 6,0 mg/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5,1 mg/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 4,1 mg/L ZnCl<sub>2</sub>, 4,1 mg/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ajustado pH 7,1 para *Dunaliella salina*.

O meio de cultivo de interesse da pesquisa foi formulado a partir da extração ácida de 1g cinza de palma. A condição de extração utilizada foi a número 4 do planejamento fatorial 3<sup>3</sup> (70°C; 150ml/g de cinza; 0,02mol de H<sup>+</sup>/g de cinza), dessa forma, a extração se deu com condições proporcionais aos parâmetros da condição 4.

A duração da extração foi estipulada em 24 h para garantir a máxima extração de fosfato. Após a extração, o extrato foi filtrado em membrana de nitrocelulose com tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Para o procedimento, utilizou-se uma bomba de vácuo conectada à sistema de filtração. Após isso, o extrato foi separado em três lotes, onde cada extrato foi diluído para se ter a mesma concentração teórica usável de P dos meios controles (Zarrouk, BG-11 e MJM), referente a Redfield Ratio, para serem os meios BAX de *Spirulina platensis*, *Neochloris oleoabundans* e *Dunaliella salina*. Após a diluição para o extrato referente a *D. salina*, foram adicionados 87,7 g/L de NaCl a fim de manter a salinidade semelhante ao meio controle MJM (FIGURA 12).

Os extratos foram alcalinizados com NaOH a 10M até os pHs de 7,5; 7,1 e 9,5 (para *Neochloris oleoabundans*, *Dunaliella salina* e *Spirulina platensis* respectivamente), a fim de levar o pH para o valor correspondente aos dos meios controles. Após isso, todo o material foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, e, posteriormente, o meio foi disposto em frascos Erlenmeyers para a realização do procedimento.

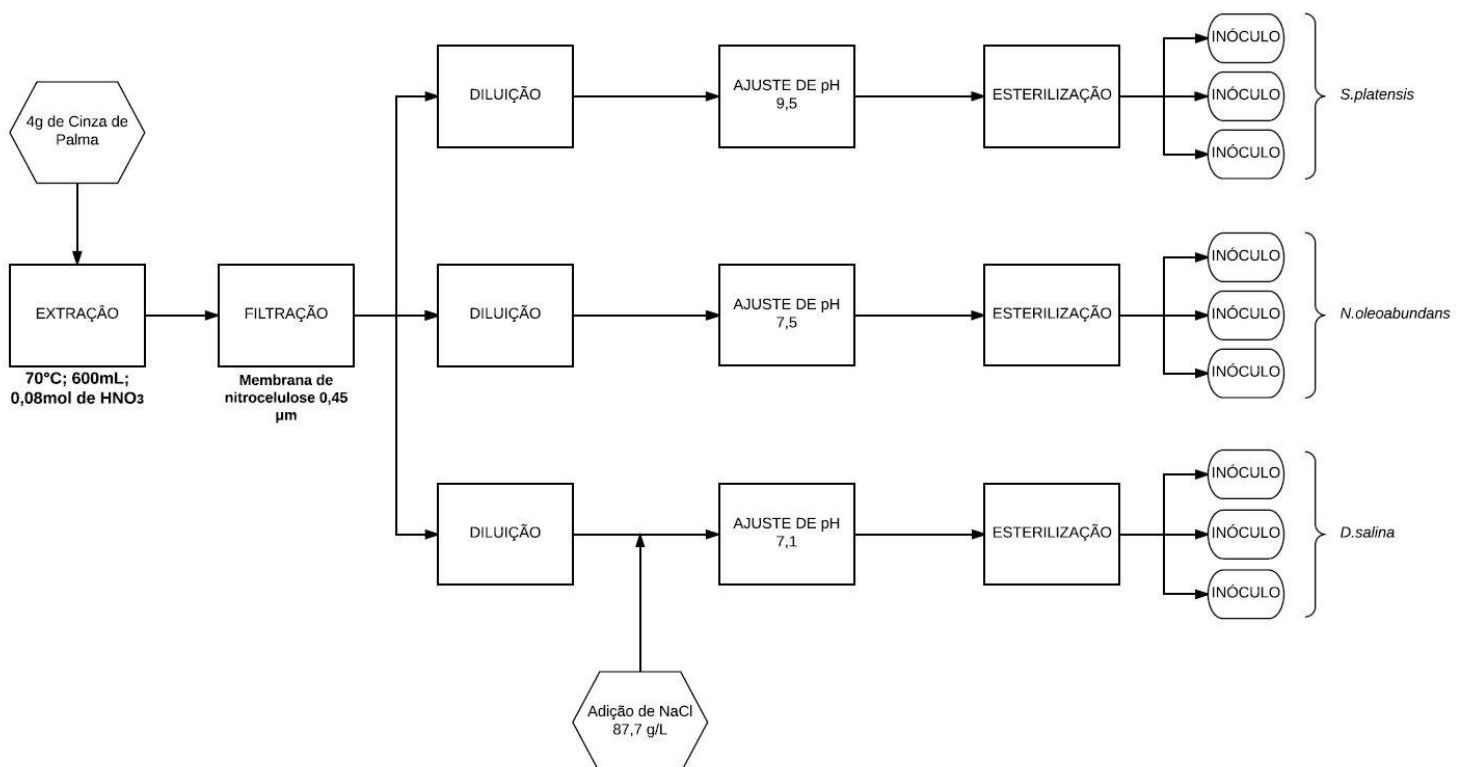


Figura 12: Fluxograma da preparação do meio de cultivo BAX.

### 3.4.3. Condições de cultivo

Os meios (Controles e BAX) foram realizados em triplicata para cada microalga, contendo um volume total 500 mL (Meio 450ml + Inóculo 50ml) cada, dispostos em frascos Erlenmeyers de 1 litro, manuseados de maneira estéril. As concentrações iniciais dos cultivos foram de 0,09 g/L para *S. platensis*, 0,09 g/L para *N. oleoabundans* e 0,13 g/L e 0,12 g/L para *D. salina* em meio controle e BAX respectivamente.

As condições de cultivo para *Spirulina platensis* foram em ambiente climatizado à temperatura média de 30°C com intensidade luminosa constante de 2klux e agitação manual periódica (FIGURA 13).



Figura 13: Cultivo de *S. platensis* em meios BAX e Zarrouk sob temperatura média de 30°C e intensidade luminosa de 2klux. Imagem registrada no dia 0.

*Neochloris oleoabundans* e *Dunaliella salina* foram cultivadas a 25°C com iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes brancas), e também sob intensidade luminosa constante de 2klux e agitação manual periódica (FIGURA 14). Os cultivos duraram 31 dias para *Spirulina platensis* e *Neochloris oleoabundans*, e 27 dias para *Dunaliella salina*.



Figura 14: Cultivo de *N. oleoabundans* em meios BAX e BG 11, *D. salina* em meios BAX e MJM, sob temperatura média de 25°C e intensidade luminosa de 2klux. Imagem registrada no dia 0.

#### 3.4.4. Escalonamento

O cultivo em escala ampliada foi realizado com a cianobactéria *Spirulina platensis* em estufa externa. Apenas esta espécie foi avaliada devido ao clima quente (temperaturas máximas acima de 30°C) observado na estufa, reflexo da temperatura ambiente externa.

A preparação do meio BAX foi idêntica ao realizado para *S. platensis* em escala laboratorial, porém em quantidade maior. O cultivo foi realizado em um tanque de 1000L, de maneira não estéril, onde foram colocados 80 litros de meio BAX e 40 litros de inóculo de *S. platensis*, tendo uma concentração inicial de 0,22 g/L.

O cultivo permaneceu tampado com lona plástica com objetivo de impedir o acúmulo de poeira e possível entrada de insetos dentro da cultura. Foram utilizados 6 difusores de ar para aerar a cultura com ar pré-filtrado por filtros de tamanho de poro 0,2 µm, modelo MIDISART® 2000 (FIGURA 15).



Figura 15: Tanque de escalonamento de cultivo de *S. platensis* com meio BAX em estufa externa (depois coberto com lona).

#### 3.4.5. Avaliação de crescimento e consumo de fósforo

A determinação da biomassa foi realizada retirando-se amostras periódicas, para análise da absorbância, feita no comprimento de onda de 670 nm para as três microalgas, conforme FREITAS (2012), SILVA et al., (2016) e WALTER (2011), utilizando espectrofotômetro modelo SP 2000, HINOTEK®. As medidas de densidade óptica foram realizadas com diluição 50% (v/v) com formiato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_2$ ) a 0,5 mol/L a fim de lavar possíveis precipitados salinos nas amostras e eliminar interferências nas leituras. O enxágue com formiato de amônio também foi realizado nas análises de massa seca, removendo sais não dissolvidos sem que haja ruptura celular (ZHU; LEE, 1997).

Paralelamente foram realizadas análises de massa seca das amostras para correlação com a curva de absorbância gerada por espectrofotometria, a fim de calcular a concentração de biomassa produzida. Para separação da biomassa realizou-se filtrações dos meios com *Spirulina platensis* e *Neochloris oleabundans* utilizando membranas de nitrocelulose com tamanho de poro de 3  $\mu\text{m}$ , e dos meios de *Dunaliella salina* utilizando membranas com tamanho de poro de 1  $\mu\text{m}$ .

O cálculo da produtividade pode ser realizado a partir da equação 2, a seguir:

$$P = (X_i - X_0) / t_i \quad (2)$$

Onde: P = produtividade (g/L.dia);

$X_0$  = biomassa inicial (g/L);

$X_i$  = biomassa no tempo  $i$  (g/L) e

$t_i$  = intervalo de tempo (dia) entre  $X_0$  e  $X_i$ .

Após as filtrações para realização de massa seca, coletou-se 2 mL de cada amostra do filtrado para a determinação da concentração de fosfato conforme descrito anteriormente, a fim de obter uma curva de consumo/remoção do fosfato no meio de cultivo. Após as coletas para análise de fosfato, as biomassas retidas nas membranas foram lavadas com formiato de amônio a 0,5 mol/L, para solubilização de sais eventualmente precipitados e retidos na membrana.

#### **3.4.6. Análise estatística**

Os planejamentos experimentais foram desenvolvidos usando o software MS-Excel® e avaliados usando o mesmo software, assim como o pacote STATISTICA®. Foram considerados significativos efeitos ao nível de significância de 5% através da Análise de Variância (ANOVA), nos modelos desenvolvidos a partir dos resultados experimentais.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi necessário obter informações da composição do material de estudo para compará-lo com os resultados reportados na literatura e confirmar a presença de fósforo no resíduo. Para confirmar a presença e a quantidade máxima extraível de fósforo na cinza de palma, foram realizadas análises usando duas técnicas: a digestão ácida seguida de cromatografia de íons e a análise de fluorescência de raio x.

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

Para a análise de cromatografia de íons, foi necessário realizar uma extração ácida prévia para transferir os íons de P do resíduo sólido (cinza) para a fase líquida. As condições para a extração com  $\text{HNO}_3$ , que antecedeu a cromatografia foram baseadas na literatura. A escolha do ácido ( $\text{HNO}_3$ ) é baseada na sua utilização neste tipo de reação (OTTOSEN; KIRKELUND; JENSEN, 2013; PARÉS VIADER et al., 2015), além de constituir a fase móvel da cromatografia de cátions e ser a fonte de nitrogênio necessária para o cultivo de microalgas e cianobactéria.

A molaridade do  $\text{HNO}_3$  utilizado para a extração mostrou-se um fator bastante variável segundo alguns autores (0,01M a 8M) (MATJIE; BUNT; VAN HEERDEN, 2005; PARÉS VIADER et al., 2015; SHEMI et al., 2014; XU et al., 2012). Segundo SHEMI et al., (2014), a concentração do ácido para extração de alumínio, não levou a um aumento significativo quando aplicada em valores acima de 4M, apresentando uma eficiência de extração menor para a maior molaridade do ácido em solução. Assim, não se julgou necessário o uso de concentrações muito altas para o solvente, aplicando-se concentrações apenas até 1M (OTTOSEN; KIRKELUND; JENSEN, 2013; PARÉS VIADER et al., 2015; XU et al., 2012), já que a relação sólido/líquido escolhida foi relativamente alta (1g/100mL).

O baixo valor de pH é fundamental neste tipo de extração. De acordo com PARÉS VIADER et al., (2015) e TAN; LAGERKVIST, (2011), vários metais presentes em cinza de lodo de esgoto e ânions de fosfato apresentam eficiência de extração de 20% quando o pH é inferior a 3, e possuem máxima

extração quando o pH se encontra entre 1 e 2. O pH inicial observado para a concentração de ácido usada foi de 1,2, dentro da faixa considerada ideal para extração.

A literatura apresenta uma faixa ampla quando se refere ao tempo de reação. Em estudo realizado por OTTOSEN et al., (2013), a extração de fósforo ocorreu em dois tempos, 168 horas e 2 horas. Os autores reportaram que a etapa de extração não deve se alongar tanto, sendo eficiente entre 3 e 4 horas. Por outro lado, SHEMI et al., (2014) relatam após trabalharem com 6, 8 e 10 horas, que o tempo de reação é significativo, e que juntamente com a temperatura, quanto maior o valor, maior a eficiência da extração. De acordo com BISWAS et al., (2009), o tempo de contato de 4 horas foi suficiente para extração quase total de P, embora após 10h valores maiores foram observados. A escolha de 12 horas de reação teve como o único objetivo garantir uma eficiente solubilização dos elementos de interesse, já que o experimento não foi conduzido sob agitação, ao contrário dos autores supracitados. Para auxiliar a extração ácida, aliado ao tempo, a temperatura pode influenciar os resultados do processo. O valor de 55°C foi baseado em BISWAS et al., (2009), valor este considerado suficiente para extração de P a partir de cinza de lodo de esgoto.

A tabela 12 mostra a caracterização do resíduo estudado, realizada por fluorescência de raio X e cromatografia de íons, cujos resultados já estão convertidos em porcentagem da constituição total do material.

A espectrometria de fluorescência de raio X é uma técnica de análise elementar que permite a identificação de vários elementos simultaneamente de modo rápido, e tem sido aplicada em várias áreas como agropecuária, agroindustrial, geológica e ambiental (SANTOS et al., 2013).

A cromatografia iônica consiste em todos os métodos de cromatografia líquida de cátions e ânions inorgânicos, base e ácidos orgânicos solúveis em água. É uma técnica de separação e determinação de íons através de uma coluna com fase móvel (líquida) e estacionária (sólida) que possui trocadores catiônicos ou aniônicos formados a partir de polímeros como estireno divinil-benzeno e sílicas funcionalizadas (SEILER; SIGEL; SIGEL, 1994).

Tabela 12: Caracterização da cinza de palma por fluorescência de raio x e cromatografia de íons.

Componentes	Fluorescência de raios X	Cromatografia de íons	
	Massa (%)	Calcinada	Não Calcinada
		Massa (%)	
SiO <sub>2</sub>	49,40	-	-
K <sub>2</sub> O	11,60	7,87 (± 0,44)	8,81 (± 0,39)
CaO	8,70	7,70 (± 1,46)	9,89 (± 1,11)
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	8,60	0,94 (± 0,14)	0,79 (± 0,03)
MgO	5,80	4,76 (± 0,50)	5,32 (± 1,08)
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5,60	-	-
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,60	-	-
SO <sub>3</sub>	1,60	-	-
Cl	0,70	-	-
TiO <sub>2</sub>	0,20	-	-
MnO	0,10	-	-
SrO	0,10	-	-
Na <sub>2</sub> O	0,10	-	-
ZrO <sub>2</sub>	< 0,10	-	-
CuO	< 0,10	-	-
ZnO	< 0,10	-	-
P.F.	5,99	6,27(± 1,06)	-

–Cromatografia de íons com valores convertidos de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> para P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

–P.F. = Perda ao fogo

–Resultados normalizados para 100 %

No presente estudo, o sucesso da análise cromatográfica dependia consideravelmente da eficiência da extração, já que seriam estimadas as concentrações dos elementos de interesse no líquido percorrido pela coluna. Era esperado que a análise de fluorescência de raios X apresentasse valores superiores à cromatografia, já que o primeiro analisou diretamente a amostra, sem etapa de extração prévia.

Diante dos dados apresentados é possível notar a diferença nas porcentagens obtidas entre os dois métodos. Com exceção do CaO da cinza não calcinada, todos os valores foram abaixo dos obtidos pela análise de fluorescência de raios X. A análise de cátions e ânions mostra que a etapa de extração foi eficiente para os cátions, mas ou foi ineficiente para o fósforo, ou houve problemas na leitura de ânions – note-se que o extrato (analito) é o mesmo, mas as colunas e condições de eluição são diferentes para cátions e ânions. As amostras não calcinadas apresentaram porcentagens maiores comparadas as

amostras calcinadas, com exceção do próprio  $P_2O_5$ . Os cátions analisados apresentaram valores próximos aos obtidos pela análise de fluorescência de raios X.

Tomando como base a análise de fluorescência de raio X, a proporção de  $P_2O_5$  na cinza de biomassa de palma em estudo foi superior à de vários resíduos de palma encontrados na literatura. O valor de 8,60% de  $P_2O_5$  foi próximo aos reportados por LAHIJANI et al., (2013) (8,40% da casca de palma) e HAMEED; AHMAD; AZIZ, (2007) (8,32% em cinza de palma ativada). Os teores de  $SiO_2$ ,  $CaO$ ,  $K_2O$  e  $MgO$  também foram próximos (diferença de 0,3%; 1,5%; 0,6% e 1,1% respectivamente) comparados à casca da palma, apresentado por LAHIJANI et al., (2013). No presente estudo, os dois maiores constituintes inorgânicos encontrados nas cinzas foram o  $SiO_2$  e  $K_2O$ . As concentrações observadas podem variar com outros autores, uma vez que dependem do solo onde as plantas foram cultivadas, do clima, entre outros fatores.

#### 4.2. OTIMIZAÇÃO DA DISSOLUÇÃO DO FÓSFORO

Os resultados das etapas de otimização da extração de elementos a partir da cinza de palma são descritos nos itens abaixo.

##### 4.2.1. Planejamento Fatorial $3^3$

Os resultados gerados a partir do planejamento fatorial estão apresentados na tabela 13, onde são mostrados a massa de fósforo, na forma de  $P_2O_5$  recuperado, para facilitar comparação com a composição das cinzas, a porcentagem de recuperação referente a cada condição de extração realizada. É possível notar que a temperatura de 70°C favoreceu melhores resultados de extração. Era de se esperar que uma maior temperatura levasse a valores de extração de P maiores, como reportados na literatura (TAN; LAGERKVIST, 2011).

Tabela 13: Resultado da recuperação de  $P_2O_5$  no planejamento fatorial  $3^3$ .

Amostra	Condições do Experimento			$P_2O_5$ Recuperado (g)	Eficiência de recuperação de $P_2O_5$ (%)
	Temperatura (°C)	Mols de ácido/g de cinza	Volume da solução/g de cinza (mL)		
1	70	0,01	50	0,067	78,39
2	70	0,01	100	0,065	75,31
3	70	0,01	150	0,058	67,31
4	70	0,02	150	0,084	97,52
5	70	0,03	150	0,073	85,21
6	70	0,03	100	0,069	79,94
7	70	0,03	50	0,072	83,91
8	70	0,02	50	0,073	85,18
9	70	0,02	100	0,076	88,59
10	45	0,01	50	0,059	68,76
11	45	0,01	100	0,064	74,86
12	45	0,01	150	0,057	66,64
13	45	0,02	150	0,060	69,33
14	45	0,03	150	0,065	76,04
15	45	0,03	100	0,070	81,43
16	45	0,03	50	0,069	79,88
17	45	0,02	50	0,060	69,96
18	45	0,02	100	0,065	75,46
19	45	0,02	100	0,066	76,65
20	45	0,02	100	0,065	75,31
21	20	0,01	50	0,062	72,42
22	20	0,01	100	0,059	68,90
23	20	0,01	150	0,049	57,02
24	20	0,02	150	0,063	73,35
25	20	0,03	150	0,064	74,25
26	20	0,03	100	0,074	86,50
27	20	0,03	50	0,062	72,12
28	20	0,02	50	0,062	72,27
29	20	0,02	100	0,063	72,92

–As amostras 18, 19 e 20 representam as triplicatas do ponto central do planejamento

Para avaliar esses resultados, os valores obtidos foram submetidos a um teste estatístico. A significância da influência de cada variável está apresentada em um Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis estudadas e suas interações, na figura 16.

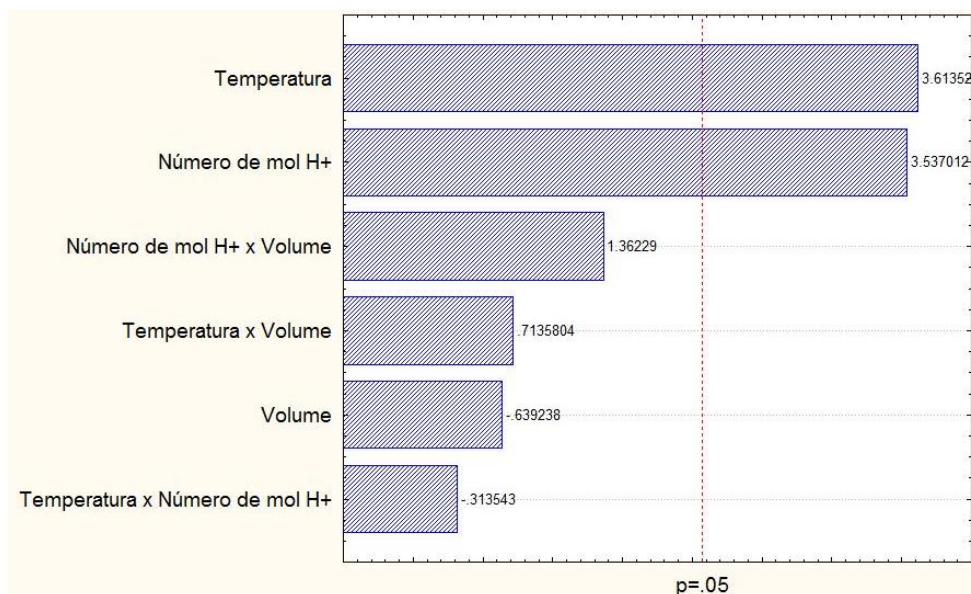


Figura 16: Diagrama de Pareto das variáveis estudadas e suas interações.

\*Os dados foram analisados sob grau de confiança  $p=0,05$

A análise do planejamento fatorial  $3^3$  permitiu obter um modelo estatístico para a eficiência de extração de P a partir de cinza de palma, expresso na equação 3:

$$\text{Eficiência (\%)} = 73,91916 + 0,203575T - 9,160853725 + 803,7167M - 16,07433 \quad (3)$$

Onde:  $T$  = Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )

$M$  = Mols de  $\text{H}^+$ /g de cinza

Analisando Temperatura, Número de mols de  $\text{H}^+$ /g de cinza e Volume de ácido como variáveis para a extração de fósforo (FIGURA 16), notou-se que a temperatura foi a variável que apresentou a maior influência na dissolução do fósforo, seguida pelo número de mols. Os efeitos significativos positivos das variáveis Temperatura e Número de mols  $\text{H}^+$  para a extração de fósforo a partir das cinzas de biomassa de palma refletem uma melhoria na eficiência de extração do fósforo (expresso na forma de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) à medida que os valores adotados para cada variável aumentavam, embora a melhor extração tenha ocorrido a 0,02 mol de  $\text{H}^+$ /g de cinza. É fato que pH mais baixos promovem uma maior dissolução de P (BISWAS et al., 2009; COHEN, 2009; OTTOSEN; KIRKELUND; JENSEN, 2013; TAN; LAGERKVIST, 2011; XU et al., 2012), que é diretamente dependente do número de mols de  $\text{H}^+$ /g de cinza. Por outro lado, a interação entre Temperatura e Número de mols  $\text{H}^+$ /g de cinza foi a menos

significativa. A variável Volume mostrou ter uma baixa influência negativa, ou seja, quanto maior volume, menor a dissolução de fósforo.

Mudando os valores das variáveis independentes na faixa escolhida, a dissolução do fósforo variou em 40%, sendo a maior 97,52%. Dissolução comparável, próxima a 100%, foi reportada com uso de  $H_2SO_4$  por OTTOSEN et al., (2013). Markou et al., (2015) também obteve dissoluções de P superiores a 90% utilizando  $H_2SO_4$  com 0,02 mol de  $H^+$ /g de cinza de excretas de frango.

O aumento da temperatura de 20°C para 45°C promoveu um acréscimo médio de apenas 2%, o que pode não justificar o dispêndio de energia de um processo onde temperaturas médias margeiam os 20°C. Já de 20°C para 70°C, gerou um aumento médio de 10% na eficiência da dissolução do fósforo (FIGURA 17).

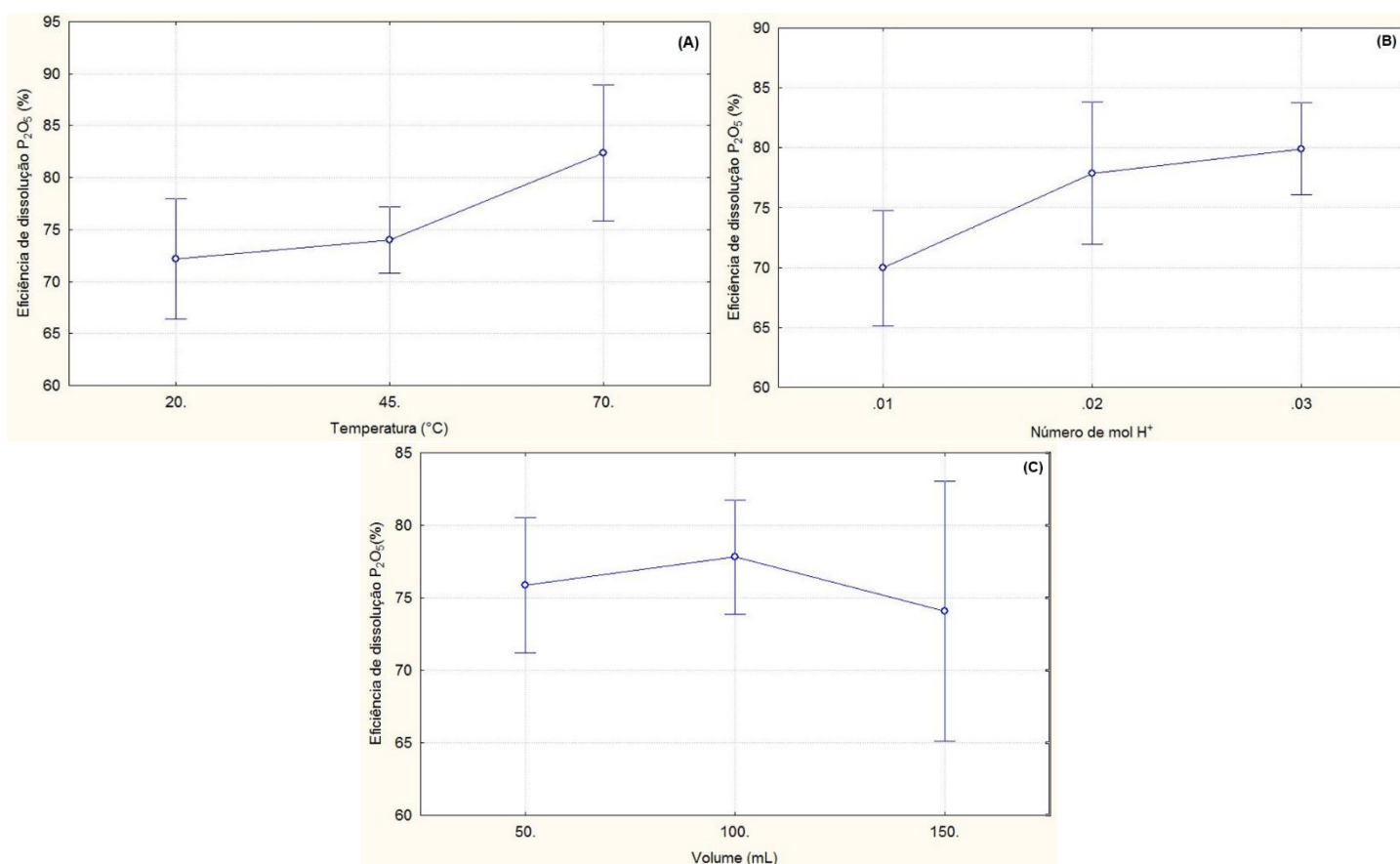


Figura 17: Médias das variáveis em função da dissolução do P expresso na forma de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. (a) Médias da temperatura; (b) Médias do número de mols H<sup>+</sup>; (c) Médias do volume de ácido. A faixa de variação *não indica* uma triplicata, e sim variação por conta dos outros fatores.

O aumento na temperatura fornece condições necessárias para a solubilização de elementos como o fósforo em cinza de lodo de esgoto (BISWAS et al., 2009). É possível assumir que com cinzas de biomassa o mesmo efeito possa ocorrer. TAN e LAGERKVIST, (2011) argumentam que a dissolução do fósforo aumenta com o aumento da temperatura e da concentração de ácido.

Já a variável Volume mostrou não ter influência significativa na dissolução do P e apresentou uma variação negativa das médias de 1,8% de 50 para 150 mL/g. Apesar da extração de melhor eficiência ter sido realizada com 150 mL/g, é possível que o valor de 97% tenha sido devido a temperatura, já que este fator mostrou ser bem influente quando realizado a 70°C.

Extrações com volume máximo (150 mL) apresentaram uma variação grande, sendo as 3 extrações com menores porcentagens de dissolução de fósforo realizadas com este volume. O alto volume com o menor número de mol de H<sup>+</sup>/g de cinza levou a baixas concentrações nas soluções, e as menores concentrações de ácido (0,01 mol de H<sup>+</sup>/g de cinza em 150 mL) foram as dissoluções menos eficientes.

No presente estudo a concentração não foi avaliada como uma variável, e sim o número de mols de H<sup>+</sup>/g de cinza, isto posto, as concentrações variaram de 0,067 a 0,6 mol/L. Nessa configuração, foi possível avaliar simultaneamente o volume (ou a proporção volume/massa) sem que haja conflito entre as variáveis. Os valores de mols de H<sup>+</sup> escolhidos para o planejamento foram também de acordo com a formulação dos meios de cultivo para as microalgas e cianobactéria. Número de mols absolutos de 0,01 a 0,03 foram considerados ideias para se chegar a relações N/P próximas a Relação de Redfield, pois analisando concentração como variável (mol/L), o número de mols absoluto variaria para cada volume, gerando cargas de nitrogênio diferentes das pretendidas para o cultivo de microalgas e cianobactéria.

A figura 16 mostrou um ganho de 8% de eficiência na dissolução entre 0,01 e 0,02 mol H<sup>+</sup>/g de cinza, porém um acréscimo pequeno de 2% de 0,02 para 0,03 mol de H<sup>+</sup>/g de cinza. Com as proporções estudadas (50/1, 100/1 e 150/1), 0,02 e 0,03 mol de H<sup>+</sup> apresentaram melhores resultados. Convertendo as variáveis em concentrações, as maiores concentrações de ácido não obtiveram as melhores eficiências de dissolução devido a influência que a temperatura apresentou, menores temperaturas levaram a menores extrações independente da concentração.

OTTOSEN et al., (2013) não obtiveram extração de P superior a 40% com até 0,6 mol/L de  $\text{HNO}_3$  em cinza de lodo de esgoto, no entanto, os autores utilizaram proporções massa/volume (m/v) de 5, 10 a 30 vezes menores do que as empregadas no presente estudo. BISWAS et al., (2009) constatou que em cinza de lodo de esgoto, 0,0075 mol de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em 150 mL/g, e 0,015 mol de HCl em 150 mL/g obtiveram resultados satisfatórios próximos a 100% de dissolução do fosfato. Este resultado foi obtido no presente estudo apenas a 70°C com 0,02 mol  $\text{H}^+$ /g de cinza. Esta diferença pode ter sido devido à ausência de agitação constante, o que aglomerou a cinza no fundo do recipiente diminuindo a superfície de contato com o líquido. É possível que a extração varie de cinza para cinza, cinzas com diferentes composições podem apresentar dissolução do P diferente em certas concentrações (XU et al., 2012). A origem da cinza pode ter gerado uma diferença na extração já que esta foi adquirida de biomassa, juntamente com o tipo do ácido.

A análise da recuperação dos principais cátions está resumida na tabela 14.

Tabela 14: Resultado da recuperação de cátions no planejamento fatorial  $3^3$ .

Amostra	Condições do Experimento			Recuperação dos cations (%)		
	Temperatura (°C)	Mols de $\text{H}^+$ /g de cinza	Volume da solução (mL/g de cinza)	$\text{K}_2\text{O}$	MgO	CaO
1	70	0,01	50	57,34	89,36	76,42
2	70	0,01	100	66,14	97,55	83,27
3	70	0,01	150	58,26	93,52	75,87
4	70	0,02	150	59,08	97,55	81,36
5	70	0,03	150	56,69	91,87	69,22
6	70	0,03	100	56,66	90,36	65,09
7	70	0,03	50	58,29	86,00	67,11
8	70	0,02	50	57,58	89,27	70,59
9	70	0,02	100	61,86	98,04	79,63
10	45	0,01	50	52,66	83,95	64,27
11	45	0,01	100	60,05	96,91	71,76
12	45	0,01	150	52,99	87,76	67,61
13	45	0,02	150	53,40	92,82	67,25
14	45	0,03	150	56,99	87,58	64,01
15	45	0,03	100	62,44	89,17	76,25
16	45	0,03	50	49,17	76,42	61,67
17	45	0,02	50	52,11	82,52	65,79
18	45	0,02	100	58,55	96,85	74,40
19	45	0,02	100	53,83	92,00	65,12
20	45	0,02	100	56,04	87,24	69,80

21	20	0,01	50	47,30	79,06	63,70
22	20	0,01	100	55,54	94,98	69,86
23	20	0,01	150	52,93	74,03	89,64
24	20	0,02	150	50,16	83,34	71,59
25	20	0,03	150	50,58	79,79	62,52
26	20	0,03	100	52,14	85,59	63,29
27	20	0,03	50	48,38	81,63	61,85
28	20	0,02	50	50,95	84,57	69,10
29	20	0,02	100	54,77	96,02	71,34

O gráfico radar (FIGURA 18) demonstra que o Magnésio (Mg) foi o cátion que apresentou maior dissolução dentre as condições de extração, seguido de Cálcio (Ca) e Potássio (K). As maiores extrações foram de 98,0%, 89,6% e 66,1% para Mg, Ca e K respectivamente.

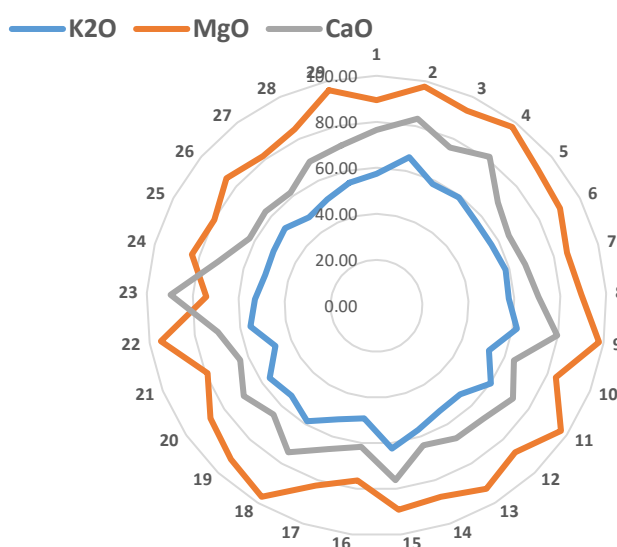


Figura 18: Panorama da extração de cátions no Planejamento 3<sup>3</sup>.

#### 4.2.2. Cinética da dissolução do fósforo

Os tempos de reações escolhidos foram mais explorados no início do processo, visto que a extração do fósforo a partir de outros resíduos ocorre rapidamente nas 2 primeiras horas (WZOREK et al., 2006; XU et al., 2015). Dessa forma, incluiu-se tempos de reações maiores, onde a eficiência do método foi plotada com um tempo de contato de até 30 horas, para garantir uma extração eficiente do elemento visado. As condições escolhidas foram as mesmas da extração que apresentou menor eficiência na dissolução do fósforo no Planejamento 3<sup>3</sup> (20°C; 0,01 mol de H<sup>+</sup>/g de cinza; 150 mL/g de

cinza). A temperatura de 20°C a qual foi realizado o experimento, possibilitou conhecer os resultados de uma cinética a temperatura ambiente, visto que já era de se esperar que altas temperaturas fornecem melhores extrações, porém, possivelmente geram custos mais altos ao procedimento.

A dissolução do fósforo é altamente dependente do tempo de contato (BISWAS et al., 2009; COHEN, 2009), e isto foi rapidamente mostrado na cinética de extração, com o elemento expresso na forma de  $P_2O_5$  para melhor comparação com a composição inicial das cinzas (FIGURA 19).

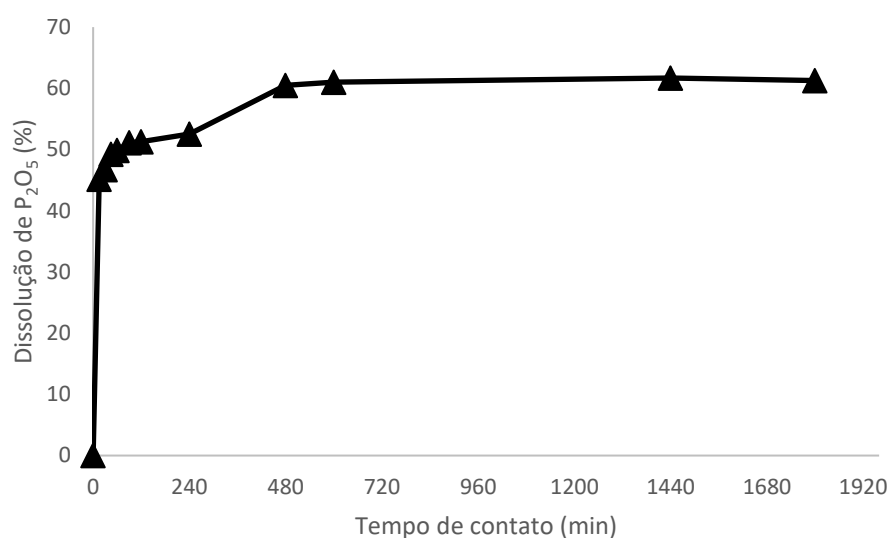


Figura 19: Cinética de dissolução do fósforo (expresso como  $P_2O_5$ ) em condições proporcionais a 20°C, 0,01 mol de  $H^+$ /g de cinza e 150 mL/g de cinza.

O tempo de 15 minutos, foi suficiente para promover 45% de dissolução do  $P_2O_5$ . Em 60 minutos este valor atinge 50%, e em cerca de 8 horas a eficiência de dissolução foi de 60%, valor de próximo ao observado (57%) com as mesmas condições no planejamento fatorial  $3^3$ . Depois disso, a variação da eficácia de dissolução foi mínima, mostrando que não é necessário que a extração se estenda por mais de 8 horas para cinza de biomassa de palma. A razão para a rápida extração de fósforo no início pode ser devida à sua presença na forma de sais solúveis nas cinzas (HONG et al., 2005) e o pequeno tamanho das partículas da cinza (XU et al., 2012).

#### 4.3. CULTIVO DE CIANOBACTÉRIA E MICROALGA EM EXTRATO DE CINZA DE PALMA

A cianobactéria *Spirulina platensis* e as microalgas *Neochloris oleoabundans* e *Dunaliella salina* são microrganismos que necessitam de nutrientes dissolvidos em meio aquoso. Dentre esses nutrientes, Carbono, Nitrogênio e Fósforo são os principais elementos que constituem o fitoplâncton (comunidade que engloba os organismos do presente estudo). No experimento, o carbono é incorporado do ambiente por difusão pela captação do ar atmosférico, enquanto o fósforo foi adquirido a partir da extração ácida da cinza de palma. Tipicamente ácidos fortes como  $H_2SO_4$  e  $HCl$  são usados para a dissolução de fósforo devido ao seus baixos custos (BISWAS et al., 2009; COHEN, 2009; EGLE; RECHBERGER; ZEISSNER, 2015; OTTOSEN; KIRKELUND; JENSEN, 2013; XU et al., 2012). No presente estudo,  $HNO_3$  foi utilizado para realizar a dissolução do fósforo, e por sua vez foi tratado como a fonte de nitrogênio do meio.

##### 4.3.1. Formulação do meio de cultivo BAX

Para se definir uma das 27 condições de extração como sendo a ideal para o cultivo de microalgas e cianobactéria, alguns critérios foram utilizados. As condições para a variável Número de Mols de  $H^+$  foram previamente escolhidas baseadas nas condições de extração expostas na literatura, e, principalmente, levando em consideração a Relação de Redfield ou seja, de modo que a razão de N/P após a extração fosse próxima a 16/1.

A máxima dissolução (ou recuperação) de fósforo foi observado na condição 4 (70°C; 0,02 mol de  $H^+$ /g de cinza e 150 mL/g de cinza) com 97,52% de eficiência na extração. O objetivo do presente trabalho não foi somente extrair o fósforo, e sim também utilizar as cinzas como fonte de P no cultivo microalgal. Para isso, optou-se por seguir a Relação de Redfield onde a concentração final N/P fosse próxima a 16/1. Desta forma, as relações N/P variaram desde valores menores que 16, até valores duas vezes maiores do que 16 (FIGURA 20).

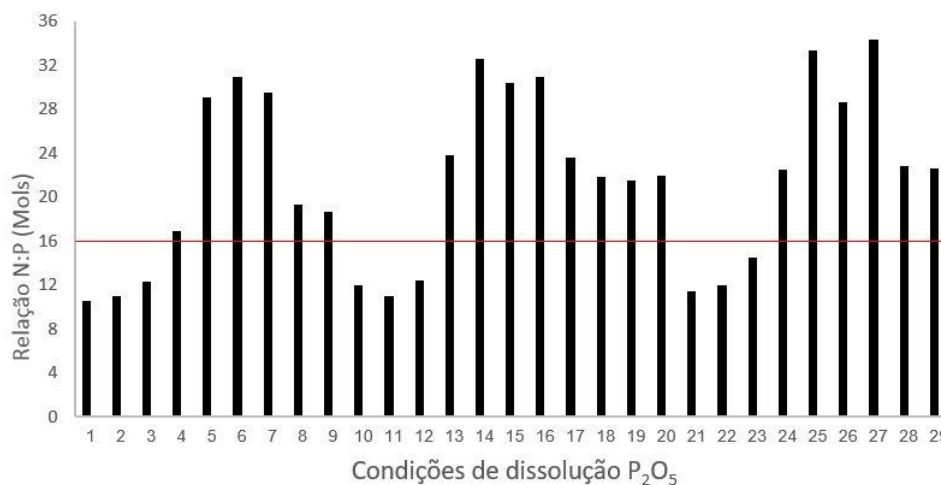


Figura 20: Relação N/P final das condições de dissolução de  $P_2O_5$ .

Com os resultados apresentados, foi possível notar que as extrações que foram submetidas a 0,01 mol de  $H^+$ /g de cinza, não ultrapassaram o valor de 15 na relação N/P devido à menor concentração de nitrogênio no extrato. Por terem uma relação inferior a 16, em um cultivo teórico de microalgas, esses extratos apresentariam um pequeno excesso de fósforo, já que o fator limitante seria o nitrogênio. Como o objetivo do trabalho foi recuperar e reutilizar o fósforo proveniente das cinzas, desperdiçar este nutriente não é justificável, logo as condições de extração com 0,01 mol de  $H^+$ /g de cinza não seriam ideais.

Para as extrações com 0,03 mol de  $H^+$ /g de cinza, todos os resultados apresentaram uma relação N/P acima de 28, mostrando a alta concentração de nitrogênio. Se o crescimento microalgal respeitar a Relação de Redfield, esses valores indicam um grande excesso de nitrogênio no cultivo. Já as extrações que foram submetidas a 0,02 mol de  $H^+$ /g de cinza, apresentaram relações entre 16,9 e 23,8 o que indica um excesso de nitrogênio, porém menor que os observados nas extrações com 0,03 mol de  $H^+$ /g de cinza.

Com base nos resultados, foi possível observar que as extrações com 0,01 e 0,02 mol de nitrogênio derivaram em extratos com relação N/P mais próximas de 16, sendo a primeira com excesso de fósforo e a segunda com excesso de nitrogênio (Figura 21).

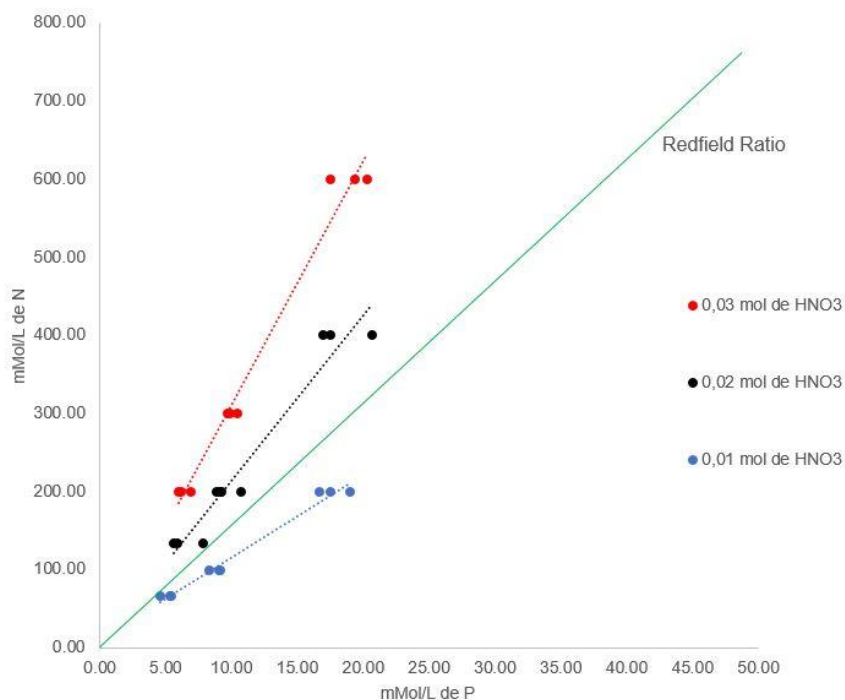


Figura 21: Gráfico da relação N/P de cada amostra e seus respectivos mols de  $\text{HNO}_3$ .

Diante dos resultados, a condição de dissolução com 0,02 mol de  $\text{H}^+$ /g de cinza seria a ideal pois, em tese, utiliza menos N na dissolução do P, e não gera excesso de P. A quantidade absoluta de mols de fósforo viabilizada na dissolução é importante, e, dentre as condições com 0,02 mol de  $\text{H}^+$ /g de cinza, a condição 4 apresentou 1,18 mmol de P extraído enquanto outras como 8 e 9 apresentaram 1,03 e 1,07 respectivamente (TABELA 15).

Tabela 15: Relação N/P e mmol de P extraído na amostra das condições com 0,02 mol de  $\text{H}^+$ /g de cinza.

Condição	N/P	mmol de P extraído
<b>4</b>	16,9	1,18
<b>8</b>	19,4	1,03
<b>9</b>	18,6	1,07
<b>13</b>	23,8	0,84
<b>17</b>	23,6	0,85
<b>18</b>	21,9	0,91
<b>19</b>	21,5	0,93
<b>20</b>	21,9	0,91
<b>24</b>	22,5	0,89
<b>28</b>	22,8	0,88
<b>29</b>	22,6	0,88

Isto posto, a condição 4 (70°C; 0,02 mol de H<sup>+</sup>/g de cinza; 150 mL/g de cinza) foi a que apresentou o menor excesso de nitrogênio comparado a Relação de Redfield (N/P = 16,9/1), tendo maior potencial de produção de biomassa dentre as condições de extração com 0,02 mol de H<sup>+</sup>/g de cinza, e foi a condição com maior eficiência de extração de fosfato, 97,52%.

Diluições de 4,3, 34,3 e 30,6 vezes foram realizadas para equivaler a concentração de P teórico usado em cada meio controle (Zarrouk, BG 11, MJM, respectivamente). A tabela 16 mostra a concentração inicial de P e N nos meios controles e BAX.

Tabela 16: Concentrações iniciais de P e N nos meios padrões e nos meios BAX.

	Zarrouk	BG 11	MJM
Concentração de P (mmol/L)	2,87	0,23	0,26
Concentração de N (mmol/L)	29,41	17,63	9,89
	BAX <i>S. platensis</i>	BAX <i>N. oleoabundans</i>	BAX <i>D. salina</i>
Concentração de P (mmol/L)	1,83	0,23	0,26
Concentração de N (mmol/L)	31,11	3,89	4,35

#### 4.3.2. Crescimento de cianobactéria e microalga em extrato aquoso de cinza de palma

O estudo do processo biotecnológico para produção de biomassa de *Spirulina platensis*, *Neochloris oleoabundans* e *Dunaliella salina* e remoção de fósforo, na forma de fosfato, dos meios formulados a partir de cinza de palma durante os cultivos, foram realizados através das diferentes cinéticas de crescimento e análise de remoção de fosfato, que tem seus resultados expressos a seguir.

##### 4.3.2.1. Cinética de crescimento

**Cultivo de *S. platensis*:** A figura 22 mostra a produção de biomassa de *S. platensis* no meio BAX. No início do cultivo, *S. platensis* apresentou crescimento semelhante ao controle. As cianobactérias apresentaram uma velocidade inicial de crescimento baixa, possivelmente devido à concentração inicial relativamente baixa de 0,09 g /L. Após 18 dias, o crescimento da cultura em BAX apresentou uma diminuição, a diferença entre o controle e BAX neste ponto é notável na curva de

absorbância. Após 31 dias a cultura em meio BAX apresentou um valor final de 82% da concentração de biomassa encontrada no controle.

Crescimento de *Spirulina* em efluente de palma foi observado sob relação N/P de 2,7/1 e 2,6/ 1 (AZIMATUN NUR, 2014), enquanto Zarrouk (meio utilizado como controle) apresenta uma razão N:P de 10/1. É possível que *S. platensis* não necessite de uma razão N/P de 16/1 e o excesso de 0,9 mol/L de nitrato em meio BAX podem ter influenciado o crescimento a partir do dia 18, promovendo uma pequena redução no crescimento (JEANFILS; CANISIUS; BURLION, 1993).

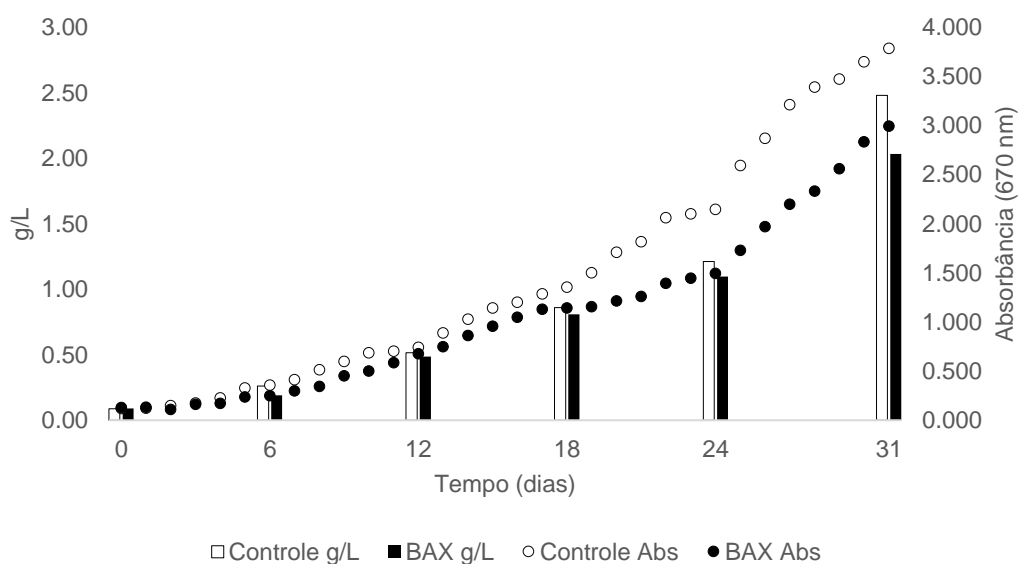


Figura 22: Cinética de crescimento de *S. Platensis* em meio controle (Zarrouk) e BAX (extrato aquoso de cinza de palma) avaliado por densidade óptica e massa seca.

Em estudo realizado por MARKOU et al., (2015), concentrações de *S. platensis* entre 2, e 3,0 g/L foram obtidas em apenas 9 dias a partir de meio formulado de extração ácida de cinza de excretas, de alimentos derramados e penas de frango provenientes de granja. Por outro lado, algumas diferenças na execução podem ter levado a resultados melhores, na extração foi empregado  $H_2SO_4$  e posteriormente adicionou-se 2,5 g/L de  $NaNO_3$  para ser a fonte de nitrogênio. Adicionalmente, foram adicionados 10 g/L  $NaHCO_3$  e 100 mg/L  $Na_2-EDTA$  como agente quelante. As culturas foram realizadas sob aeração constante de 2L de ar/min e intensidade luminosa de 9 klux, quase 5 vezes mais do que o empregado para *S.platensis* no presente trabalho.

A produtividade obtida no cultivo de *S. platensis* em BAX 0,063 g/L.dia, são maiores que o encontrado por WALTER (2011) que obteve 0,0123 e 0,0174 g/L.dia com duas cepas de *S. platensis* cultivadas em meio Zarrouk 20% (v/v). A produtividade obtida, tanto para o controle (0,077 g/L.dia) quanto para as cianobactérias em meio BAX foram inferiores às grandes produtividades compiladas e reportadas por LEE (2001) que variaram de 0,3 a 4,3 g/L.dia. Entretanto, os cultivos do presente trabalho não foram realizados sob aeração forçada como nos relatados anteriormente, e a agitação foi feita manualmente. Já para os valores reportados por LEE (2001), não foram informados as concentrações iniciais dos cultivos, que podem ter sido maiores que a usada no presente estudo, e ter levado a altas concentrações.

**Cultivo de *N. oleoabundans*:** Do dia 4 ao dia 8, *N. oleoabundans* em meio BAX exibiu um crescimento reduzido comparado ao controle (BG 11), provavelmente devido ao processo de adaptação das células para o novo meio. Do dia 12 em diante, *N. oleoabundans* elevou a taxa de crescimento, e após 31 dias obteve concentração final de biomassa de 90% do controle, com concentração de 0,9 g/L, enquanto o controle apresentou 1 g/L (FIGURA 23). A produtividade de *N. Oleoabundans* em meio BAX foi de 0,026 g/L.dia, valor próximo ao observado no controle de 0,031 g/L.dia.

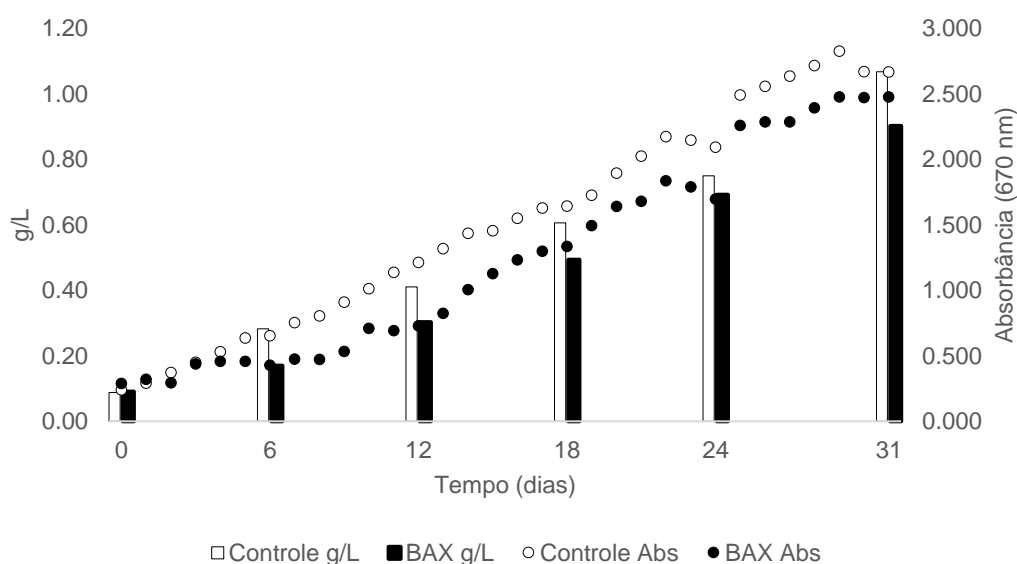


Figura 23: Cinética de crescimento de *N. oleoabundans* em meio controle (BG 11) e BAX (extrato aquoso de cinza de palma) avaliado por densidade óptica e massa seca.

**Cultivo de *D. salina*:** A figura 24 mostra o melhor crescimento obtido em meio BAX em relação ao controle. *Dunaliella salina* apresentou crescimento semelhante ao controle desde o dia 0 e obteve maior biomassa em grande parte do cultivo. Nos últimos 3 dias estes valores foram mais evidentes na curva de absorbância. As concentrações finais de *D. Salina* no meio controle (MJM) e em meio BAX foram de 0,69 g/L e 0,70 g/L, respectivamente, mostrando concentração final ligeiramente superior das microalgas cultivadas em meio BAX. O cultivo de *D. salina* em meio BAX apresentou produtividade também superior ao meio controle, com valores de 0,021 g/L.dia e 0,020 g/L.dia respectivamente.

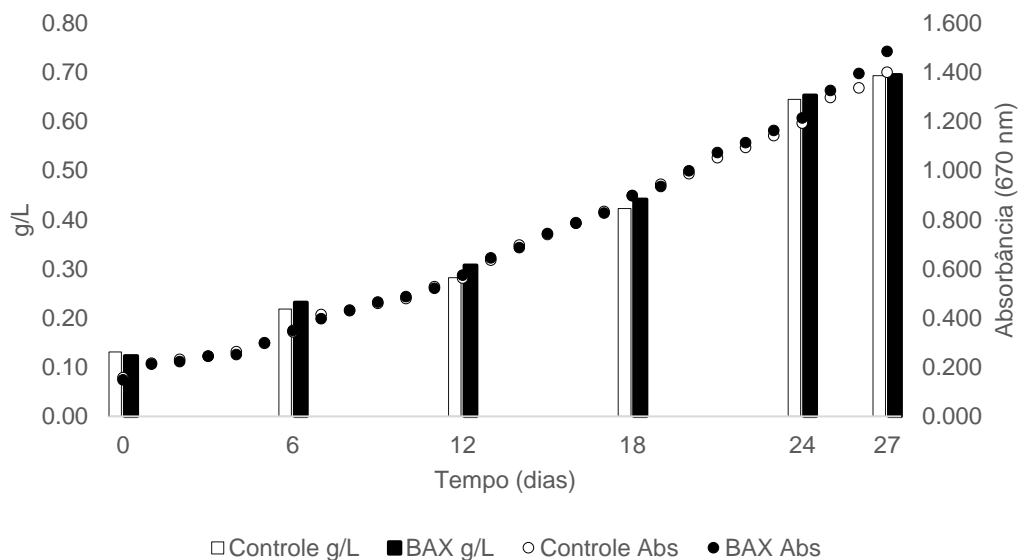


Figura 24: Cinética de crescimento de *D. salina* em meio controle (MJM) e BAX (extrato de cinza de palma) avaliado por densidade óptica e massa seca.

Em produção de biomassa de *S. platensis*, MADKOUR; KAMIL; NASR, (2012) em meios de custo reduzido utilizando nitrato de amônio e uréia como fonte de N, foi observado que a máxima concentração (0,8 g/L) ocorreu entre 27 e 33 dias de experimento, semelhante ao ocorrido no presente trabalho para *D. salina*.

#### 4.3.2.2. Remoção do fósforo solúvel

A figura 25 apresenta a remoção de fósforo, na forma de fosfato nos meios BAX e controle realizado pelas microalgas e cianobactéria. A diferença da concentração inicial de fosfato para o meio

controle (Zarrouk) de *S. platensis* é devido ao fato de que a elaboração do meio BAX para a cianobactéria foi levado em consideração o valor teórico de P usável, já que o meio Zarrouk possui um grande excesso deste nutriente em sua composição. De fato, após 31 dias, o cultivo em meio Zarrouk apresentou uma concentração remanescente de 126 mg/L. A quantidade de fosfato removida do meio foi semelhante para os dois cultivos, 150 mg/L para BAX e 154 mg/L para o cultivo em Zarrouk.

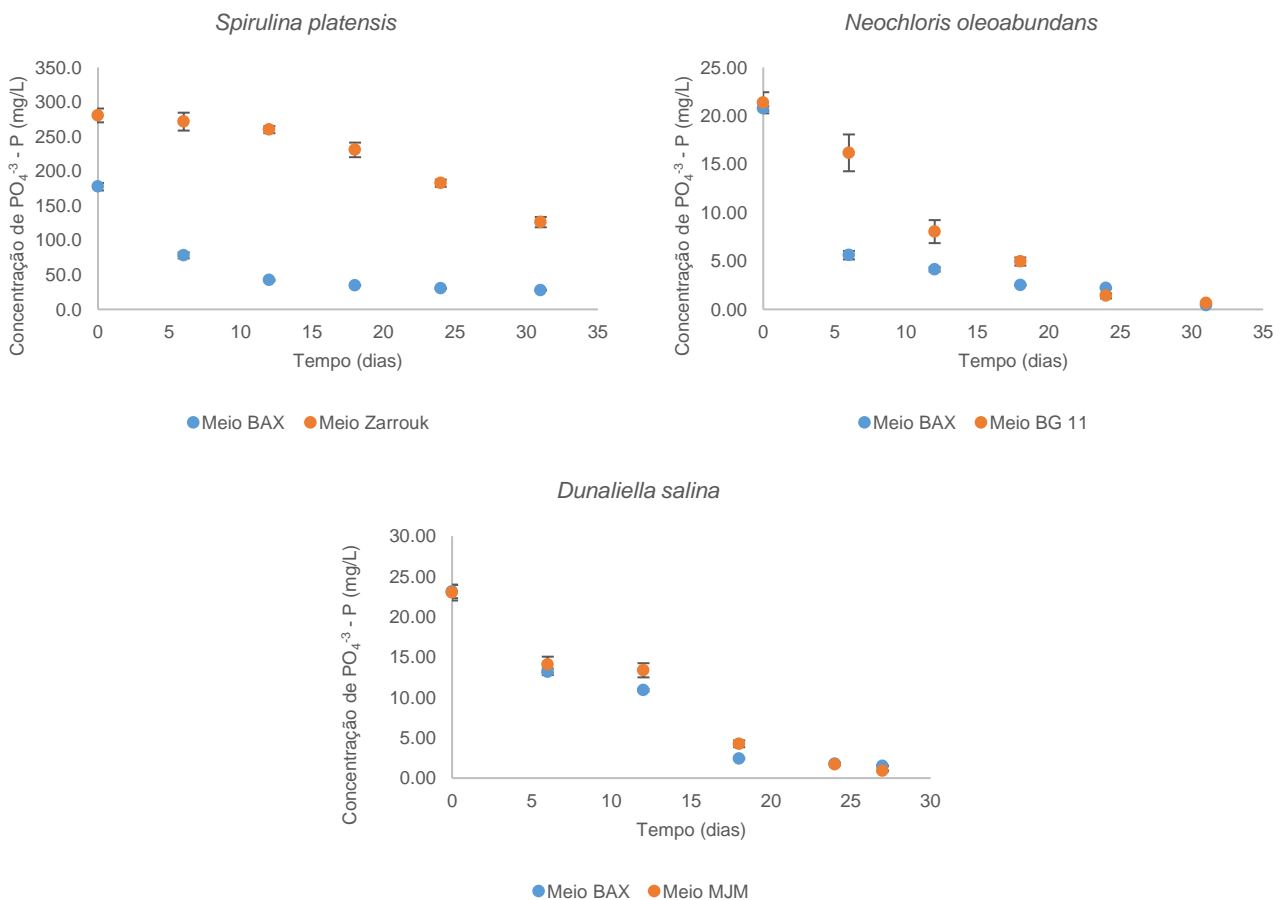


Figura 25: Remoção do fósforo solúvel do meio em função do tempo por *Spirulina platensis*, *Neochloris oleoabundans* e *Dunaliella salina*.

Para *Neochloris oleoabundans* e *Dunaliella salina*, os meios BAX foram elaborados para se ter uma concentração inicial de fosfato semelhante aos respectivos meios controles, já que em ambos os meios o fator limitante é o P. *N. Oleoabundans* apresentou uma remoção de 0,66 mg/L.dia, muito próxima ao encontrado no meio controle (0,67 mg/L.dia), embora nos primeiros dias esta remoção tenha sido maior.

O padrão de remoção de fosfato obtida por *D. salina* em BAX foi muito próxima ao observado em meio controle, o que fornece suporte aos resultados obtidos por esta microalga na cinética. A remoção de fosfato do cultivo em meio BAX foi de 0,80 mg/L.dia enquanto que no meio controle foi de 0,82 mg/L.dia. *N. oleoabundans* e *D. salina* apresentaram uma remoção quase que completa do fosfato ao longo de 31 dias e 27 dias, respectivamente.

Comparando as três espécies, a remoção de fosfato foi muito maior em *S. platensis* comparado as outras microalgas, provavelmente devido a maior biomassa formada pela cianobactéria. MARKOU et al., (2015) também observou uma maior produção de biomassa de *S. platensis* quando comparada a *Chlorella vulgaris* em cultivo sob meio formulado a partir de cinza de resíduos de granja de frango. A remoção de fósforo reportada pelos autores foi semelhante nas duas espécies, porém analisou-se a curva de remoção de fosfato de *C. Vulgaris* em um período mais longo comparado a *S. platensis*.

LODI et al., (2003) argumentam que cultivos fotoautotróficos podem gerar um aumento de pH devido a liberação de OH<sup>-</sup> e consumo de CO<sub>2</sub>, levando a formas de fosfatos insolúveis a precipitar, o que pode elevar a fração de fosfato removido (LODI et al., 2003). É possível que uma alcalinização tenha ocorrido no meio BAX para *S. platensis*, aliado ao alto pH inicial (9,5), e assim contribuido para uma grande remoção de fosfato nos primeiros dias. Por outro lado, segundo o mesmo autor, maiores remoções de fósforo são esperadas em maiores concentrações, fato observado no presente estudo onde cultivos de *S. platensis* foram 8 vezes mais concentrados em P do que os outros dois cultivos.

Os resultados do consumo de fosfato obtidos após o término do cultivo mostram que o P presente na cinza de biomassa de palma pode ser aproveitado no cultivo de microalgas, como uma fonte alternativa de P, reduzindo custos na produção destes microrganismos e viabilizando um destino sustentável para este resíduo.

#### 4.3.2.3. Escalonamento

A figura 26 mostra a produção de biomassa de *S. platensis* no meio BAX em escala ampliada em estufa. O padrão de crescimento foi semelhante ao cultivo laboratorial, mesmo tendo iniciado com uma concentração maior (0,22 g/L). Após 25 dias de cultivo, a concentração obtida foi de 1,40 g/L, maior

do que a encontrada no cultivo em pequena escala. Por outro lado, após este período, o cultivo demonstrou uma redução no aumento da densidade óptica e da concentração.

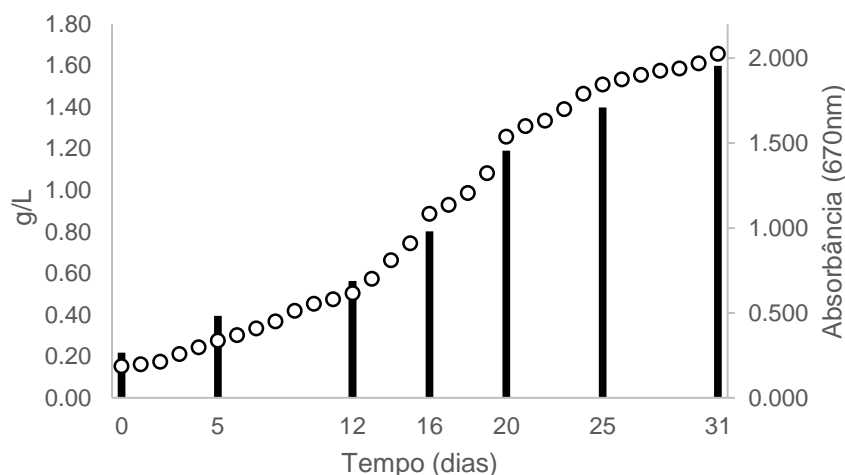


Figura 26: Cultivo de *Spirulina platensis* em escala ampliada em estufa.

A produtividade de *S. platensis* em escala ampliada no cultivo externo foi de 0,0472 g/L.dia após 25 dias de experimento, próximo ao valor de 0,0435 g/L.dia encontrado no cultivo laboratorial sob condições controladas. Após 31 dias a concentração final encontrada foi de 1,60 g/L, com produtividade de 0,0446 g/L.dia.

O cultivo externo esteve sujeito a variação de temperatura influenciada pelo clima, ao contrário do cultivo laboratorial. Ao longo do cultivo, a temperatura máxima diária foi caindo, e nos últimos dias, isto ficou evidente também na temperatura mínima diária (FIGURA 27). Esta grande variação de temperatura junto ao esfriamento do ambiente, pode ter contribuído na diferença da concentração final observada entre os cultivos laboratoriais e o em escala ampliada realizado em estufa, já que esta espécie possui crescimento favorável em temperaturas acima de 30°C. Vale ressaltar que o cultivo em escala ampliada esteve também sujeito a fotoperíodo dia/noite, ao contrário dos cultivos laboratoriais onde a irradiação foi constante durante os 31 dias.

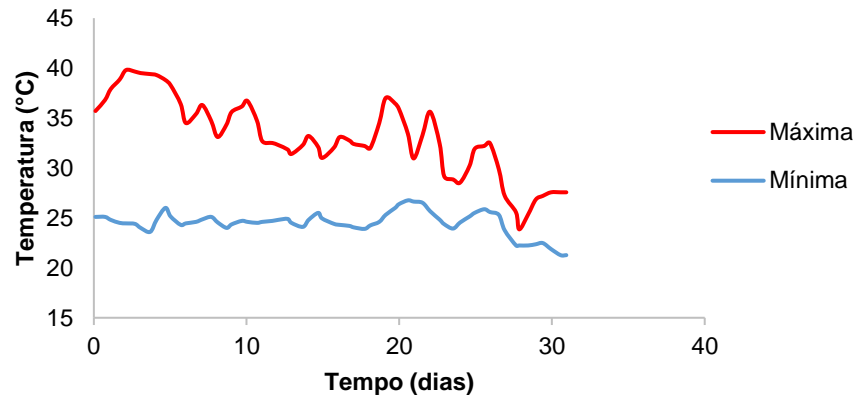


Figura 27: Variação de temperatura máxima e mínima diária da estufa externa onde realizou-se o escalonamento com *S. platensis* em meio BAX.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo do processo biotecnológico para produção de biomassa microalgal e de cianobactéria a partir de extração ácida de P da cinza de biomassa de palma foi realizado e possibilitaram as seguintes conclusões:

– A composição da cinza de biomassa de palma apresentou uma grande quantidade de fósforo, na forma de  $P_2O_5$ , com teor de 8,6%, valor este superior aos encontrados na literatura para cinzas de diferentes partes da palma. Cátions importantes como  $K^+$  e  $Mg^{2+}$  também foram observados em porcentagens razoáveis e estão de acordo com os reportados na literatura.

– A dissolução ácida de cinza de biomassa de palma realizada por  $HNO_3$  apresentou resultados satisfatórios de 97,52% de dissolução do fósforo. Para se chegar a este valor, utilizou-se a condição: 70°C; 0,02 mol  $H^+$ /g de cinza; 150 mL/g de cinza. O valor de 97,52% pode, em tese, ser ultrapassado ao se levar em consideração uma dissolução sob temperaturas maiores, visto que o acréscimo da temperatura influencia diretamente na dissolução do P. Apesar de um ponto ótimo de dissolução não ter sido obtido, é questionável se temperaturas acima de 70°C são justificáveis para se extrair um máximo (teórico) de 2,5% de P. Assim como a temperatura, o número de mols de  $H^+$ /g de cinza foi significativo para a extração do P, com grau de confiança de 0.05.

– A cinética de dissolução do P expresso na forma de  $P_2O_5$  forneceu informação indispensável acerca do tempo de contato mínimo entre as cinzas e a solução de  $HNO_3$ . Os resultados permitiram concluir que entre 8 e 10h de contato foi suficiente para fazer a dissolução do P esperada sob condição de temperatura a 20°C, 0,01 mol de  $H^+$ /g de cinza e 150 mL/g de cinza, visto que grande parte do P extraído ocorreu na primeira hora.

– O cultivo de microalgas e cianobactéria utilizando o extrato aquoso de cinza de biomassa de palma como fonte de nutrientes, e principalmente fósforo, mostrou ser possível o crescimento de biomassa microalgal. O  $HNO_3$  serviu como solvente responsável pela dissolução do P utilizado pelos microrganismos, e também como fonte de nitrogênio, essencial para o cultivo microalgal e de cianobactérias. Os cultivos foram realizados e apresentaram sucesso sob relação N/P de 16,9.

– Concluiu-se que a partir de 4g de cinza de biomassa de palma, na presença de 0,08 mol de  $\text{HNO}_3$ , foram suficientes para suplementar a quantidade de fósforo utilizável referentes a 1,5 litros de Zarrouk, 1,5 litros de BG 11 e 1,5 litros de MJM. Ao final de 31 dias, *Spirulina platensis* e *Neochloris oleoabundans*, e ao final de 27 dias *Dunaliella salina*, cultivadas em meio proveniente de extrato de cinza de palma, apresentaram 82, 90 e 100% respectivamente, da concentração observada nos meios controles. As produtividades de 0,063, 0,026 e 0,021 g/L.dia foram obtidas em meio de extrato de cinza de palma, apenas com correção de pH e suplementação de NaCl para *Dunaliella salina*.

– A quantidade de fosfato removido dos cultivos de extrato de cinza de palma foram semelhantes aos encontrados nos meios controles. *Neochloris oleoabundans* e *Dunaliella salina* apresentaram uma remoção quase que completa de fosfato dos meios, enquanto *S. platensis* demonstrou uma grande remoção de fosfato nos primeiros dias e pequena a partir de 12 dias.

– O escalonamento com *S. platensis* realizado em estufa, com objetivo de simular grandes cultivos apresentou uma concentração final de 1,6 g/L ao longo de 31 dias. A produtividade final foi de 0,0446 g/L.dia, menor que a encontrada em cultivo laboratorial sob condições controladas. A diferença de 0,4 g/L entre o cultivo laboratorial e o escalonado em estufa, pode ser devido a grandes variações de temperatura observadas no cultivo externo e a queda de temperatura nos últimos dias de cultivo, que podem ter desacelerado o crescimento da cianobactéria, e influenciado na diferença de 0,4 g/L entre os cultivos laboratoriais e externo em estufa.

– Dentre as conclusões do trabalho, foi possível elaborar e submeter uma patente com o título: “Processo de conversão de resíduos de queima de biomassa em solução nutritiva para cultivo de microalgas.” Cinzas de biomassa vegetais podem ser utilizadas em outros casos futuros, no entanto, é necessário ter conhecimento prévio de a sua composição química.

## 6. REFERÊNCIAS

- ACQUAH, C. et al. Synthesis and performance analysis of oil palm ash (OPA) based adsorbent as a palm oil bleaching material. *Journal of Cleaner Production*, v. 139, p. 1098–1104, 2016.
- AHLGREN, G. Growth of *oscillatoria agardhii* in chemostat culture 3. Simultaneous limitation of nitrogen and phosphorus. *Br. Phycol. J.*, v. 20, n. february, p. 249–261, 1985.
- AHMARUZZAMAN, M. A review on the utilization of fly ash. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 36, n. 3, p. 327–363, 2010.
- ALMEIDA, F. C. R. et al. Sugarcane bagasse ash sand (SBAS): Brazilian agroindustrial by-product for use in mortar. *Construction and Building Materials*, v. 82, p. 31–38, 2015.
- ANDERSEN, R. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. Phycological Society of America. 2005
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, v. 264, n. 1–4, p. 130–134, 2007.
- AZEEZ, J. O.; VAN AVERBEKE, W. Nitrogen mineralization potential of three animal manures applied on a sandy clay loam soil. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 14, p. 5645–5651, 2010.
- AZIMATUN NUR, M. M. Evaluation of carbon, nitrogen and phosphorus ratio of palm oil mill effluent digested (pomed) wastewater as replacement synthetic medium for *spirulina sp* growth. *American- Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, v. 14, n. 6, p. 536–540, 2014.
- AZIZ, M. et al. Advanced power generation using biomass wastes from palm oil mills. *Applied Thermal Engineering*, 2016.
- BALDISSEROTTO, C. et al. Salinity promotes growth of freshwater *neochloris oleoabundans* UTEX 1185 (*Sphaeropleales, Chlorophyta*): morphophysiological aspects. *Phycologia*, v. 51, n. 6, p. 700–710, 2012.
- BALDISSEROTTO, C. et al. Photosynthetic aspects and lipid profiles in the mixotrophic alga *Neochloris oleoabundans* as useful parameters for biodiesel production. *Algal Research*, v. 16, p. 255–265, 2016.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. Taylor & Francis, 2006.
- BASHAR, I. I. et al. Engineering properties and fracture behaviour of high volume palm oil fuel ash based fibre reinforced geopolymer concrete. *Construction and Building Materials*, v. 111, p. 280–297, 2016.

BELLINGER, E. G.; SIGEE, D. C. Freshwater algae. Identification and use as bioindicators. 1° ed. Wiley-Blackwell, 2010.

BENNETT, E. M.; CARPENTER, S. R.; CARACO, N. F. Human impact on erodable phosphorus and eutrophication: a global perspective. *Bioscience*, v. 51, n. 3, p. 227, 2001.

BERRA, M.; MANGIALARDI, T.; PAOLINI, A. E. Reuse of woody biomass fly ash in cement-based materials. *Construction and Building Materials*, v. 76, p. 286–296, 2015.

BEZERRA, R. P. et al. Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Bioenergetic aspects. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p. 309–317, 2012.

BISWAS, B. K. et al. Leaching of phosphorus from incinerated sewage sludge ash by means of acid extraction followed by adsorption on orange waste gel. *Journal of Environmental Sciences*, v. 21, n. 12, p. 1753–1760, 2009.

BOROWITZKA, L. J. 1981. The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. *Hydrobiologia* 8: 33–46.

BOROWITZKA, M. A. 1988. Algal growth media and sources of algal cultures. In: *Micro-Algal biotechnology* (Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. eds) pp.456-465. Cambridge University Press, New York.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

BUDHATHOKI, R.; VÄISÄNEN, A. Particle size based recovery of phosphorus from combined peat and wood fly ash for forest fertilization. *Fuel Processing Technology*, v. 146, p. 85–89, 2016.

CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 146, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 60–78, 2007.

CARVALHO, J. C. M. et al. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. *Journal of Phycology*, v. 40, n. 3, p. 589–597, 2004.

CHANTANACHAT, S. BOLD, H. C. Phycological studies. II. Some algae from arid soils. *University of Texas Publications* 6218: 1–74, 1962.

- CHIN, K. L. *et al.* Reducing ash related operation problems of fast growing timber species and oil palm biomass for combustion applications using leaching techniques. *Energy*, v. 90, p. 622–630, 2015.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2007.
- CHOPRA, D.; SIDDIQUE, R.; KUNAL. Strength, permeability and microstructure of self-compacting concrete containing rice husk ash. *Biosystems Engineering*, v. 130, p. 72–80, 2015.
- COHEN, Y. Phosphorus dissolution from ash of incinerated sewage sludge and animal carcasses using sulphuric acid. *Environmental Technology*, v. 30, n. 11, p. 1215–1226, 2009.
- CORDELL, D.; DRANGERT, J. O.; WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, v. 19, n. 2, p. 292–305, 2009.
- CORNEL, P.; SCHAUM, C. Phosphorus recovery from wastewater: Needs, technologies and costs. *Water Science and Technology*, v. 59, n. 6, p. 1069–1076, 2009.
- D'ANGELO, E.; CRUTCHFIELD, J.; VANDIVIERE, M. Rapid, sensitive, microscale determination of phosphate in water and soil. *Journal of environmental quality*, v. 30, n. 6, p. 2206–2209, 2001.
- DALLE ZOTTE, A. *et al.* Effect of dietary supplementation of *Spirulina (Arthrospira platensis)* and *Thyme (Thymus vulgaris)* on growth performance, apparent digestibility and health status of companion dwarf rabbits. *Livestock Science*, v. 152, n. 2–3, p. 182–191, 2013.
- DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
- DIAZ, R. J.; ROSENBERG, R. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 926–929, 2008.
- DOOLITTLE, P. Ascorbic acid method for phosphorus determination. Madison. Disponível em: <pssemrad@wisc.edu>.
- DUCE, R. A. *et al.* Impacts of atmospheric anthropogenic nitrogen on the open ocean. *Science (New York, N.Y.)*, v. 320, n. 5878, p. 893–7, 2008.
- EGLE, L.; RECHBERGER, H.; ZESSNER, M. Overview and description of technologies for recovering phosphorus from municipal wastewater. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 105, p. 325–346, 2015.

EL-KASSAS, H. Y.; HENEASH, A. M. M.; HUSSEIN, N. R. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using confectionary wastes for aquaculture feeding. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 13, n. 2, p. 145–155, 2015.

FONSECA, D. Fosfato. Departamento Nacional de Produção Mineral: Sumário Mineral. 2014.

FREITAS, B. C. B. Cultivo de microalgas utilizando pentoses como fonte de carbono. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2012.

GEIDER, R.; ROCHE, J. LA; GEIDER, R. J. European Journal of Phycology Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis Redfield revisited : variability of C : N : P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology Eur. J. Phycol. British Phycological Society*, v. 371, n. 37, p. 1–17, 2002.

GIOVANARDI, M. *et al.* Morphophysiological analyses of *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyta) grown mixotrophically in a carbon-rich waste product. *Protoplasma*, v. 250, n. 1, p. 161–174, 2013.

GROBBELAAR, J. Algal nutrition: mineral nutrition. Em RICHMOND, A. (ed.) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. London: Blackwell Science. 97 - 115, 2004.

HAMEED, B. H.; AHMAD, A. A.; AZIZ, N. Isotherms, kinetics and thermodynamics of acid dye adsorption on activated palm ash. *Chemical Engineering Journal*, v. 133, n. 1–3, p. 195–203, 2007.

HAVUKAINEN, J. *et al.* Potential of phosphorus recovery from sewage sludge and manure ash by thermochemical treatment. *Waste Management*, v. 49, p. 221–229, 2016.

HEDGES, J. I. *et al.* The biochemical and elemental compositions of marine plankton: A NMR perspective. *Marine Chemistry*, v. 78, n. 1, p. 47–63, 2002.

HONG, K.-J. *et al.* Study on the recovery of phosphorus from waste-activated sludge incinerator ash. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 40, n. 3, p. 617–631, 2005.

HOSSEINI TAFRESHI, A.; SHARIATI, M. Dunaliella biotechnology: Methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, n. 1, p. 14–35, 2009.

INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION (IFA). Global phosphate rock production trends from 1961 to 2010. October. 2011.

JAMES, D. E. *Culturing algae*. 2° ed. Carolina Biological Supply Company Printed p. 27, 2012.

JEANFILS, J.; CANISIUS, M. F.; BURLION, N. Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. *Journal of Applied Phycology*, v. 5, n. 3, p. 369–374, 1993.

KIM, S.-K. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Academic Press, 2015.

KOUHIA, M.; HOLMBERG, H.; AHTILA, P. Microalgae-utilizing biorefinery concept for pulp and paper industry: Converting secondary streams into value-added products. *Algal Research*, v. 10, p. 41–47, 2015.

KULAIF, Y. Relatório Técnico Perfil do Fosfato, 2009. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/documents/1138775/1256650/P29\\_RT53\\_Perfil\\_do\\_Fosfato.pdf/48caf3fe-b399-4032-9337-d63ce39b218d](http://www.mme.gov.br/documents/1138775/1256650/P29_RT53_Perfil_do_Fosfato.pdf/48caf3fe-b399-4032-9337-d63ce39b218d)> Acesso em Dez. 2015.

LAHIJANI, P. *et al.* Ash of palm empty fruit bunch as a natural catalyst for promoting the CO<sub>2</sub> gasification reactivity of biomass char. *Bioresource Technology*. v. 132, p. 351–355, 2013.

LEE, K. T.; BHATIA, S.; MOHAMED, A. R. Preparation and characterization of sorbents prepared from ash (waste material) for sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) removal. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, v. 7, n. 1, p. 16–23, 2005.

LEE, Y.-K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, v. 13, p. 307–315, 2001.

LIU, Y. *et al.* Comparative analysis of phosphorus use within national and local economies in China. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 51, n. 2, p. 454–474, 2007.

LODI, A. *et al.* Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 11, p. 656–660, 2003.

MADHIYANON, T. *et al.* A pilot-scale investigation of ash and deposition formation during oil-palm empty-fruit-bunch (EFB) combustion. *Fuel Processing Technology*, v. 96, p. 250–264, 2012.

MADKOUR, F. F.; KAMIL, A. E. W.; NASR, H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 38, n. 1, p. 51–57, 2012.

MAHDY, A. *et al.* Algaculture integration in conventional wastewater treatment plants: Anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass. *Bioresource Technology*, v. 184, p. 236–244, 2014.

MARKOU, G. *et al.* Exploration of using stripped ammonia and ash from poultry litter for the cultivation of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* and the green microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, v. 196, p. 459–468, 2015.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLEAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, v. 65, p. 186–202, 2014.

MARTIRENA, F. *et al.* Rudimentary, low tech incinerators as a means to produce reactive pozzolan out of sugar cane straw. *Cement and Concrete Research*, v. 36, n. 6, p. 1056–1061, 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MATJIE, R. H.; BUNT, J. R.; VAN HEERDEN, J. H. P. Extraction of alumina from coal fly ash generated from a selected low rank bituminous South African coal. *Minerals Engineering*, v. 18, n. 3, p. 299–310, 2005.

MCGINN, P. J. *et al.* Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: Opportunities and limitations. *Photosynthesis Research*, v. 109, n. 1–3, p. 231–247, 2011.

MIL'KO ED. Study of the requirement of two *Dunaliella* spp in mineral and organic components of the medium. *Moscow Univ. Vset., Biol.* 6: 21–23. 1962.

MOHAMED, A. R. *et al.* Oil palm ash/ $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{CaSO}_4$  absorbent for flue gas desulfurization. *Chemical Engineering and Technology*, v. 28, n. 8, p. 939–945, 2005.

MUHLING, M. Characterization of *Arthrospira (Spirulina)* strains. Tese de Doutorado. Durham University. 2000.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, v. 27, n. C, p. 31–36, 1962.

MUSTAFA, M. G.; UMINO, T.; NAKAGAWA, H. The effect of Spirulina feeding on muscle protein deposition in red sea bream, *Pagrus major*. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 10, n. 2–3, p. 141–145, 1994.

NIVENS, W. *et al.* 4500-P Phosphorus. In: *Standard methods*. p. 146–162. 1999.

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

- OREN, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems*, v. 1, p. 2, 2005.
- OTTOSEN, L. M.; KIRKELUND, G. M.; JENSEN, P. E. Extracting phosphorous from incinerated sewage sludge ash rich in iron or aluminum. *Chemosphere*, v. 91, n. 7, p. 963–969, 2013.
- PARÉS VIADER, R. *et al.* Electrodialytic extraction of phosphorus from ash of low-temperature gasification of sewage sludge. *Electrochimica Acta*, v. 181, p. 100–108, 2015.
- PETTERSSON, A.; ÅMAND, L. E.; STEENARI, B. M. Leaching of ashes from co-combustion of sewage sludge and wood-Part II: The mobility of metals during phosphorus extraction. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, n. 3, p. 236–244, 2008.
- PETZET, S.; CORNEL, P. Phosphorus recovery from wastewater. *Environmental Science and Technology*, v. 37, p. 110–143, 2013.
- PRUVOST, J. *et al.* Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 23, p. 5988–5995, 2009.
- RAICEVIC, V. *et al.* Eutrophication : Status , Trends and Restoration Atrategies for Palic Lake. 2013.
- RANJBAR, N. *et al.* Compressive strength and microstructural analysis of fly ash/palm oil fuel ash based geopolymer mortar under elevated temperatures. *Construction and Building Materials*, v. 65, p. 114–121, 2014.
- REDFIELD, A. C. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, v. 46, n. 03, pp 230A, 205-221, 1958.
- RENIMEL, I. *et al.* Cosmetic slimming composition containing an extract of biomass of the alga *Neochloris oleoabundans*. Patente: US 7,563,463 B2, 2009.
- REVIERS, B. Natureza e posição das “algas” na árvore filogenética do mundo vivo. *Biologia e Filogenia das Algas*, p. 19–57, 2007.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology/edited by Amos Richmond. Orton.Catie.Ac.Cr, p. 472, 2004.
- RITTMANN, B. E. *et al.* Capturing the lost phosphorus. *Chemosphere*, v. 84, n. 6, p. 846–853, 2011.
- RYAN, C. *et al.* Cultivating Clean Energy. n. October, p. 92, 2009.

- SANTASNACHOK, C.; KURNIAWAN, W.; HINODE, H. Journal of Environmental Chemical Engineering The use of synthesized zeolites from power plant rice husk ash obtained from Thailand as adsorbent for cadmium contamination removal from zinc mining. *Biochemical Pharmacology*, 2015.
- SANTOS, A. M.; WIJFFELS, R. H.; LAMERS, P. P. PH-upshock yields more lipids in nitrogen-starved *Neochloris oleoabundans*. *Bioresource Technology*, v. 152, p. 299–306, 2014.
- SANTOS, E. *et al.* Espectrometria de Fluorescência de Raios-X na Determinação de Espécies Químicas. *Enciclopédia Biofera*, v. 9, n. 17, p. 3413–3432, 2013.
- SARANRAJ, P.; SIVASAKTHI, S. *Spirulina platensis* – food for future: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, v. 4, n. 1, p. 26–33, 2014.
- SEILER, H., SIGEL, A., & SIGEL, H. Handbook on metals in clinical and analytical chemistry. Eds CRC Press. 1994.
- SEYHAN, D. Country-scale phosphorus balancing as a base for resources conservation. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 53, n. 12, p. 698–709, 2009.
- SHEMI, A. *et al.* Extraction of aluminium from coal fly ash: Identification and optimization of influential factors using statistical design of experiments. *International Journal of Mineral Processing*, v. 127, p. 10–15, 2014.
- SHU, L. *et al.* An economic evaluation of phosphorus recovery as struvite from digester supernatant. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 17, p. 2211–2216, 2006.
- SIDDIQUE, R. Resources, Conservation and Recycling Utilization of wood ash in concrete manufacturing. “Resources, Conservation & Recycling”, v. 67, p. 27–33, 2012.
- SILVA, H. R. *et al.* Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions. *AMB Express*, v. 6, n. 1, p. 10, 2016.
- SILVA BENAVIDES, A. M. *et al.* Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and Bioenergy*, v. 54, n. 0, p. 115–122, 2013.
- SILVA, T. H. C. A Mineração de Fosfato no Brasil: um estudo econométrico. Dissertação (mestrado em Economia de Empresas) Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2012.
- SINGH, P *et al.* Microalgae isolation and basic culturing techniques. Em KIM, S. (ed.) *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Academic Press, 43 - 54, 2015.

SMIL, V. Phosphorus in the environment: Natural flows and human interferences. *Annual Review of Energy and the Environment*, v. 25, p. 53–88, 2000.

SOUZA, L.; OLIVEIRA, C. Determinação colorimétrica da concentração de fosfato em uma amostra dada através do espectrofotômetro. Relatório (Química Industrial) Universidade Federal do Pernambuco, 2010.

TAN, Z.; LAGERKVIST, A. Phosphorus recovery from the biomass ash: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, n. 8, p. 3588–3602, 2011.

TANGCHIRAPAT, W.; JATURAPITAKKUL, C.; CHINDAPRASIRT, P. Use of palm oil fuel ash as a supplementary cementitious material for producing high-strength concrete. *Construction and Building Materials*, v. 23, n. 7, p. 2641–2646, 2009.

THANH, H.; SIEWERT, K.; LUDWIG, H. Alkali silica reaction in mortar formulated from self-compacting high performance concrete containing rice husk ash. *Construction and Building Materials*, v. 88, p. 10–19, 2015.

THY, P. *et al.* High temperature elemental losses and mineralogical changes in common biomass ashes. *Fuel*, v. 85, n. 5–6, p. 783–795, 2006.

TORZILLO, G. *et al.* Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. *Biomass*, v. 11, p. 61–74, 1986.

TYRRELL, T. Redfield Ratio. *Encyclopedia of Ocean Sciences*, p. 2377–2387, 2001.

UNIVERSITY OF WAIKATO. The phosphorus cycle, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/961-the-phosphorus-cycle>> Acesso em Mar. 2017.

URRETA, I. *et al.* Revalorization of *Neochloris oleoabundans* biomass as source of biodiesel by concurrent production of lipids and carotenoids. *Algal Research*, v. 5, n. 1, p. 16–22, 2014.

USGS. Mineral Commodities Summaries US Geological Survey. 2015. Disponível em: <<http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2015/mcs2015.pdf>>. Acesso em Jan. 2016.

UTEX CULTURE COLLECTION OF ALGAE, 2017. UTEX 1185 *Neochloris oleoabundans*: General maintenance conditions. Disponível em <<https://utex.org/products/utex-1185>> Acesso em: Fev, 2017.

VASSILEV, S. V *et al.* An overview of the composition and application of biomass ash . Part 1 . Phase – mineral and chemical composition and classification. *Fuel*, v. 105, p. 40–76, 2013.

VOLOSHIN, R. A. *et al.* Review: Biofuel production from plant and algal biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*, p. 1–17, 2016.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor & Francis, 2002.

WALTER, A. Estudo do processo biotecnológico para obtenção de ficocianina a partir da microalga *spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

WANG, T. *et al.* Predicting phosphorus bioavailability from high-ash biochars. *Plant and Soil*, v. 357, n. 1, p. 173–187, 2012.

WESTHOLM, L. Substrates for phosphorus removal - Potential benefits for on-site wastewater treatment? *Water Research*, v. 40, n. 1, p. 23–36, 2006.

WISELOGEL, A. E. *et al.* Compositional changes during storage of large round switchgrass bales. *Bioresource Technology*, v. 56, n. 1, p. 103–109, 1996.

WZOREK, Z. *et al.* Extraction of phosphorus compounds from ashes from thermal processing of sewage sludge. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, v. 19, n. 1, p. 39–50, 2006.

XU, H. *et al.* Recovery of phosphorus as struvite from sewage sludge ash. *Journal of Environmental Sciences (China)*, v. 24, n. 8, p. 1533–1538, 2012.

XU, Y. *et al.* pH dependent phosphorus release from waste activated sludge: Contributions of phosphorus speciation. *Chemical Engineering Journal*, v. 267, p. 260–265, 2015.

YU, Q. *et al.* Reaction between rice husk ash and  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  solution and the nature of its product. *Cement and Concrete Research*, v. 29, n. 1, p. 37–43, 1999.

ZAINUDIN, N. F. *et al.* Study of adsorbent prepared from oil palm ash (OPA) for flue gas desulfurization. *Separation and Purification Technology*, v. 45, n. 1, p. 50–60, 2005.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Thesis (Ph.D) - Université Des Paris, Paris, 1966.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, v. 9, n. 2, p. 189–194, 1997.